

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Perspetiva atual e futura no diagnóstico
do enfarte agudo do miocárdio**

Maria Joana Sousa

M

2019



U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas

**Monografia Perspetiva atual e futura no diagnóstico do enfarte
agudo do miocárdio**

Monografia realizada sob a orientação:

Prof.^a Doutora Georgina Correia da Silva

Prof. Doutor Agostinho Franklim Marques

Relatório final de estágio profissional

**Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa
Hospital CUF, Porto**

Relatório de estágio realizado sob a orientação:

**Dr. Fleming Torrinha,
Diretor Clínico**

Maria Joana Lopes Santiago Rodrigues de Sousa

Junho de 2019

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta monografia e do relatório final de estágio profissional.

Mestrado em Análises Clínicas

Monografia

Declaração de Integridade

Eu, Maria Jacine Lopes Santiago Ribeiro Sousa, abaixo assinado, nº 20160786 estudante do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração desta monografia.

Nesse sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 03 de Junho de 2019

Assinatura: Maria Jacine Santiago Sousa

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Parte I

Perspetiva atual e futura no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio

**Monografia do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Análises Clínicas**

Monografia realizada sob a orientação:

Prof.^a Doutora Georgina Correia da Silva

Prof. Doutor Agostinho Franklim Marques

Maria Joana Lopes Santiago Rodrigues de Sousa

Junho de 2019

Agradecimentos

O presente trabalho não seria possível sem os incentivos e o apoio que recebi dos que me rodeiam, e deixo aqui o meu agradecimento a todos os que contribuíram de alguma forma para que este objetivo fosse cumprido.

Agradeço aos meus orientadores Prof.^a Doutora Georgina da Silva Correia, e Prof. Doutor Franklim Marques pela orientação e pelas palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus colegas de trabalho pelo exemplo de profissionalismo que me deram.

Agradeço aos meus amigos que, nos momentos menos bons, sempre estiveram comigo.

Resumo

A Síndrome coronária aguda (SCA) compreende o enfarte agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI), sem elevação do segmento ST (NSTEMI) e a angina instável (AI); sendo que para esta classificação muito contribuiu a utilização da Troponina como biomarcador cardíaco.

O enfarte agudo do miocárdio (EAM) é definido pela morte dos cardiomiócitos devido a isquemia prolongada. As alterações dos níveis dos biomarcadores cardíacos permitem a detecção da lesão celular. O marcador bioquímico de necrose miocárdica ideal deve ser rapidamente libertado na circulação sanguínea após a lesão permitindo a detecção precoce e deve apresentar características de cardioespecificidade e sensibilidade. Atualmente, a Troponina cumpre estes requisitos, sendo considerada como *gold standard* no diagnóstico de lesão miocárdica.

A utilização de ensaios de Troponina de alta sensibilidade veio permitir a precocidade diagnóstica no EAM, fazendo com que o tempo de isquemia seja reduzido e conseqüentemente a área lesada seja menor. Desta forma, estes ensaios vieram promover o aumento da precisão diagnóstica, bem como proporcionar informações para o prognóstico e a estratificação do risco.

Uma vez que o tratamento precoce no SCA antecedente à necrose reduz as complicações e o risco a longo prazo, recentemente têm sido propostos novos biomarcadores para a detecção de isquemia na fase de pré enfarte, antes do início da lesão se tornar irreversível. Os novos biomarcadores associados ao risco cardiovascular podem ser agrupados segundo os seus significados clínicos inerentes aos processos celulares em que estão envolvidos, sendo sobretudo biomarcadores de inflamação, isquemia, necrose e disfunção cardíaca.

Pretende-se neste trabalho realizar uma abordagem sobre a perspectiva atual e futura dos biomarcadores no diagnóstico no enfarte agudo do miocárdio, com o objetivo de elucidar as vantagens e desvantagens dos utilizados atualmente na prática clínica, assim como dos novos biomarcadores cardíacos emergentes.

Palavras-chave: Enfarte agudo do miocárdio, Biomarcadores cardíacos, Troponinas

Abstract

Acute coronary syndrome (ACS) comprises acute myocardial infarction with ST segment elevation (STEMI), without ST segment elevation (NSTEMI) and unstable angina (AI) and for this classification much contributed the use of Troponin as cardiac biomarker.

Acute myocardial infarction (AMI) is defined by the death of cardiomyocytes due to prolonged ischemia. Alterations in cardiac biomarkers levels, allows the detection of cell injury. The ideal biochemical marker of myocardial necrosis should be rapidly released into the bloodstream after injury allowing early detection and should present features of cardio-specificity and sensitivity. Currently, Troponin meets these requirements, being considered as gold standard in the diagnosis of myocardial injury.

The use of high sensitivity Troponin assays has allowed the diagnostic precocity in the AMI, reducing the ischemia time and consequently the extent of injured area. Thus, these assays have promoted increased diagnostic accuracy, besides providing information for prognosis and risk stratification.

Since early treatment in ACS prior to necrosis reduces complications and long-term risk, new biomarkers have recently been proposed for detecting ischemia in the pre-infarct phase before the onset of the lesion becomes irreversible. The new biomarkers associated with cardiovascular risk can be grouped according to their clinical significance inherent to the cellular processes in which they are involved, being mainly biomarkers of inflammation, ischemia, necrosis and cardiac dysfunction.

The aim of this study is to analyze the current and future perspectives of biomarkers in the diagnosis of acute myocardial infarction, in order to elucidate the advantages and disadvantages of the ones in current clinical practice, as well as the new emerging cardiac biomarkers.

Keywords: Acute myocardial infarction, Cardiac biochemical markers, Troponins

Índice

Parte I – Monografia

1. Introdução	1
2. Anatomia cardíaca e sistema Cardiovascular	3
2.1 Fisiologia	6
3. Fisiopatologia do Enfarte Agudo do Miocárdio	8
3.1 Fatores de risco	11
3.1.1 Fatores de risco não modificáveis	11
3.1.2 Fatores de risco modificáveis	12
3.1.3 Proteína C reativa	14
4. Diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio	15
4.1 Apresentação Clínica	19
4.2 Eletrocardiograma	19
4.3 Biomarcadores cardíacos	22
5. Biomarcadores no Enfarte Agudo do Miocárdio	24
5.1 Evolução histórica	24
5.2 Biomarcadores atuais	26
5.2.1 Mioglobina	26
5.2.2 Ck-MB	27
5.2.3 Troponina	28
5.2.3.1. Troponina de alta sensibilidade	31
6. Novos Biomarcadores	36
6.1 Marcadores de Isquemia	36
Albumina modificada pela isquemia	36
6.2 Marcadores de Necrose	41
Proteína cardíaca de ligação aos ácidos gordos	41
6.3 Marcadores de Inflamação	44
Relação Neutrófilos/Linfócitos e Mieloperoxidase	44
6.4 Marcador de Disfunção Cardíaca	48

Peptídeo Natriurético Cerebral	49
6.5 Marcadores de Stress	51
Copeptina	51
6.6 Marcadores de expressão génica	55
MicroRNAs	55
7. Conclusão	58
8. Bibliografia	59

Índice de figuras

Figura 1 - Taxa de mortalidade padronizada por enfarte agudo do miocárdio em Portugal Continental de 2013 a 2015	1
Figura 2 - Constituição da parede cardíaca	4
Figura 3 - Corte de um plano frontal do coração onde se visualiza a anatomia interna e a direção do fluxo sanguíneo	5
Figura 4 - Sistema de condução cardíaco e eletrocardiograma	6
Figura 5 - Diagrama esquemático que ilustra os componentes proteicos do sarcómero cardíaco com ênfase específica no filamento de actina	7
Figura 6 - Papel dos monócitos na progressão da aterogénese	9
Figura 7 - Progressão da placa aterosclerótica representada na secção transversal de uma artéria coronária	10
Figura 8 - Quarta definição universal de enfarte agudo do miocárdio e critérios de diagnóstico, propostos pelas sociedades científicas <i>ESC/ACCF/AHA/WH</i>	17
Figura 9 - Diagnóstico diferencial de dor torácica	20

Figura 10 - Procedimento geral de avaliação de pacientes com síndrome coronária aguda	22
Figura 11 - Evolução temporal dos marcadores de necrose miocárdica após enfarte agudo do miocárdio	29
Figura 12 - Ilustração da cinética da Troponina em pacientes após lesão miocárdica aguda, incluindo enfarte agudo do miocárdio	31
Figura 13 - Esquema modelo para a rápida abordagem no diagnóstico de enfarte do miocárdio utilizando os testes de Troponina de alta sensibilidade	33
Figura 14 - Regra de algoritmo de descarte 0/ 3h e 0/ 1h proposto pela Sociedade Europeia de Cardiologia em doentes com suspeita de síndrome coronária aguda sem elevação do segmento ST usando testes de Troponina de alta sensibilidade	34
Figura 15 - Troponina de alta sensibilidade na doença cardiovascular: um novo paradigma na sua deteção, desde o início da doença até à sua manifestação	35
Figura 16 - Cinética de libertação da Albumina modificada por isquemia	37
Figura 17 - Mecanismo de formação da Albumina modificada por isquemia	38

Figura 18 - Papel da H-FABP no coração	41
Figura 19 - Cinética de libertação da proteína cardíaca de ligação aos ácidos gordos em relação aos outros biomarcadores de enfarte agudo do miocárdio	42
Figura 20 - Ilustração esquemática do Peptídeo Natriurético tipo B e síntese de NT-proBNP	49
Figura 21 - Síntese e mecanismo de libertação da Copeptina durante o enfarte agudo do miocárdio	52
Figura 22 - miRNAs libertados para a circulação sanguínea no enfarte agudo do miocárdio	56
Figura 23 - Expressão do miR-122-5p circulante e concentrações de Troponina em pacientes com enfarte agudo do miocárdio	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação dos biomarcadores Albumina modificada por isquemia e Troponina T de alta sensibilidade (Isolados e combinados) em pacientes com enfarte agudo do miocárdio 6 horas após o início dos sintomas	40
Tabela 2 - Análise de subgrupo na avaliação da precisão de diagnóstico na adição de Copeptina à Troponina	54

Abreviaturas

ACCF - *American College of Cardiology Foundation*

AGEs - Produtos finais da glicação

AHA - *American Heart Association*

AI - Angina instável

AST - Aspartato aminotransferase

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

AV - Nó aurículo-ventricular

AVP - Vasopressina

BNP - Peptídeo Natriurético Cerebral

BCRE - Bloqueio completo do ramo esquerdo

CK - Creatina cínase

CK-MB - Isoforma MB de Creatina cínase

CT - Colesterol Total

cTn - Troponina convencional

cTnI - Troponina I

cTnT - Troponina T

CV - Coeficiente de variação

DAC - Doença da artéria coronária

DCV - Doenças cardiovasculares

ECG - Eletrocardiograma

EAM - Enfarte Agudo do Miocárdio

ECA - Enzima conversora da angiotensina

ESC - *European Society of Cardiology*

FDA - *Food and Drug Administration*

FFA - Ácidos Gordos

GABG - Cirurgia de revascularização do miocárdio

GRACE - *Global Registry of Acute Coronary*

HDL - Lipoproteína de alta densidade

H-FABP - Proteína de ligação aos ácidos gordos

hs-cTn - Troponina de alta sensibilidade

IC - Doença Isquémica Cardíaca

IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

ICAM - Moléculas de adesão intercelular

IFN- γ - Interferão gama

IL-1 - Interleucina-1

IL-6 - Interleucina-6

IMA - Albumina modificada por isquemia

LDH - Desidrogenase láctica

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

miRNAs - MicroRNAs

MPO - Mieloperoxidase

NACB - *National Academy of Clinical Biochemistry*

NLR - Razão Neutrófilos/ Linfócitos

NO - Óxido nítrico

NSTEMI - Enfarte Agudo do Miocárdio sem elevação do segmento ST

PCI - Intervenção coronária percutânea

PCR - Proteína C Reativa

PCRas - Proteína C Reativa de alta sensibilidade

PMI - Enfarte do miocárdio perioperatório

ROS - Radicais livres de oxigênio

qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real

SA - Nó sino auricular

SCA - Síndrome Coronária Aguda

STEMI - Enfarte Agudo do Miocárdio com elevação do segmento ST

TG - Triglicerídeos

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

URL - Limite de Referência Superior

VCAM - Moléculas de adesão vascular

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

WHO - *World Health Organization*

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte nos estados membros da União Europeia, nomeadamente em Portugal, e são também uma das principais causas de morbilidade, incapacidade e invalidez. Apesar dos grandes esforços da comunidade científica, e das organizações de Saúde continuam a ser um grave problema de Saúde Pública. As doenças cardiovasculares abrangem doenças relacionadas com o sistema circulatório, incluindo as Doenças Cérebro Vasculares e a Doença Isquémica Cardíaca (IC). A análise dos indicadores de mortalidade evidência uma progressiva diminuição dos óbitos associados às doenças do aparelho circulatório em geral, possivelmente resultante da adoção de estratégias preventivas e diagnóstico precoce. No entanto, no contexto da Doença Isquémica Cardíaca, o EAM continua a ser uma das principais causas de morte e constata-se que nos últimos anos os ganhos de redução da mortalidade não são tão evidentes (Fig. 1), o que reforça a necessidade de manter esta patologia dentro das prioridades de atuação dos serviços e profissionais de saúde [1].

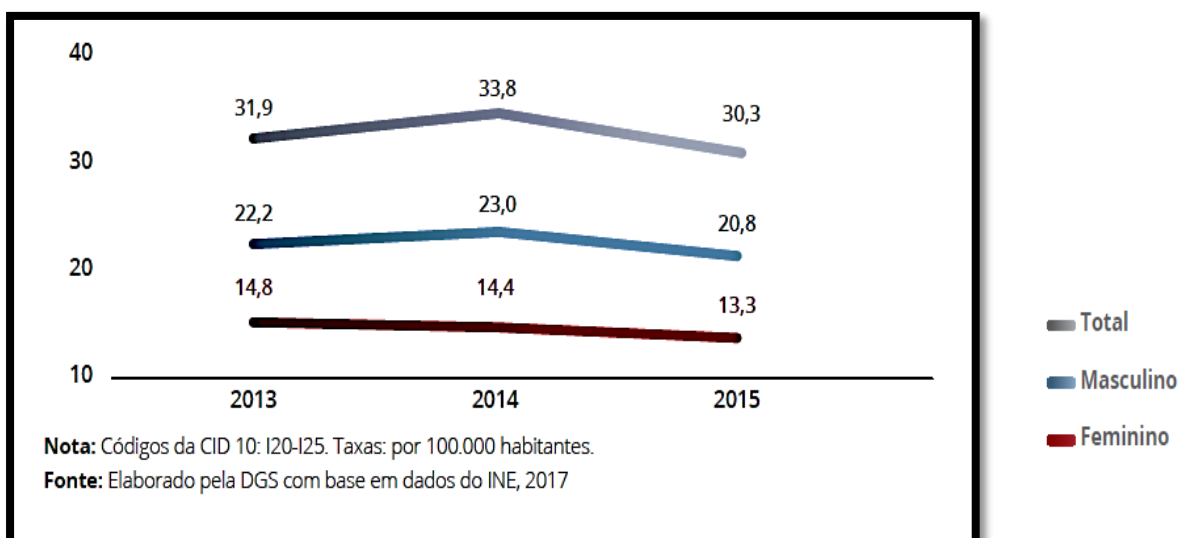


Figura 1 - Taxa de mortalidade padronizada por enfarte agudo do miocárdio em Portugal Continental de 2013 a 2015. Retirado de Ministério da Saúde. Direção Geral da Saúde. Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares Lisboa, 2017 [Acedido a 3 de Setembro de 2018] [1]

O conceito de Síndrome Coronária Aguda (SCA) compreende diversas apresentações clínicas relacionada com Doença Cardíaca Isquêmica resultantes da obstrução de uma artéria coronária, como o Enfarte Agudo do Miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI), Enfarte Agudo do Miocárdio sem elevação do segmento ST (NSTEMI) e a Angina Instável (AI). No SCA a dor é fundamental pelo que devemos ter presente as suas características (em aperto, irradiação), localização típica (retroesternal ou précordial), ou atípica (submandibular, abdómen superior, dorsal), tempo de duração, bem como outros sinais e sintomas acompanhantes (vômitos, tonturas, sudorese, dispneia). Como o prognóstico e tratamento das diversas entidades clínicas pertencentes ao SCA variam, é importante a sua diferenciação.

O diagnóstico é efetuado através da apresentação clínica, do eletrocardiograma (ECG) e pela alteração de biomarcadores cardíacos (relacionados com a severidade da isquemia e do dano celular). O tratamento é diferente consoante os casos, desde a utilização de fármacos tais como analgésicos incluindo opióides, nitratos, betabloqueadores, antiagregantes plaquetários, anticoagulantes, e reperfusão de emergência com fibrinolíticos [2].

As consequências dentro de um quadro clínico de SCA dependem do grau e local da obstrução da artéria coronária. A isquemia pode resultar de um fluxo inadequado de sangue e oxigénio, causado pela presença de uma placa aterosclerótica e estreitamento da artéria. O processo natural de envelhecimento associado a fatores de risco e ao estilo de vida, pode originar instabilidade da placa aterosclerótica, com consequente rotura e libertação de um trombo que causa a oclusão da artéria coronária [2].

Durante o processo isquémico, e consequente lesão dos cardiomiócitos, há libertação de constituintes celulares para a corrente sanguínea. As isoformas da Troponina (T e I) são consideradas atualmente, como marcadores bioquímicos de referência e fundamentais no diagnóstico de EAM [3], contudo, o diagnóstico precoce de EAM é crucial para uma intervenção terapêutica adequada permitindo melhorar o prognóstico, o que justifica a investigação e uso clínico de novos biomarcadores capazes de refletir diferentes aspetos fisiopatológicos do EAM e assim fornecer informações adicionais na deteção de inflamação, destabilização da placa, isquemia, necrose e disfunção cardíaca [4].

Caracterizar estes novos biomarcadores em termos de sensibilidade, especificidade, assim como o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, é fundamental para definir o seu papel no diagnóstico da patologia do EAM.

2. Anatomia cardíaca e sistema cardiovascular

O coração está localizado na cavidade torácica entre os pulmões, acima do diafragma, num espaço denominado mediastino, tendo como principal função a de bombear o sangue, assegurando o seu fluxo unidirecional e garantindo uma adequada irrigação a todo o organismo.

O sistema cardiovascular é constituído pelo coração e pelo sistema vascular, que inclui as artérias, arteríolas, capilares, vénulas e veias. O coração bombeia o sangue para as artérias que se ramificam em arteríolas que progressivamente diminuem o seu tamanho. É nos capilares sanguíneos que o sangue fornece oxigénio e nutrientes a todos os tecidos e recebe dióxido de carbono e outros produtos do metabolismo que posteriormente transporta até ao coração e pulmões [5].

A parede cardíaca é composta por três camadas de tecido: o pericárdio, o miocárdio e o endocárdio (Fig.2). O pericárdio é uma fina membrana serosa que constitui o revestimento da superfície exterior do coração. O miocárdio é a espessa camada média cardíaca composta por células musculares cardíacas que são responsáveis pela capacidade contráctil do coração. O endocárdio é a fina superfície interna das câmaras cardíacas formada por epitélio pavimentoso simples sobre uma camada de tecido conjuntivo. A envolver o coração, há um saco fibro-seroso denominado por saco pericárdico.

O órgão possui 4 cavidades. As cavidades superiores denominam-se aurículas (direita e esquerda) e as cavidades inferiores são os ventrículos (direito e esquerdo). A separar as aurículas dos ventrículos existem as válvulas, do lado direito a tricúspide e do lado esquerdo a bicúspide ou mitral.

O septo interventricular tem como função separar o sangue venoso que circula no lado direito; do sangue arterial que circula no lado esquerdo. O sangue circula num único sentido, ou seja, desde cada aurícula até ao respetivo ventrículo e daí até à artéria

correspondente, quer seja a pulmonar, no lado direito, ou a aorta, no lado esquerdo. Esta circulação é garantida por um sistema de válvulas que impedem o retorno do sangue na direção contrária.

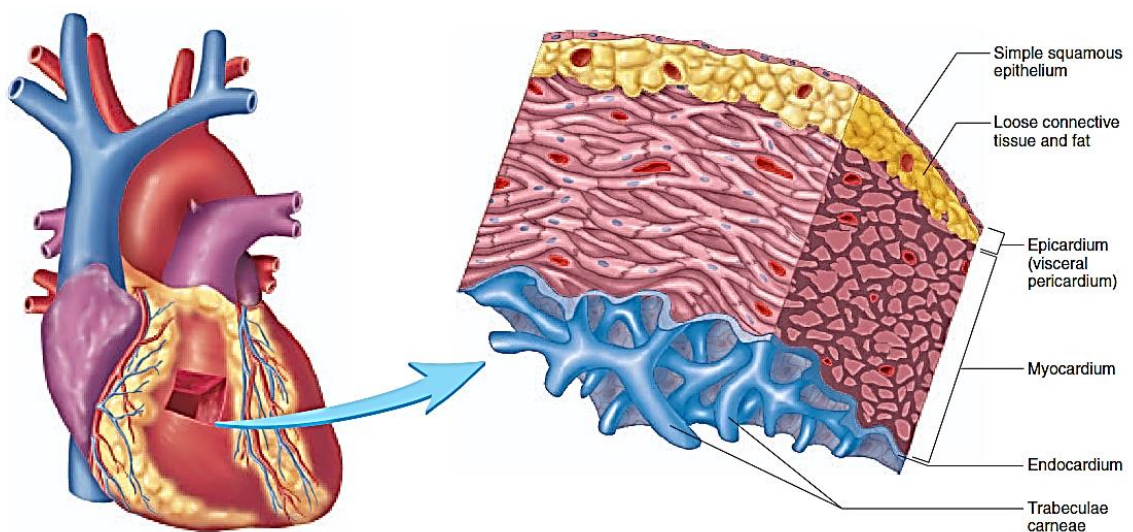


Figura 2 - Constituição da parede cardíaca (Retirado de *Seeley et al.*,2003) [5]

As válvulas mitral e tricúspide fazem o controlo da saída do sangue das aurículas para os ventrículos. As válvulas pulmonar e aórtica regulam a ejeção do sangue dos ventrículos para a artéria pulmonar e aorta respetivamente. As veias cavas superior e inferior transportam o sangue de todas as partes do corpo para a aurícula direita e quatro veias pulmonares transportam o sangue dos pulmões para a aurícula esquerda (Fig.3)

O sangue é transportado desde o ventrículo esquerdo passando por todas as partes do corpo até á aurícula direita. Quando aurícula direita se contrai, o sangue passa para o ventrículo direito que por contração permite a passagem para a artéria pulmonar que se ramifica na artéria pulmonar direita e esquerda, transportando o sangue para os pulmões, onde o dióxido de carbono é libertado e o oxigénio captado.

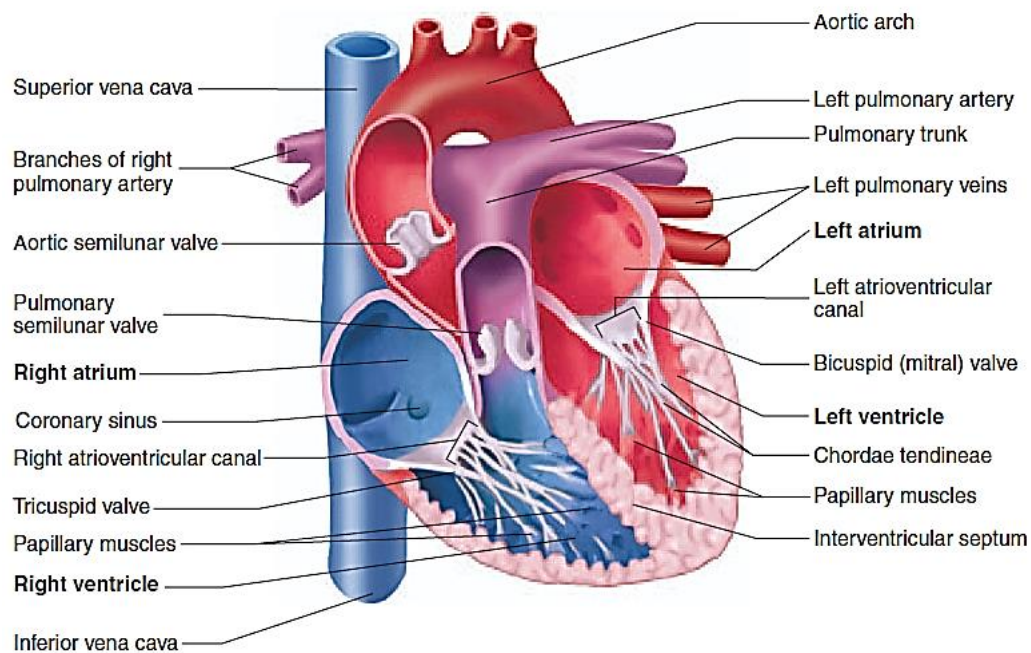


Figura 3 - Corte de um plano frontal do coração onde se visualiza a anatomia interna e a direção do fluxo sanguíneo. Retirado de *Seeley et al., 2003* [5]

O sangue retorna dos pulmões, através das quatro veias pulmonares, entra na aurícula esquerda e passa para o ventrículo esquerdo que por contração bombeia o sangue rico em oxigênio para a artéria aorta. A partir daí o sangue circula para as grandes artérias que se ramificam sucessivamente para formar artérias de calibre progressivamente menor, atingindo tecidos ou órgãos alvo, exceto a zona do pulmão que é irrigada pelos vasos pulmonares.

O coração dispõe de uma circulação própria. As artérias coronárias esquerda e direita têm origem na aorta ascendente. As coronárias enchem na diástole após o fecho da válvula aórtica, permitindo que o sangue oxigenado irrigue o músculo cardíaco. Após irrigar o tecido cardíaco, o sangue passa por uma rede de pequenas veias que se vão unir formando veias cada vez maiores como a grande veia cardíaca, veia cardíaca média, pequena veia cardíaca, veia posterior do ventrículo esquerdo e veia de Marshall que transportam o sangue para um vaso principal, o seio coronário até penetrar na aurícula direita.

As várias artérias coronárias têm inúmeras ramificações que as unem entre si, o que constitui uma vantagem, pois caso alguma deixe de irrigar uma determinada região, outra pode compensar, evitando a falta de oxigenação. Esta circulação colateral, igualmente

denominada de "compensadora" eventualmente permite que a extensão de um enfarte, em caso de obstrução de uma determinada artéria, fique mais limitada.

2.1 Fisiologia

O coração é um órgão que possui duas características essenciais: excitabilidade e condutibilidade.

A contração das fibras musculares do coração é despoletada por um estímulo elétrico. O potencial de ação é transmitido por um sistema de condução constituído pelo nó sino auricular (SA), nó aurículo-ventricular (AV), feixe His e rede de Purkinje. O potencial de ação tem origem no nó SA, que está localizado entre a veia cava superior e a aurícula direita, propagando-se através da parede da aurícula até ao nó AV. O nó AV, por sua vez transmite o impulso elétrico até ao feixe de His (ramo direito e esquerdo) no septo interventricular, que se propaga à rede de Purkinje (Fig.4) [5]. O eletrocardiograma (ECG) é o registo desta atividade elétrica do coração.

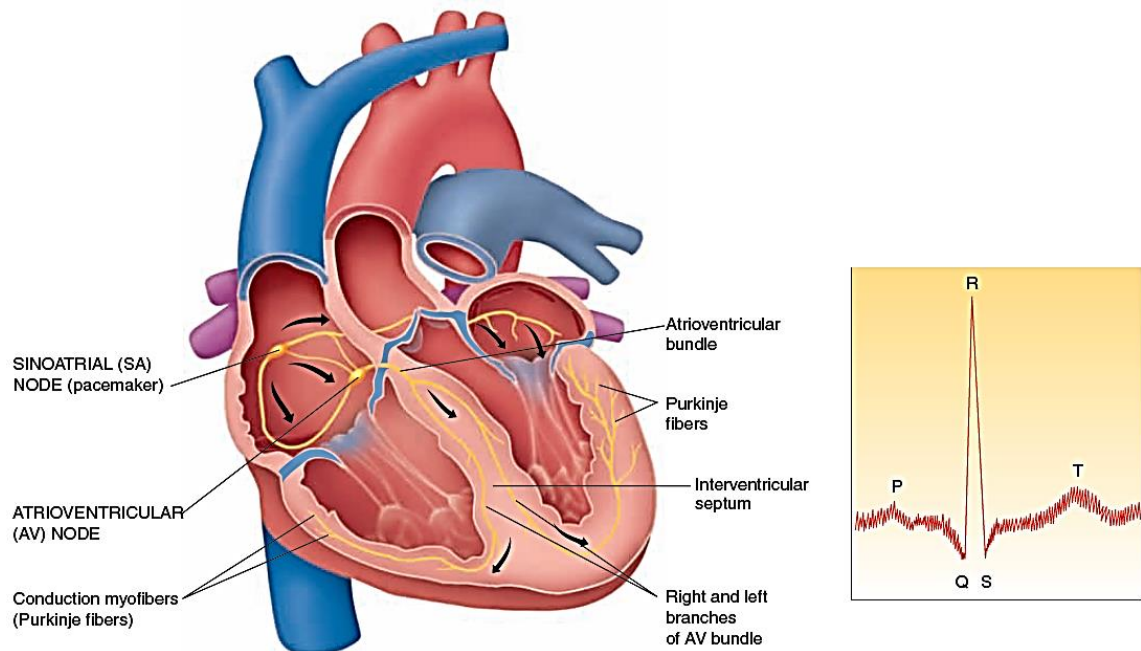


Figura 4 - Sistema de condução cardíaco e eletrocardiograma. As ondas P correspondem á despolarização auricular. O complexo QRS é composto por três ondas: Onda Q, onda R e onda S. O complexo QRS é originado pela despolarização ventricular e assinala o início da contração ventricular. A onda T representa a repolarização dos ventrículos e precede ao relaxamento ventricular (http://samples.ibpub.com/9781449652609/99069_ch05_6101.pdf consultado em 19 de Abril de 2018).

As células musculares cardíacas são alongadas e ramificadas, contendo miofilamentos de actina e miosina organizados em forma de sarcômeros que se unem pelas extremidades para formar miofibrilas. Os miofilamentos de actina e miosina são responsáveis pela contração do músculo cardíaco e a sua organização confere um aspeto estriado.

Os miofilamentos de actina consistem em dois polímeros helicoidais de actina entrelaçadas com duas cadeias de Tropomiosina. Cada cadeia de Tropomiosina encontra-se ligada a um complexo Troponínico, constituído por três subunidades – Troponina C, Troponina I e Troponina T – na razão molar de 1:1:1 [6]. Para ocorrer a despolarização das membranas celulares do músculo cardíaco, o cálcio tem de difundir-se do retículo sarcoplasmático para os miofilamentos de actina. Esta interação do cálcio com os miofilamentos resulta no deslizamento relativo da actina e miosina, ocorrendo a contração muscular (Fig.5).

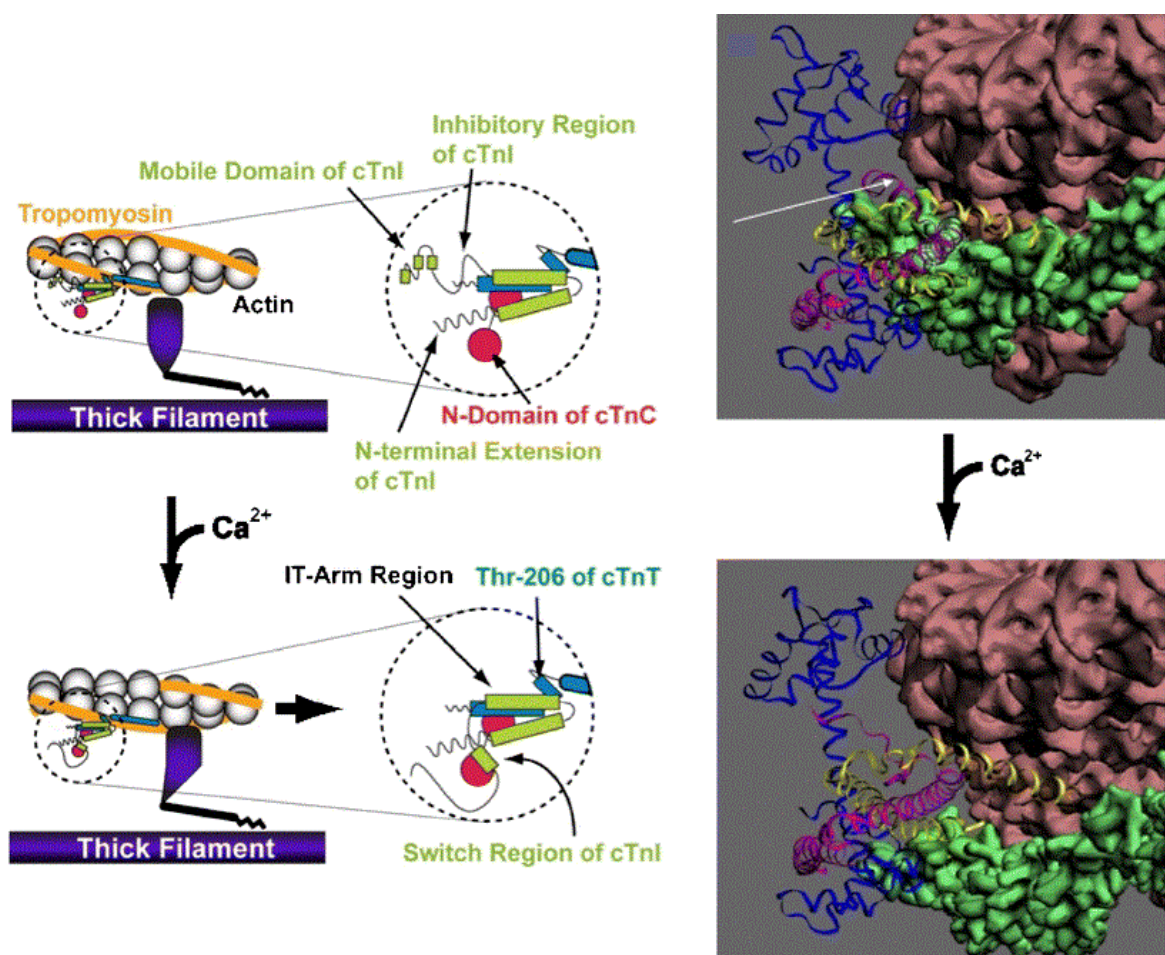


Figura 5 - Diagrama esquemático que ilustra os componentes proteicos do sarcômero cardíaco com ênfase específica no filamento de actina. Adaptado de Kobayashi et al., 2008 [6]

3. Fisiopatologia do Enfarte Agudo do Miocárdio

No início do século XX surgiram as primeiras descrições sobre a associação entre a formação de um trombo numa artéria coronária e as características clínicas do EAM, suportadas por vários estudos de exames *post-mortem* que demonstravam uma relação entre a oclusão trombótica e o enfarte do miocárdio [2].

O EAM é definido pela morte dos cardiomiócitos devido a isquemia prolongada. Em termos metabólicos, a célula muscular cardíaca está adaptada ao metabolismo aeróbico e possui uma grande concentração de mioglobina e um elevado número de mitocôndrias. A organização das fibras musculares cardíacas possui características próprias. As necessidades energéticas do miocárdio e a sua dependência em relação à concentração de ATP condicionam o seu metabolismo. Assim, o coração tem um metabolismo anaeróbio limitado e quando o aporte de oxigénio é reduzido ou suprimido deixa de existir produção adequada de ATP com conseqüente lesão e morte dos cardiomiócitos. O decréscimo do glicogénio celular, o relaxamento das miofibrilas e a rotura do sarcolema são as primeiras alterações ultraestruturais que decorrem logo nos primeiros 10-15 min após o início da isquemia [7]. Habitualmente a isquemia miocárdica é causada pela redução do calibre da artéria coronária por presença de uma placa aterosclerótica, por obstrução ou por libertação de um trombo [8, 9].

As placas de ateroma são manifestações da aterosclerose caracterizadas pela acumulação local de lípidos, tecido fibroso e depósitos de cálcio na camada íntima da artéria. A aterosclerose é uma doença inflamatória, multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas [10].

O endotélio tem a capacidade de exercer efeitos vasoprotetores, tais como vasodilatação, supressão do crescimento de células musculares lisas e inibição da resposta inflamatória. Esta capacidade vasoprotetora, é mediada em grande parte pela produção de um vasodilatador endógeno, o óxido nítrico (NO), que confere propriedades anticoagulantes, antiagregantes e fibrinolíticas. A redução da biodisponibilidade de NO tem sido referida como um dos mecanismos que promove a disfunção endotelial e a aterosclerose através de efeitos relacionados com a vasoconstrição, agregação plaquetária, adesão leucocitária, proliferação/ migração de células musculares lisas vasculares e síntese de citocinas pró-inflamatórias que induzem o stress oxidativo através da produção de radicais livres de oxigénio (ROS), prejudiciais ao sistema vascular. Esta alteração de equilíbrio entre as propriedades vasodilatadoras e o aumento da expressão de sinais pró-

inflamatórios, pró-oxidantes e proliferativos, aliada à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são fatores que contribuem para o processo aterosclerótico responsável pela lesão do endotélio e consequente trombose [10-12].

O stress oxidativo promove a oxidação das LDL e amplifica as vias de sinalização da inflamação nos vasos. A inflamação está associada com a sobreexpressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido por macrófagos e células endoteliais, que em associação com o interferão gama (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), induz a expressão de moléculas de adesão das células vasculares (VCAM), moléculas de adesão intercelular (ICAM), selectina de plaquetas (P-selectina) e selectina de células endoteliais (E-selectina) promovendo a adesão, migração leucocitária e plaquetária, disfunção endotelial e a iniciação da formação de ateroma [13]. Uma vez o endotélio danificado, os monócitos, por ligação a moléculas de adesão migram para o espaço subendotelial, onde sofrem diferenciação em macrófagos. Os macrófagos captam as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas transformando-se em “foam cells” constituindo um fator adicional promotor da aterogênese [14]. A liberação contínua de citocinas pró-inflamatórias por parte dos macrófagos ativados e das células endoteliais, perpetuam o processo através do recrutamento de mais macrófagos e células musculares vasculares que migram da camada média para camada íntima por estimulação dos mediadores da inflamação. Este processo propagado pelo aumento de transporte das LDL oxidadas para a camada íntima, conduz à formação da placa aterosclerótica (Fig.6).

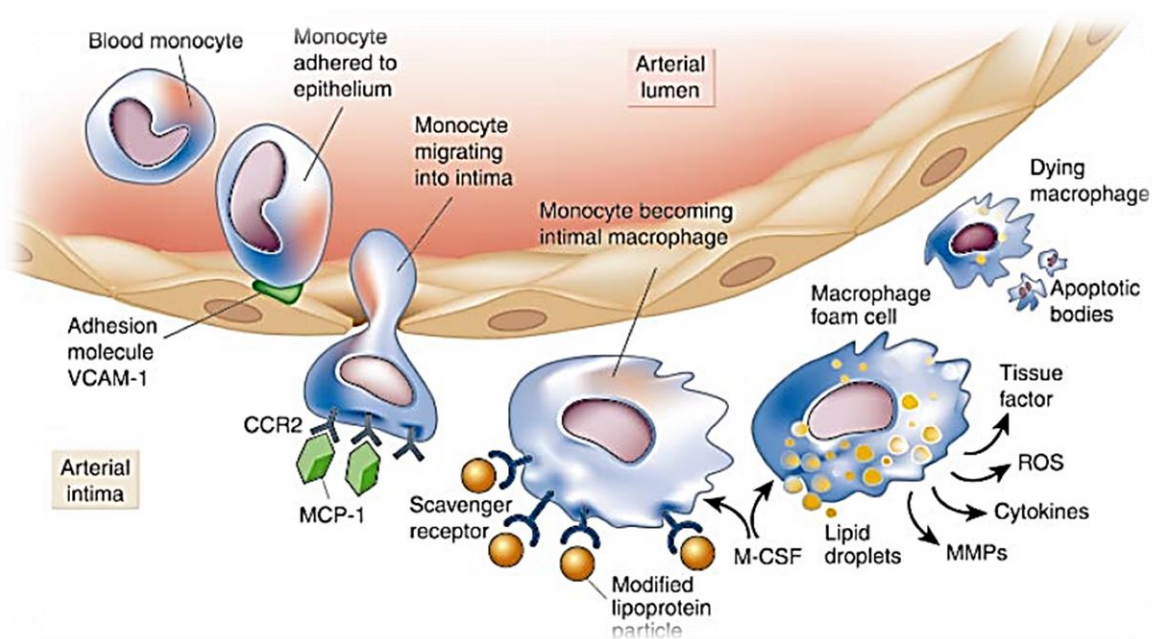


Figura 6 - Papel dos monócitos na progressão da aterogênese. Retirado de *Libby,2002* [14].

Por outro lado, os macrófagos também libertam metaloproteínas, enzimas que digerem a matriz extracelular provocando a instabilidade da placa. O equilíbrio entre a atividade sintética e de degradação, é um processo modulado pelos mediadores inflamatórios, desempenhando um papel importante na vulnerabilidade da placa e propensão à rotura. A progressão das lesões ateroscleróticas é variável, não linear, e imprevisível [8, 10, 15].

A exposição de material trombogénico ativa as plaquetas e a cascata de coagulação. A prevalência do estado de inflamação crónica pode resultar na formação de trombos com a oclusão do lúmen vascular o que impede o normal fluxo sanguíneo para regiões do miocárdio causando necrose tecidual. As consequências variam com a localização e a duração da obstrução e vão desde isquemia transitória ao enfarte. (Fig.7).

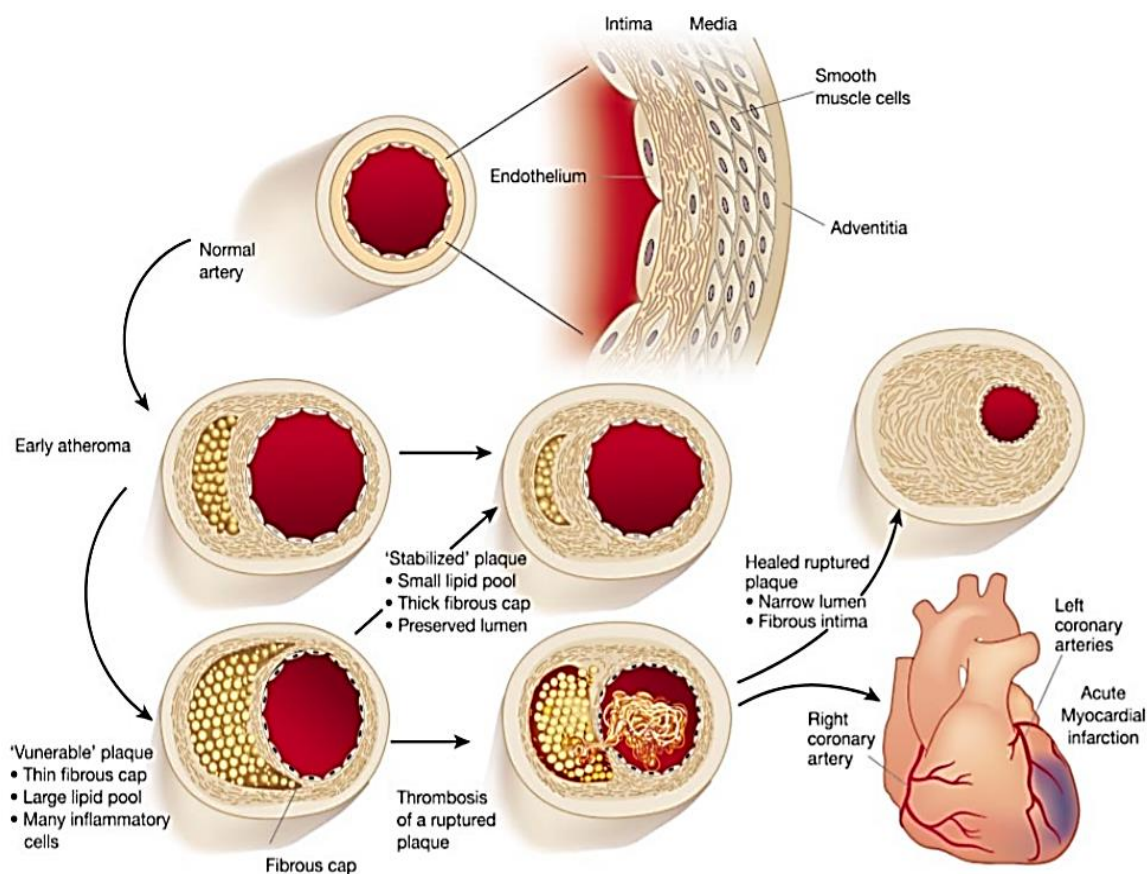


Figura 7 - Progressão da placa aterosclerótica representada na secção transversal de uma artéria coronária. Retirado de Libby, 2002 [14]

3.1 Fatores de risco

Vários estudos epidemiológicos realizados nos últimos 50 anos revelaram a existência de fatores de risco genéticos e ambientais para a aterosclerose e permitiram estabelecer uma relação de causa-efeito entre os fatores de risco e as doenças cardiovasculares, mais especificamente a Doença Cardíaca Isquémica e a Doença Cérebro Vascular.

O conceito de fator de risco é muito importante na prática clínica, sobretudo na sua vertente preventiva para maximizar potenciais intervenções/estratégias.

O risco cardiovascular global é obtido pela presença e interação de vários fatores de risco num indivíduo. Estes fatores interagem e potenciam-se, tendo a sua associação um efeito sinérgico e multiplicativo [16]. Esses fatores de risco podem ser modificáveis ou não, mediante o estilo de vida e podem ser classicamente classificados em fatores de risco não modificáveis e fatores de risco modificáveis.

3.1.1 Fatores de risco não modificáveis

- Hereditariedade: Indivíduos com antecedentes familiares de DCV têm maior probabilidade de vir a sofrer deste tipo de eventos, sendo que a variabilidade genética pode alterar a função de enzimas, recetores e ligandos, envolvidos no processo bioquímico aterosclerótico. Desta forma, o património genético determina a resposta individual aos fatores de risco e aos estímulos aterogénicos, resultando em diferentes suscetibilidades para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose [17].

Género: Apesar das DCV atingirem ambos os géneros, o género masculino apresenta, um risco acrescido. De facto, os estrogénios, parecem exercer um efeito cardioprotetor até à menopausa [18], pois promovem a produção de NO e a degradação de ROS, e assim conferem um efeito ateroprotetor. Este papel na modulação do tónus vascular, através de um mecanismo dependente de NO, é contrário aos efeitos vasoconstritores do endotélio e de resistência vascular [19], exercendo também um efeito benéfico sobre o perfil lipídico e inibição da deposição de colesterol na parede das artérias coronárias [20].

- **Idade:** Vários estudos epidemiológicos demonstraram que as alterações metabólicas tendem a aumentar com a idade e os processos degenerativos associados ao próprio envelhecimento, causam uma série de alterações na função e morfologia celulares e um aumento de risco de progressão da aterosclerose. O processo de envelhecimento está associado a um aumento de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que os mecanismos antioxidantes endoteliais entram em declínio. Este desequilíbrio pró-oxidante afeta tanto a atividade do NO, como promove o aumento da produção de fatores vasoconstritores e formação de ROS. Por outro lado, a deterioração do equilíbrio endotelial está associada ao aumento da tensão arterial sistólica devido ao aumento da calcificação das artérias [21], bem como à diminuição na relação HDL/Colesterol total agravada pelo estilo de vida sedentário e um consumo alimentar inadequado [18].

3.1.2 Fatores de risco modificáveis

- **Sedentarismo:** A inatividade física é hoje em dia reconhecida como um importante fator de risco para DCV. O exercício melhora a função endotelial e reduz o risco, promovendo a redução da atividade inflamatória [12] e uma melhoria na biodisponibilidade de NO no endotélio, com efeitos benéficos na função vasomotora [22]. A prática de atividade física leva a uma melhoria da sensibilidade à insulina [23] e melhoria no perfil das lipoproteínas plasmáticas com aumento da HDL [24].
- **Alimentação:** As evidências atuais sugerem que os ácidos gordos saturados tendem a aumentar os níveis de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL), enquanto que os ácidos gordos monoinsaturados e poliinsaturados exercem uma ação contrária. Assim, uma dieta pobre em ácidos gordos saturados com quantidades adequadas de ácidos gordos monoinsaturados e poliinsaturados, especialmente ácidos gordos ômega-3 de cadeia longa, é recomendada para reduzir o risco de desenvolvimento de DCV [25].
- **Obesidade:** A obesidade central tem demonstrado ser um indicador de mortalidade nas DCV [26, 27]. O tratamento da obesidade, muitas vezes melhora

ou até normaliza a resistência à insulina associada à obesidade ou hipertensão, com melhoria na disfunção endotelial [28].

- Dislipidemias: Níveis elevados de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) associados a redução dos níveis de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL), constituem fatores de risco para o desenvolvimento de DCV [29].

Os possíveis mecanismos subjacentes à disfunção endotelial induzida por dislipidemia incluem, stresse oxidativo, produção de ROS e oxidação das LDL, com consequente diminuição de produção de NO [30].

- Diabetes Mellitus: A hiperglicemia leva à formação de produtos finais da glicação (AGEs), produtos de glicação enzimática de proteínas e lípidos. Os AGEs acumulam-se na parede do vaso, alterando a integridade estrutural do endotélio, impedindo desta forma, a atividade normal de NO, contribuindo substancialmente para a disfunção endotelial. Além disso, os AGEs ligam-se a receptores de superfície específicos, que são expressos nos monócitos, macrófagos e células do músculo liso, resultando na amplificação de uma resposta inflamatória, aumento da permeabilidade vascular e stresse oxidativo [31, 32].

- Hipertensão arterial: A elevação da pressão arterial danifica o revestimento das artérias, interferindo nas suas propriedades hemodinâmicas e estruturais [33], através da redução da biodisponibilidade de NO e aumento da produção de ROS. A disfunção endotelial deve-se à prevalência de mecanismos ativadores da vasoconstrição como o sistema da Endotelina-1 e Angiotensina II, que contribui para a rigidez nas artérias e ativação do estado inflamatório [34] resultando em alterações degenerativas do sistema vascular, de natureza aterosclerótica.

- Tabagismo: O fumo do cigarro é uma fonte de radicais livres e contém inúmeras substâncias tóxicas responsáveis pela lesão do endotélio, resultando num aumento da vasoconstrição devido à redução da atividade de NO. Esta alteração predispõe a interações endoteliais e plaquetárias e ao aumento da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, aumentando o risco de trombose. Por outro lado, a exposição ao fumo do cigarro promove o desequilíbrio entre a produção endógena de defesas antioxidantes face à produção de ROS [35], estando associada em grande parte ao stress oxidativo e contribuindo diretamente

para a disfunção endotelial, com o aumento da resistência vascular e diminuição do fluxo sanguíneo [36].

Sabe-se que vários fatores de risco cardiovascular estão relacionados com alterações nos níveis de lípidos e lipoproteínas circulantes e que por sua vez estão associadas ao estilo de vida. Assim sendo, a identificação precoce dos fatores de risco parece ser o melhor meio para estabelecer estratégias de prevenção e, por conseguinte, contribuir para a redução da morbidade cardiovascular.

3.1.3 Proteína C reativa

A Proteína C-reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda que é libertada na corrente sanguínea em resposta a um estímulo inflamatório. É sintetizada pelo fígado e regulada por citocinas, predominantemente pela IL-6, o TNF- α e a IL-1 [37].

Níveis elevados de Proteína C reativa (PCR) encontram-se correlacionados positivamente com a rotura da placa refletindo a atividade dos macrófagos e contribuindo diretamente para a fase precoce da aterosclerose na íntima, reduzindo a biodisponibilidade de NO e indução da disfunção endotelial [38, 39].

Através do desenvolvimento de técnicas com sensibilidade aumentada, surgiu o ensaio de PCR de alta sensibilidade (PCRas) que deteta níveis de PCR muito baixos, podendo ser utilizada como um marcador na SCA e servir como um forte preditor de eventos cardíacos futuros [40].

Pacientes com Angina instável (AI) com valores de PCRas $>3,0$ mg/L apresentaram maior probabilidade de sofrer eventos de isquemia recorrente e EAM, em comparação com pacientes que apresentam níveis menos elevados [41].

No estudo TIMI-11A, [42] os pacientes com EAM sem elevação do segmento ST que apresentavam um valor de PCRas $>15,5$ mg/L obtiveram um risco de mortalidade 10 vezes superior em 14 dias, em relação a pacientes com valores inferiores.

O estudo PROVE-IT TIMI 22 [43] demonstrou que pacientes que sofreram EAM e que reduziram os seus níveis para PCRas <2 mg/L através de tratamento á base de estatinas, apresentaram menor probabilidade de vir a sofrer novamente de EAM. Desta forma, as estatinas são capazes de reduzir os níveis de PCR, para além das suas propriedades redutoras de colesterol, sendo a PCR útil na estratificação de risco de futuras complicações cardiovasculares.

Em 2002, a *American Heart Association* (AHA) e o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomendaram a utilização de marcadores inflamatórios, (especialmente a PCR, pela maior disponibilidade de métodos de doseamento) na melhoria da estratificação de risco. Através da avaliação da PCR, podem classificar-se três grupos de risco: baixo risco (níveis inferiores a 1,0 mg/L); risco médio (1,0 a 3,0 mg/L) e alto risco (acima de 3,0 mg/L). No entanto, devido à falta de sensibilidade e especificidade cardíaca, a PCR não pode ser usada como marcador de diagnóstico pois pode estar elevada em qualquer estado inflamatório, sendo apenas útil no campo de prognóstico e estratificação de risco. Desta forma, pacientes classificados na categoria de médio e alto risco, podem beneficiar de estratégias farmacológicas como terapia antiplaquetária, uso de estatinas ou revascularização precoce de forma a evitar futuras complicações cardiovasculares [44].

A exposição contínua a esses fatores de risco leva a uma maior progressão da aterosclerose, resultando em placas ateroscleróticas instáveis, estreitamento dos vasos e obstrução do fluxo sanguíneo para órgãos vitais, como o coração e o cérebro.

Como referido anteriormente, o risco total de desenvolver doença cardiovascular é determinado pelo efeito combinado de fatores de risco, que comumente coexistem e atuam de forma potenciada [45].

4. Diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio

A definição de Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) sofreu modificações ao longo dos anos desde a sua primeira versão pela *World Health Organization* (WHO) em 1979 [46]. Se inicialmente o diagnóstico se baseava em sintomas, alterações no ECG e no doseamento da atividade de enzimas, hoje em dia devido ao avanço da tecnologia e ao desenvolvimento de biomarcadores cardíacos cada vez mais sensíveis e específicos e de técnicas imagiológicas, é possível a deteção precoce de lesão do miocárdio.

Em 2000 a *European Society of Cardiology* (ESC) e a *American College of Cardiology Foundation* (ACCF), propuseram, uma definição de EAM baseada em critérios clínicos com realce na importância da sensibilidade e especificidade no uso de marcadores bioquímicos cardíacos e a recomendação do uso preferencial de Troponina para diagnóstico [47]. Em 2007 o Documento de Consenso da definição universal de enfarte agudo do miocárdio, introduziu um novo sistema de classificação de EAM com cinco subcategorias [48].

A terceira definição universal de EAM foi lançada em 2012 e foi aprovada por várias sociedades internacionais: *Joint Task Force of the European Society of Cardiology, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association e a World Health Federation (ESC / ACCF / AHA / WHF)* tendo sido adotado pela *World Health Organization (WHO)* [3]. As principais alterações propostas foram a introdução de novos critérios adaptados ao ECG e à imagiologia, e alterações na classificação do tipo de enfarte do miocárdio e o uso de ensaios laboratoriais de Troponina de alta sensibilidade.

A 4ª definição universal de Enfarte Agudo do Miocárdio, publicada recentemente pela ESC em 2018, apresenta atualizações e novas informações que ajudam a clarificar situações clínicas de difícil interpretação, com implicações práticas, diagnósticas e terapêuticas. Esta nova definição refere que nem todas as elevações de Troponina representam o EAM, estando descrito a diferença explícita entre EAM (requer a elevação de biomarcadores e evidência de isquemia) e lesão miocárdica, onde se produz uma elevação de biomarcadores de causa não isquémica. Deste modo, entre os pacientes com valores elevados de Troponina (cTn), deve distinguir-se se os pacientes sofreram uma lesão miocárdica não isquémica ou um dos subtipos de EAM (Fig.8). O termo lesão do miocárdio deve ser utilizado quando há evidência de valores elevados de Troponina cTn com pelo menos, um valor acima do percentil 99 do limite superior de referência (URL). A lesão do miocárdio é considerada aguda no caso de subida dos valores de cTn [49]. Assim, se a isquemia do miocárdio estiver clinicamente presente ou se for detetada pelas alterações eletrocardiográficas (ECG), juntamente com a lesão do miocárdio, manifestada pelo padrão de subida e/ou descida dos valores de cTn, é apropriado um diagnóstico de EAM. Se a isquemia do miocárdio não estiver clinicamente presente, então os valores elevados de cTn poderão ser indicativos de lesão aguda do miocárdio se o padrão dos valores estiver a subir e/ou a descer ou de uma lesão crónica em curso se o padrão não se alterar. A lesão do miocárdio não isquémica pode surgir secundariamente a situações cardíacas como a miocardite ou pode estar associada a situações não cardíacas como a insuficiência renal.

Definições universais de lesão do miocárdio e de enfarte do miocárdio

Definições universais de lesão do miocárdio e de enfarte do miocárdio

Critérios para a lesão do miocárdio

O termo lesão do miocárdio deve ser utilizado quando há evidência de valores elevados de troponina cardíaca (Tnc) com, pelo menos, um valor acima do percentil 99 do limite superior de referência (LSR). A lesão do miocárdio é considerada aguda no caso de subida e/ou descida dos valores de Tnc.

Critérios para o enfarte agudo do miocárdio (EM de tipos 1, 2 e 3)

O termo enfarte agudo do miocárdio deve ser utilizado quando há lesão aguda do miocárdio com evidência clínica de isquemia aguda do miocárdio e com deteção de uma subida e/ou descida dos valores de Tnc com, pelo menos, um valor acima do percentil 99 do LSR e com, pelo menos, um dos seguintes critérios:

- Sintomas de isquemia do miocárdio;
- Alterações isquémicas de novo no ECG;
- Desenvolvimento de ondas Q patológicas;
- Evidência imagiológica de perda de miocárdio viável de novo ou de alterações da motilidade segmentar de novo num padrão compatível com uma etiologia isquémica;
- Identificação de um trombo coronário através de angiografia ou de autópsia (não no caso de EM dos tipos 2 ou 3).

A demonstração *post-mortem* de aterotrombose aguda na artéria que irriga a zona do miocárdio enfartada corresponde aos critérios de EM de tipo 1.

A evidência de um desequilíbrio entre o fornecimento e as necessidades de oxigénio no miocárdio não relacionado com a aterotrombose aguda corresponde aos critérios de EM de tipo 2.

Morte cardíaca em doentes com sintomas sugestivos de isquemia do miocárdio e alterações isquémicas presumivelmente de novo no ECG antes que os valores de Tnc estejam disponíveis ou alterados corresponde aos critérios de EM do tipo 3.

Figura 8 – Quarta definição universal de enfarte agudo do miocárdio e critérios de diagnóstico, propostos pelas sociedades científicas ESC/ACCF/AHA/WH. CABG: Cirurgia de revascularização do miocárdio, ECG: Eletrocardiograma, EM: Enfarte do miocárdio, ICP: Intervenção coronária percutânea, LSR: Limite superior de referência, TnC: Troponina cardíaca. Adaptado de Thygesen et al., 2018 [49] (<https://spc.pt/web/quest/-/4-definicao-universal-de-enfarte-do-miocardio>, consultado em 12 Maio de 2019)

Definições universais de lesão do miocárdio e de enfarte do miocárdio (cont.)

Critérios para enfarte do miocárdio relacionado com procedimento coronário (EM de tipos 4 e 5)

O EM relacionado com a intervenção coronária percutânea (ICP) é designado por *EM de tipo 4a*. O EM relacionado com a cirurgia de revascularização do miocárdio (CABG) é designado por EM de tipo 5.

O EM relacionado com o procedimento coronário ≤ 48 horas após o procedimento índice é arbitrariamente definido pela elevação dos valores de Tnc >5 vezes para o *EM de tipo 4a* e >10 vezes para o *EM de tipo 5* acima do percentil 99 do LSR em doentes com valores basais normais. Os doentes com valores elevados de Tnc pré-procedimento, nos quais o nível de Tnc pré-procedimento está estável (variação $\leq 20\%$) ou decrescente, deve satisfazer os critérios para um aumento >5 ou >10 vezes e manifestar uma alteração do valor basal $>20\%$. Além disso requer pelo menos um dos seguintes critérios:

- Alterações isquémicas de novo no ECG (este critério está relacionado apenas com *EM de tipo 4a*);
- Desenvolvimento de ondas Q patológicas de novo;
- Evidência imagiológica de perda de miocárdio viável presumivelmente de novo e num padrão compatível com etiologia isquémica;
- Resultados angiográficos compatíveis com uma complicação provocada pelo procedimento com redução do fluxo sanguíneo, tal como disseção coronária, oclusão de artéria epicárdica *major* ou enxerto, trombo com oclusão dum ramo colateral, disrupção do fluxo colateral ou embolização distal.

O aparecimento isolado de ondas Q patológicas de novo é compatível com os critérios de *EM dos tipos 4a e 5* no âmbito dos respetivos procedimentos de revascularização, se os valores de Tnc forem elevados e estiverem a aumentar, mesmo que sejam inferiores aos limiares pré-especificados para o EAM associados a ICP e a CABG.

Outros tipos de EM de tipo 4 incluem a trombose de *stent* associada a *EM de tipo 4b* e a reestenose associada a *EM de tipo 4c*, sendo que ambos têm de cumprir os critérios de EM de tipo 1.

A demonstração *post-mortem* de um trombo relacionado com um procedimento cumpre os critérios do *EM de tipo 4a* ou ao *EM de tipo 4b* se associado a um *stent*.

Critérios para enfarte do miocárdio prévio ou silencioso/não reconhecido

Qualquer um dos seguintes critérios permite o diagnóstico de EM prévio ou silencioso/não reconhecido:

- Ondas Q anormais com ou sem sintomas na ausência de causas não isquémicas.
- Evidência imagiológica de perda de miocárdio viável num padrão compatível com etiologia isquémica.
- Achados patológicos e anatómicos de EM prévio.

Figura 8 – Quarta definição universal de enfarte agudo do miocárdio e critérios de diagnóstico, propostos pelas sociedades científicas ESC/ACCF/AHA/WH. CABG: Cirurgia de revascularização do miocárdio, ECG: Eletrocardiograma, EM: Enfarte do miocárdio, ICP: Intervenção coronária percutânea, LSR: Limite superior de referência, TnC: Troponina cardíaca. Adaptado de Thygesen et al., 2018 [49] (<https://spc.pt/web/guest/-/4-definicao-universal-de-enfarte-do-miocardio>, consultado em 12 Maio de 2019)

4.1 Apresentação clínica

Os sintomas dependem da extensão e localização da obstrução e são muito variáveis. Nos sintomas possíveis de isquemia incluem-se várias combinações de desconforto torácico, mandibular, epigástrico ou nos membros superiores (em esforço físico ou em repouso), sensação de queimadura e por vezes, dor lancinante ou sintomas como dispneia ou fadiga. A dor torácica associada ao EAM tem uma duração superior a 20 min e por vezes irradia para o membro superior esquerdo, podendo ser difusa, não localizada, não posicional, e acompanhada de náuseas ou síncope. Contudo, muitos destes sintomas não são específicos de isquemia do miocárdio, e conseqüentemente, podem ser atribuídos a problemas gastrointestinais, neurológicos, pulmonares ou músculo-esqueléticos. O EAM pode ainda manifestar-se com sintomas atípicos tais como palpitações, ou mesmo não apresentar sintomas [3]. Exceto quando o enfarte é extenso, o reconhecimento da magnitude da isquemia pelos sintomas é difícil.

4.2 Eletrocardiograma

Como referido anteriormente, a síndrome coronária aguda (SCA) define uma gama de sintomas clínicos compatíveis com isquemia miocárdica, e que compreende o Enfarte Agudo do Miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI), sem elevação do segmento ST (NSTEMI) e a Angina Instável (AI) (Fig.9) [50] A disfunção elétrica pode surgir em qualquer forma da SCA. As células isquémicas e necróticas perdem a atividade elétrica normal, que se reflete em várias alterações do ECG (predomínio de alterações de ST-T), arritmias e alterações da condução.

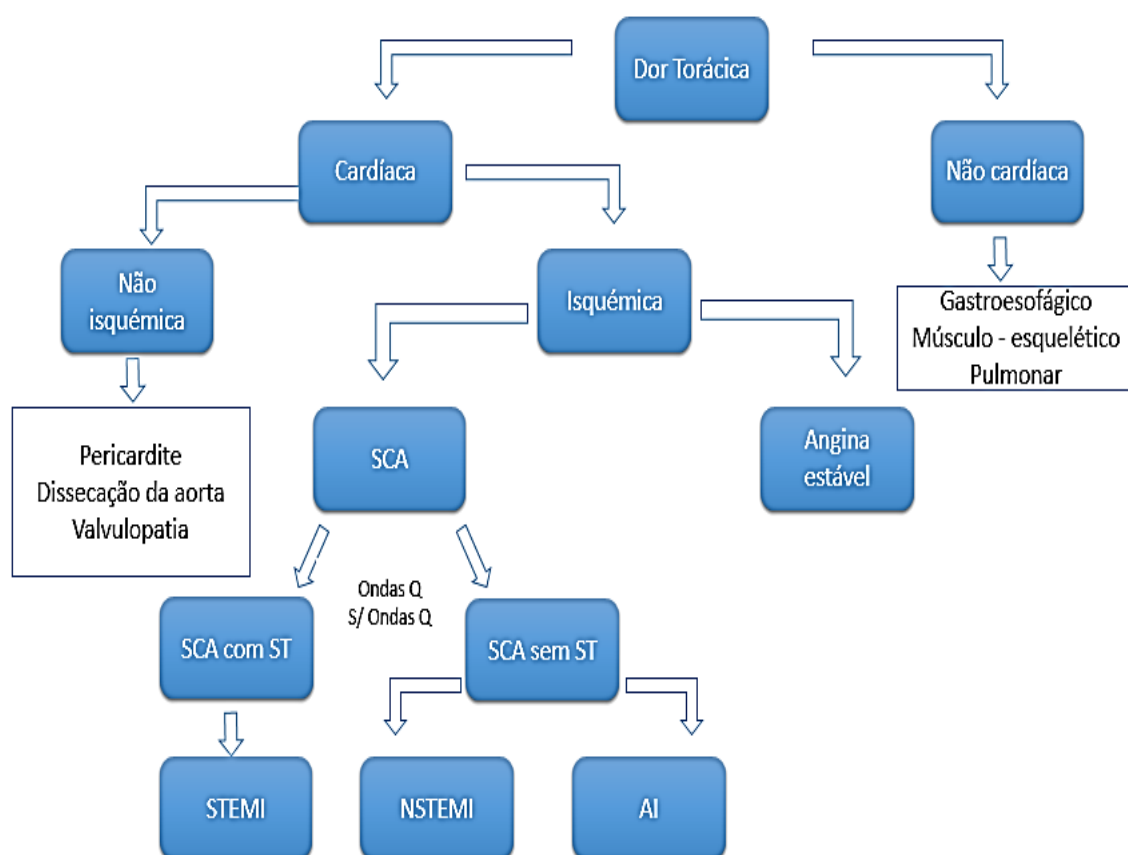


Figura 9 - Diagnóstico diferencial de dor torácica. SCA: Síndrome coronária aguda, STEMI: Enfarte agudo do miocárdio com elevação do segmento ST, NSTEMI: Enfarte agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST, AI: Angina instável

O eletrocardiograma (ECG) é um exame que consiste na avaliação da frequência cardíaca e da atividade elétrica do coração através de elétrodos, constituindo parte integrante do diagnóstico clínico dos doentes com suspeita de EAM. As alterações sugestivas de isquemia miocárdica ou EAM podem estar representadas em três tipos de alterações no ECG: onda Q anormal, onda T invertida e elevação do segmento ST. Alterações no segmento ST mais profundas ou inversão da onda T são normalmente as manifestações mais precoces de isquemia do miocárdio e estão associadas um prognóstico mais desfavorável. As ondas Q estão associadas a enfartes transmuraais que envolvem toda a espessura do miocárdio [3].

A extensão de um EAM é variável, e depende principalmente do grau de oclusão. No atendimento de emergência, a realização do ECG é essencial para avaliar essa extensão, através da distinção de pacientes com ou sem elevação do segmento ST. Pacientes com elevação do segmento ST (STEMI) são caracterizados por uma subida da concentração de biomarcadores de necrose do miocárdio, e pelo progresso da onda Q. Estes devem ser admitidos imediatamente para terapia de reperfusão para assegurar a irrigação do miocárdio [51]. No entanto, o ECG, por si só, é muitas vezes insuficiente para diagnosticar enfarte do miocárdio, pois desvios no segmento ST podem ser observados em outras condições, tais como pericardite aguda, bloqueio do ramo esquerdo ou hipertrofia do ventrículo esquerdo [48].

Pacientes sem elevação do segmento ST (NSTEMI) e a Angina Instável (AI) diferem no grau de intensidade da isquemia, sendo que ambas se devem a uma redução da perfusão miocárdica resultante do estreitamento da artéria coronária causada por um trombo que geralmente não é oclusivo mas sim parcial [52].

No quadro de Angina Instável (AI) os pacientes apresentam dor torácica cardíaca, em repouso, sem aumento de marcadores [53]. No NSTEMI, a isquemia é grave e produz lesão miocárdica, com libertação para a corrente sanguínea dos marcadores bioquímicos de necrose miocárdica (Fig.10) [52].

A utilização de marcadores cardíacos é imprescindível para um rápido diagnóstico de doentes que apresentam desconforto torácico, sendo que as *guidelines* atuais recomendam o doseamento de biomarcadores cardíacos (Troponina) para a diferenciação entre angina instável (AI) e EAM (STEMI, NSTEMI) [51]. A precocidade diagnóstica e a estratificação do risco é fundamental para o sucesso terapêutico, porque quanto mais cedo for efetuado o diagnóstico, mais cedo se institui a terapêutica reduzindo a área de lesão. Nos SCA, o ECG por vezes não apresenta alterações significativas daí a importância da utilização da Troponina (particularmente a de alta sensibilidade) para o diagnóstico (valor preditivo positivo). A utilização da Troponina também contribui para a exclusão de lesão miocárdica perante uma situação de desconforto torácico (valor preditivo negativo) [54].






	LOW ————— Likelihood of myocardial infarction (MI) ————— HIGH				
I. Clinical setting Symptoms and vital signs					 CPR/shock
II. Electrocardiogram (ECG)	Normal ECG	ST depression (mild)	ST depression	ST depression	ST elevation
III. Troponin level at 0h		-	-/+	+	++ ++++
IV. Troponin change (within 1, 2 or 3h)		-	-/+	+	++ If any of the above, consider direct rule-in
Triage decision	Rule-out MI		Observe		Rule-in MI
Differential diagnosis	Noncardiac		Unstable angina	Other cardiac	NSTEMI STEMI

Figura 10 - Procedimento geral de avaliação de pacientes com síndrome coronária aguda, UA: Angina instável; ECG: eletrocardiograma; NSTEMI: Enfarte do miocárdio sem elevação do segmento ST; STEMI: Enfarte do miocárdio com elevação do segmento ST. Retirado de *Twerenbold et al., 2017* [55]

4.3 Biomarcadores cardíacos

O termo biomarcador foi introduzido em 1989 como referente a uma substância biológica mensurável e quantificável usada como indicador de um estado biológico específico [53].

Em 2001, o *Biomarker Definitions Working*, padronizou a definição de biomarcador, como uma característica que é objetivamente doseada e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, ou patogénico e como um indicador a uma resposta farmacológica numa intervenção terapêutica [56].

Desta forma, os biomarcadores desempenham um papel crucial na prática clínica como ferramenta de diagnóstico, prognóstico, estratificação de risco e na orientação do tratamento [53, 56].

Um biomarcador cardíaco, idealmente deve apresentar determinadas características. Altas concentrações de um biomarcador no tecido miocárdio (síntese e libertação pelos miócitos cardíacos) e a sua ausência ou baixa concentração em tecidos não cardíacos, vão determinar a especificidade cardíaca; sendo importante ter em consideração a distribuição tecidual de um potencial marcador em estados patológicos, bem como em condições fisiológicas normais. Por outro lado, a sua não deteção no plasma em indivíduos são ou sob outras condições patológicas vão determinar a sua sensibilidade cardíaca.

A rápida libertação na corrente sanguínea de um biomarcador de lesão miocárdica facilita o diagnóstico precoce de EAM, sendo que o tamanho molecular e a sua localização intracelular influenciam a sua taxa de libertação. Pequenas moléculas são libertadas precocemente em relação a grandes moléculas e moléculas localizadas a nível do citoplasma são libertadas mais rapidamente do que as proteínas estruturais.

Por outro lado, um biomarcador deve apresentar concentrações correlacionadas com o prognóstico, sendo que quanto maior a concentração de marcador libertado, maior a extensão da lesão miocárdica estimando o tamanho ou a gravidade da lesão, e idealmente deve ser capaz de diferenciar entre dano reversível (isquemia) e irreversível (necrose).

Uma outra característica importante é a estabilidade de um biomarcador, fazendo com que este persista em circulação por algumas horas, permitindo um diagnóstico num tempo janela (diagnóstico precoce e tardio de lesão cardíaca) e por outro lado deve possuir uma rápida *clearance* de forma a ser possível a deteção de lesões recorrentes ou de reenfarte.

No desenvolvimento de ensaios, estes devem ser sensíveis, específicos, precisos, economicamente viáveis e de rápido doseamento fazendo com que o prazo de resposta seja inferior a 1 hora entre a recolha de sangue e a comunicação dos resultados [57, 58].

5. Biomarcadores no Enfarte Agudo do Miocárdio

5.1 Evolução histórica

Os marcadores serológicos são utilizados há já vários anos como auxiliares no diagnóstico e tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares, sendo que nos últimos sessenta anos, o uso de marcadores bioquímicos no diagnóstico de EAM mudou consideravelmente. Na atualidade existem vários marcadores emergentes que embora sem uso na prática corrente pretendem contribuir para a avaliação da inflamação, destabilização da placa, isquemia, necrose e disfunção cardíaca.

Numa perspectiva histórica, de todos os marcadores que inicialmente se utilizavam para diagnóstico de EAM, e que se baseavam na determinação da atividade enzimática, apenas a Isoforma MB da Creatina cínase tem aplicação clínica atualmente.

Em 1954, a atividade da AST (Aspartato aminotransferase) foi reportada como o primeiro marcador bioquímico para diagnóstico de EAM [59]. A AST é uma enzima responsável por catalisar a interconversão reversível dos grupos amina do glutamato para o oxaloacetato, formando α -cetoglutarato e aspartato. Esta reação envolvida na síntese e degradação de aminoácidos é responsável pelo fornecimento de energia celular [60]. A atividade desta enzima aumenta no sangue 3 - 4 horas após o EAM, atingindo um valor máximo em 15 - 28 horas, e retorna para valores normais cerca de 5 dias após o evento [61]. No entanto, a AST é um biomarcador não específico do tecido cardíaco, porque é expressa também no músculo-esquelético, cérebro, rim, fígado e eritrócitos. Assim sendo, a sua atividade também se encontra elevada em várias outras condições como, lesões hepáticas, músculo-esqueléticas, rim e pâncreas e outras patologias como miocardite, pericardite, taquiarritmias, embolia pulmonar e infecções [60, 62].

Posteriormente, foi observado um aumento na atividade de LDH (Desidrogenase láctica) no soro de pacientes com EAM [63]. A LDH é uma enzima que possui a função de catalisar a oxidação do lactato a piruvato com interconversão concomitante de NADH e NAD (por transferência de iões H^+). É, constituída por quatro cadeias polipeptídicas (tetrâmero) de dois tipos: M (Músculo) e H (de "Heart", coração). A partir desses dois tipos de polipeptídeos formam-se 5 isoformas: [54, 60]. Através da eletroforese, verificou-

se que a isoenzima 1 (LDH-1) possuía uma maior cardioespecificidade em relação á atividade total, tendo sido descrita como biomarcador de EAM [64]. A atividade de LDH aumenta no sangue 5 - 10 horas após o EAM, atingindo o valor máximo em 60 - 144 horas, e retorna aos valores normais 12 dias após o evento [61]. Contudo, a LDH carece de especificidade cardíaca, pois também está presente no citoplasma de células renais, hepáticas, eritrócitos, e músculo-esquelético. Esta enzima encontra-se elevada em casos de EAM, bem como em lesões pancreáticas, hepáticas, renais, musculares, neoplasias e inflamações [54, 62].

A enzima Creatina cínase (CK) foi sugerida como um potencial biomarcador de lesão do músculo cardíaco [65]. É uma enzima citosólica responsável por catalisar a reação de conversão da creatina fosfato em creatina nos tecidos musculares, através da transferência do fosfato para a adenosina difosfato (ADP), levando á produção adenosina trifosfato (ATP) [60]. Esta enzima está presente no sangue 3 - 9 horas após um EAM, atingindo o valor máximo em 10 - 20 horas e retorna aos valores normais aproximadamente 72 horas após o evento [61]. Para além do músculo cardíaco, está distribuída por vários tecidos, nomeadamente no músculo-esquelético e cérebro e em quantidades menores no intestino e pulmões. Desta forma, um aumento na CK total sérica carece de especificidade para a lesão cardíaca [66]. Nos anos 70 através da técnica de eletroforese foi possível o fracionamento das isoenzimas. A CK é constituída por duas subunidades (B ou M), que são separadas em três isoformas : CK-BB, expressa predominantemente no cérebro; CK-MM, encontrada predominantemente no músculo-esquelético e cardíaco e a CK-MB, presente numa maior concentração nos miócitos cardíacos, oferecendo uma melhor sensibilidade e especificidade para detetar necrose miocárdica, em comparação com a CK total [54, 65].

No início dos anos 90 o desenvolvimento de imunoensaios, e o avanço técnico em automação, permitiu o doseamento de CK-MB massa em vez de CK-MB atividade, e o doseamento de proteínas como a Mioglobina e a Troponina T (cTnT) e I (cTnI). Atualmente, a Troponina é considerada o marcador bioquímico com maior sensibilidade e especificidade de necrose miocárdica, para diagnóstico de EAM segundo as *guidelines* internacionais ESC/ACC [47].

5.2 Biomarcadores atuais

5.2.1 Mioglobina

Foi no ano de 1975 que surgiu o primeiro relato sobre a associação entre a Mioglobinemia e EAM [67]; sendo a Mioglobina a primeira proteína não enzimática utilizada na detecção precoce do EAM. A Mioglobina é uma proteína, de localização citoplasmática, que contém o grupo heme, cuja função é realizar o transporte de oxigênio no músculo esquelético e cardíaco [68], não tendo, por isso, especificidade cardíaca [69]. Aquando da necrose miocárdica é libertada mais rapidamente, em comparação com a CK-MB e a Troponina, podendo ser detetada 2 - 4 horas após o episódio de necrose. A Mioglobina circulante atinge um pico sérico entre as 6 - 12 horas e os níveis regressam à normalidade nas primeiras 24 - 36 horas devido a uma rápida depuração renal [4]. Deste modo, pelo facto de esta proteína ser eliminada pelo rim, alterações da função renal também podem originar aumentos dos níveis de Mioglobina, estando também elevada em situações clínicas que envolvam o músculo-esquelético, como traumatismos, choque grave ou mesmo exercício físico intenso [70].

A Mioglobina tem uma sensibilidade diagnóstica para EAM de 56% no momento de admissão e atinge 100%, 2 horas após o evento [71]. Apesar da Mioglobina ter sido considerada por muito tempo como melhor marcador para excluir EAM, o seu valor preditivo negativo (VPN) atinge apenas 89% entre 3 a 6 horas após o início dos sintomas [72]. No entanto a combinação dos doseamentos de Mioglobina e de CK-MB, demonstrou ser um preditor precoce para diagnóstico de EAM atingindo um valor preditivo negativo de 100% em 4 horas após a apresentação [73].

A alta sensibilidade diagnóstica ainda é relatada como a principal vantagem na utilização da Mioglobina [52], mas devido á sua baixa especificidade, o seu valor tem de ser complementado por um marcador cardíaco mais específico, como CK-MB ou Troponina [74] para um rápido diagnóstico de EAM; principalmente em pacientes com dor torácica atípica ou alterações eletrocardiográficas inespecíficas [4].

A sensibilidade da Mioglobina para o diagnóstico precoce de EAM começa a ser questionável devido á introdução dos testes de Troponina de alta sensibilidade (hs-cTn). No entanto, estudos recentes descrevem que a combinação de Mioglobina com hs-cTn não apresenta melhoria no desempenho diagnóstico [75, 76].

5.2.2 CK - MB

Durante um longo período, a CK-MB foi o marcador mais usado para lesão cardíaca, no diagnóstico de EAM [77].

Como já referido, para além do doseamento da atividade foram desenvolvidas técnicas específicas para a determinação quantitativa de CK-MB por meio de anticorpos monoclonais altamente sensíveis num ensaio posteriormente chamado CK-MB massa [78]. O teste de CK-MB massa deteta a concentração, independentemente da atividade, o que torna o CK-MB massa mais confiável que o doseamento da CK-MB atividade. Desta maneira, o CK-MB massa apresenta melhor sensibilidade analítica, pois deteta enzimas ativas e inativas.

Como já referido, o aumento de CK-MB na circulação sanguínea geralmente começa 4 - 9 horas após o início do enfarte, atingindo um pico de concentração entre 10 - 20 horas, retornando a níveis normais após 72 horas [4]. Apresenta uma sensibilidade diagnóstica de 50% três horas após o início dos sintomas, atingindo os 80% em seis horas de evolução. A CK-MB é libertada na corrente sanguínea mais lentamente do que a Mioglobina. No entanto, é mais específica pois é encontrada em menor proporção nas células musculares esqueléticas do que nas células cardíacas [79].

A desvantagem na utilização deste biomarcador são os resultados falso positivos que podem ocorrer na presença de uma lesão muscular esquelética ou de outras patologias como, trauma, procedimentos cirúrgicos, injeções intramusculares, convulsões, intoxicação alcoólica, insuficiência renal e embolia pulmonar [80].

A National Academy of Clinical Biochemists (NACB) e a European Society of Cardiology (ESC) / American College of Cardiology Foundation (ACCF) recomendam o uso de CK-MB como marcador precoce de dano miocárdico [47, 81]. A sua utilização na prática clínica, possui uma grande vantagem devido á sua eliminação precoce, o que ajuda na deteção de reenfarte [82, 83].

A limitação de especificidade da CK-MB em casos de lesão muscular e a sua baixa sensibilidade nas primeiras horas de evolução, levou à procura de novos marcadores para diagnóstico de lesão miocárdica. Em 1989 foi desenvolvido um método sensível para doseamento de Troponina [84].

5.2.3 Troponina

A Troponina (cTn) substituiu o CK-MB como o biomarcador de referência para o diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio, sendo designada atualmente como *Gold standard* para diagnóstico de necrose miocárdica; globalmente aceite pelas ESC/AHA [47]. A Troponina é uma proteína reguladora que controla a interação Ca^{2+} -dependente entre os filamentos de actina e miosina, no processo de contração muscular. Há três polipeptídeos de Troponina codificados por diferentes genes [85] e que se ligam à Troponomiosina (cTnT); Actina (cTnI) e Cálcio (cTnC).

A Troponina T (cTnT) e a Troponina I (cTnI) foram descritas como biomarcadores para EAM devido à sua elevada especificidade cardíaca, e a sua deteção na corrente sanguínea é altamente específica para dano cardíaco; uma vez que 92 - 95% da Troponina se encontra anexada aos filamentos finos de actina no sarcómero cardíaco, e os restantes 5 -8% se encontram na forma livre no citoplasma do cardiomiócito [86].

Perante um EAM, ocorre a libertação de uma pequena quantidade de Troponina nas primeiras 4 - 6 horas, que provém do reservatório citosólico (4-10%), atingindo um pico de concentração entre as 48 - 72 horas, correspondendo à libertação de Troponina do reservatório estrutural, proveniente da destruição das miofibrilas, aquando da necrose. Isso permite a possibilidade de monitorização do progresso do enfarte em função do tempo. Seguidamente observa-se uma fase caracterizada pela presença de valores elevados de Troponina, com evolução decrescente, que pode persistir entre 5 - 10 dias na circulação sanguínea (Fig.11) [61, 87].

Os genes que codificam as isoformas cardíaca e esquelética da cTnC são idênticos, não existindo nenhuma diferenciação estrutural entre elas, estando distribuída somente nos músculos de contração lenta pelo que o seu valor no diagnóstico não tem interesse para lesões miocárdicas [88].

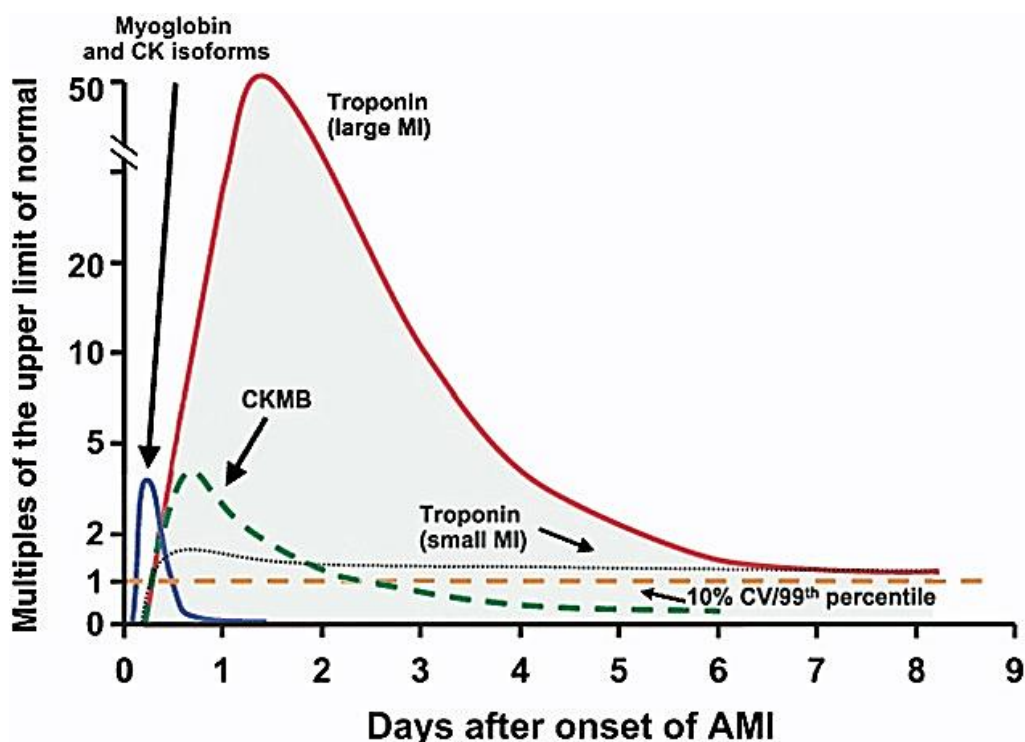


Figura 11 - Evolução temporal dos marcadores de necrose miocárdica após enfarte agudo do miocárdio. Retirado de *Anderson et al.*, 2007 [52]

O diagnóstico de enfarte do miocárdio requer a detecção de uma subida e/ou descida dos valores do biomarcador cardíaco com, pelo menos, um valor acima do percentil 99 do limite superior de referência (URL) e, pelo menos, com um dos seguintes pontos [3]:

- Sintomas de isquemia
- Alterações significativas novas ou presumivelmente novas do segmento ST/onda T (ST-T) ou novo bloqueio completo do ramo esquerdo (BCRE)
- Aparecimento de ondas Q patológicas no ECG
- Evidência imagiológica de nova perda de miocárdio viável ou nova anomalia na motilidade segmentar
- Identificação de um trombo intracoronário por angiografia ou autópsia

Sendo que os ensaios da cTn devem ser doseados com um coeficiente de variação (CV) de 10% ou menos [81]. A cinética de liberação da Troponina permite o aumento da sensibilidade com o tempo. Daubert *et al.* [89] demonstraram que, utilizando ensaios convencionais, a sensibilidade de cTnT no momento da admissão no serviço de urgência varia entre 25 - 65%, aumentando para 59-90% num intervalo de tempo entre 2 - 6 horas

aproximando-se de 100% entre 6 -12 horas após o início dos sintomas. A sensibilidade de cTnl na admissão é inferior a 45%. No entanto aumenta para 69 - 82% quando doseada 2 - 6 horas mais tarde; e, à semelhança de cTnT, atinge 100% de sensibilidade entre 6 - 12 horas após a admissão.

A sensibilidade máxima de ensaios padrão de Troponina não é alcançado até no mínimo de 6 horas após o início da necrose miocárdica. A especificidade da Troponina, não varia significativamente ao longo do tempo, estando situada no intervalo entre 83-98% para cTnl e entre 86-98% para cTnT. Os valores preditivos positivos da cTnl e cTnT foram respetivamente 25% e 35% no momento da apresentação e 89% e 57%, 12 horas após a admissão. Já os valores preditivos negativos da cTnl e cTnT foram respetivamente, 85% e 88% no momento da apresentação e 98% e 99% 12 horas após.

De acordo com o descrito na quarta definição universal para EAM, as amostras de sangue para a medição da cTn devem ser colhidas na primeira avaliação (designada como 0 h) e repetidas 3-6 horas mais tarde, de modo a otimizar a sensibilidade clínica e especificidade para diagnóstico de EAM [49].

A Troponina é incapaz de detetar isquemia miocárdica na ausência de necrose e, portanto, incapaz de produzir um diagnóstico precoce [53]. Além disso, elevações de Troponina indicam a presença, mas não o mecanismo de lesão ou de dano miocárdico, que pode ocorrer através de vários mecanismos como: Isquemia por diminuição do fornecimento do oxigénio em casos de choque séptico, hipotensão, hipovolémia e taquiarritmias; Isquemia causada por vasoespasmos com consequente aumento de produção de catecolaminas que causam efeito nocivo nos cardiomiócitos; lesão direta nos cardiomiócitos em situações inflamatórias com pericardite e miocardite, estimulação elétrica excessiva e uso de quimioterapia cardiotoxicas; bem como casos de insuficiência cardíaca congestiva, embolia pulmonar, hipertensão, prática de exercício vigoroso e a insuficiência renal crónica. Neste contexto também é importante distinguir entre causas agudas de elevação de Troponina que requerem subida e descida dos valores e elevações crónicas que normalmente não sofrem alterações significativas [77]. Alterações nos valores ou deltas da cTn podem ser usadas para definir eventos agudos em comparação com eventos crónicos, sendo que os critérios para determinar um aumento patológico entre dois valores seriados de cTn são dependentes do ensaio e continuam em constante evolução. Uma visão idealizada da cinética da Troponina em pacientes com enfarte agudo do miocárdio é demonstrada na Figura 12.

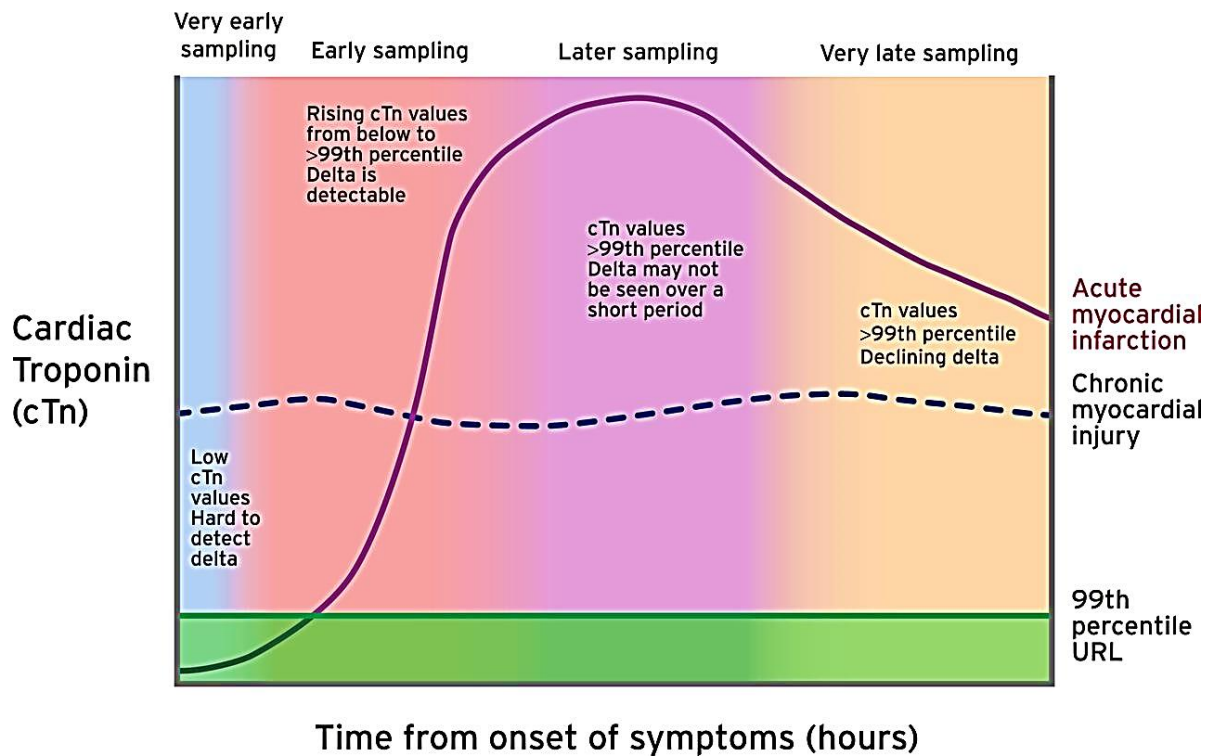


Figura 12 - Ilustração da cinética da Troponina em pacientes após lesão miocárdica, incluindo enfarte agudo do miocárdio. cTn = troponina cardíaca; URL = limite de referência superior. Retirado de *Thygesen et al, 2019* [49]

5.2.3.1 Troponina de alta sensibilidade

As primeiras horas após o início dos sintomas de enfarte do miocárdio são cruciais, pela possibilidade de uma intervenção terapêutica precoce para um melhor prognóstico. Esta necessidade de diagnosticar enfarte do miocárdio nas primeiras 4 horas após o início dos sintomas, levou à expansão dos testes de doseamento de Troponina de alta sensibilidade (hs-cTn); podendo ser detetada em concentrações mínimas.

Em 2011, a ESC incluiu o uso de Troponina de alta sensibilidade nas suas recomendações para avaliar pacientes com suspeita de SCA. Estes ensaios de hs-cTn são mais sensíveis do que os ensaios convencionais de tal forma que, presentemente, é possível detetar níveis aproximadamente 10 – 100 vezes mais baixos do que com os ensaios convencionais.

Para ser considerado um ensaio de hs-cTn, a *task force* do IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) sugeriu que a Troponina deve ser detetável em mais de 50% de indivíduos saudáveis e preferencialmente em mais de 95% com CV igual ou inferior a 10% no percentil 99 de uma população de referência saudável [90]. Contudo, devido à capacidade de detecção de limites cada vez mais baixos, os investigadores e clínicos deparam-se, com o problema da variabilidade inter e intra individual [91]. Assim sendo, indivíduos previamente referidos como saudáveis por apresentarem valores normais de Troponina através da utilização de testes convencionais, poderão ser agora considerados doentes ou portadores de hs-cTn detetável.

A Troponina pode ser libertada após dano irreversível no miocárdio, via uma variedade de mecanismos isquémicos e não isquémicos. Desse modo, uma elevação da concentração de Troponina não é sinónimo de EAM. A maioria dessas elevações inesperadas de hs-cTn são “verdadeiras positivas” para lesão miocárdica, refletindo doença cardíaca previamente não detetada ou subestimada, que se traduz em aumentos crónicos de Troponina que podem ou não exibir mudanças de curto prazo [55, 92]. A interpretação dos resultados do teste de Troponina de alta sensibilidade é particularmente relevante o contexto clínico, devendo ser exploradas as causas da elevação de Troponina, que podem estar relacionadas ou não com a patologia de SCA.

Quanto maior a sensibilidade, maior a capacidade de detetar pequenas quantidades de necrose miocárdica. No entanto, não é uma garantia de maior precisão, porque as maiores sensibilidades ocorrem geralmente à custa de baixas especificidades; levando ainda à necessidade de medições seriadas, melhorando consideravelmente o grau de especificidade do teste. A vantagem clínica na utilização de ensaios hs-cTn resulta da sua capacidade de dosear com precisão níveis de Troponina mais baixos do que os testes da geração anterior, proporcionando uma maior sensibilidade à detecção de EAM na apresentação, o que significa que o intervalo de tempo até à segunda medição pode ser significativamente encurtado, reduzindo desta forma, o tempo para o diagnóstico e melhorando a eficiência na exclusão ou admissão no serviço de urgência.

De acordo com as *guidelines* publicadas pela ESC em 2012, um protocolo de descarte em 3 horas pode ser utilizado no diagnóstico precoce de EAM (Fig.13) [93].

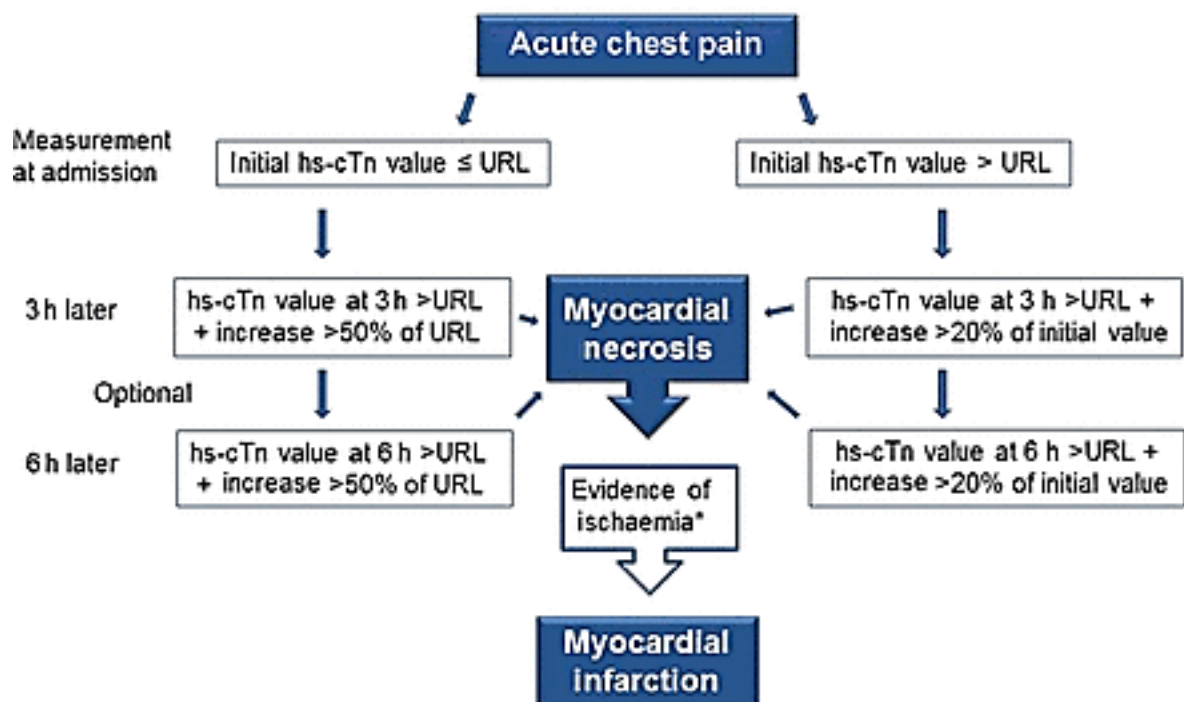


Figura 13 - Esquema modelo para rápida abordagem no diagnóstico de enfarte do miocárdio utilizando os testes de Troponina de alta sensibilidade. Deve ter-se em conta que o algoritmo estabelecido pode variar de acordo com o teste escolhido.URL: limite de referência superior; hs-troponin: Troponina alta sensibilidade (Adaptado de *Thygesen et al, 2012*) [93]

Este algoritmo padrão de 3 horas é baseado no percentil 99, em que é condição necessária o aumento de $\geq 20\%$, se a concentração de hs-cTn estiver acima do percentil 99 no início da apresentação e 3 horas após. Se a concentração inicial for igual ou inferior ao percentil 99 na linha de base e acima do percentil 99 três horas após a apresentação; é uma condição necessária um aumento $\geq 50\%$ juntamente com sintomas sugestivos de isquemia miocárdica ou alterações do ECG para diagnóstico de EAM. Uma nova colheita de sangue é recomendável 6 horas após a apresentação, em doentes com fortes suspeitas de EAM mas sem aumento significativo de hs-cTn após 3 horas.

Com base nas *guidelines* de 2012, as mais recentes de 2015 [50] recomendam a aplicação do algoritmo 0/3 horas, que deve ser usado juntamente com o SCORE GRACE - Global Registry of Acute Coronary (Figura 14). Em casos de alta probabilidade para NSTEMI e se o início da dor torácica for superior a 3 horas, é recomendado a utilização do algoritmo de 0/1h quando ensaios de Troponina de alta sensibilidade com um algoritmo validado se encontram disponíveis (Elecsys, Architect, Dimension Vista). As *guidelines* referem que os níveis de corte dentro do algoritmo 0/1 hora são específicos do ensaio, utilizando as informações quantitativas contínuas dos ensaios de hs-cTn e o

conceito de que a probabilidade de EAM aumenta com o aumento dos valores de hs-cTn [55, 86]. O algoritmo 0/3 h sugere exclusão para NSTEMI se as concentrações de hs-cTn permanecerem em valores normais (abaixo do percentil 99) na amostra de sangue na apresentação e 3 horas após a apresentação, e se o paciente preencher dois requisitos adicionais: não houver sintoma de dor torácica e se obter um SCORE GRACE abaixo de 140.

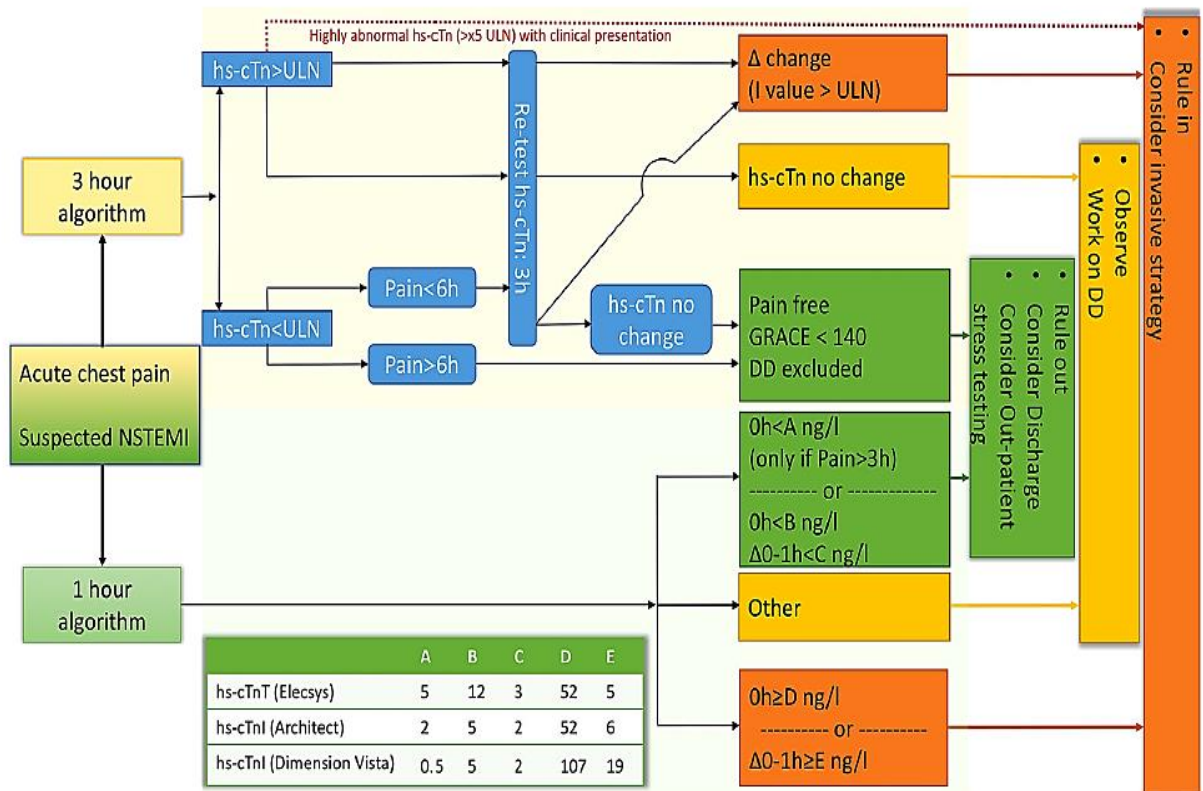


Figura 14 – Regra de algoritmo de descarte 0/ 3h e 0/ 1h proposto pela Sociedade Europeia de Cardiologia em doentes com suspeita de síndrome coronária aguda sem elevação do segmento ST usando testes de Troponina de alta sensibilidade. Uma alteração Δ , dependente do ensaio. Valor altamente anormal hs-cTn define-se como valor acima 5 vezes do limite superior de referência. GRACE = Registro Global de Eventos Coronários Agudos; ULN = limite superior do normal. Retirado de *Garg et al., 2017* [86]

Para além do seu papel no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio, a Troponina de alta sensibilidade surge como um biomarcador no prognóstico e avaliação do risco cardiovascular. Resultados de estudos recentes sobre o uso de hs-cTn na identificação do risco de DCV demonstram que a hs-cTn poderá ser considerada como um marcador de lesão miocárdica aguda e como um marcador que deteta lesão subclínica. Isso enfatiza o seu potencial valor na prevenção primária de doenças cardiovasculares, sendo

que indivíduos com Troponina detetável podem beneficiar de terapias preventivas (modificação do estilo de vida, terapia com beta-bloqueadores, inibidores da ECA, estatinas) de modo a diminuir o risco de doença. Assim sendo, a utilização do doseamento de Troponina de alta sensibilidade para além de marcador de lesão miocárdica aguda, poderá também ser muito útil na estratificação de risco (Fig.15) [94].

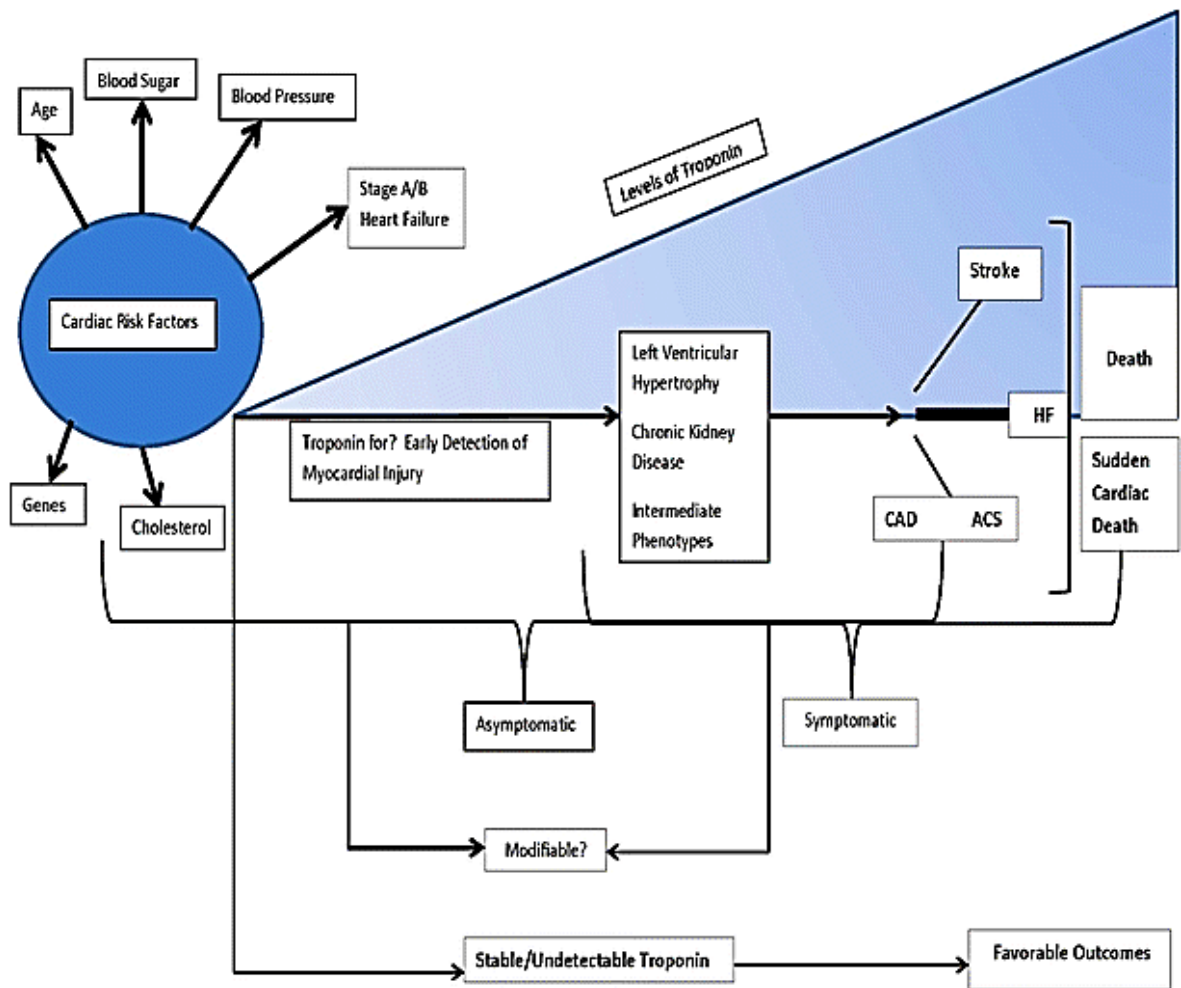


Figura 15 - Troponina de alta sensibilidade na doença cardiovascular: um novo paradigma na sua deteção, desde o início da doença até à sua manifestação. Retirado de Hoff et al.,2016 [94]

6. Novos biomarcadores

Nas últimas décadas, os biomarcadores de lesão miocárdica Troponina, e CK-MB, têm sido extremamente valiosos na decisão clínica em pacientes com suspeita de SCA e particularmente no diagnóstico de EAM. No entanto, novos biomarcadores capazes de refletir estágios iniciais de inflamação e de isquemia que antecedem o EAM têm especial interesse, uma vez que um diagnóstico precoce é fundamental de forma a ser iniciado um tratamento eficaz para um melhor prognóstico. Neste contexto, os novos biomarcadores que refletem diferentes aspectos fisiopatológicos do EAM podem estar associados à inflamação, destabilização da placa, isquemia, necrose, disfunção cardíaca, stress cardíaco e expressão génica, estando agrupados segundo os seus significados clínicos.

6.1 Marcadores de Isquemia

A isquemia do miocárdio é uma condição que resulta do fluxo inadequado de sangue com consequente redução do aporte de oxigénio e da capacidade de eliminação dos produtos do metabolismo. A hipoxia faz com que os cardiomiócitos recorram ao metabolismo anaeróbio, com consequente acidose, depleção das reservas de fosfatos de alta energia e comprometimento da função contrátil e elétrica do coração. A adenosina trifosfato (ATP) é degradada a adenosina que se difunde, causando dilatação arterial e dor angular. Além disso, os produtos de reperfusão da isquemia produzem ROS que ao reagirem com lípidos e proteínas também contribuem para a disfunção do miocárdio.

Albumina modificada pela isquemia

A Albumina modificada por isquemia (IMA) ao contrário do que acontece com outros biomarcadores, não é uma proteína libertada pelo tecido miocárdico. A Albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e é produzida no fígado. Esta proteína tem como funções principais a manutenção da pressão osmótica do fluido intravascular e o transporte de várias substâncias como a bilirrubina, ácidos gordos, cálcio, magnésio, cobre, cobalto e níquel. O local de ligação dos metais de transição à Albumina situa-se na sua extremidade N-terminal.

A ocorrência de um episódio isquêmico tem como consequência a alteração conformacional da região N-terminal – Albumina modificada por isquemia (IMA). Desta forma, a Albumina perde a capacidade de se ligar aos metais de transição em poucos minutos, retornando a valores normais seis horas após o evento isquêmico, o que permite detectar a isquemia antes do desenvolvimento de necrose miocárdica (Fig.16) [95].

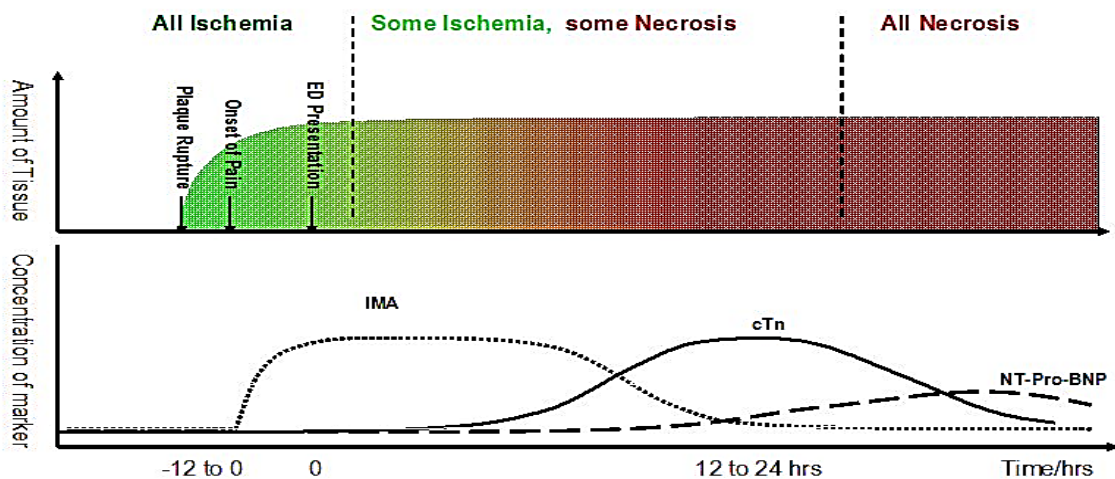


Figura 16 - Cinética de liberação da Albumina modificada por isquemia e outros marcadores cardíacos, Troponina cardíaca e Peptídeo Natriurético. Retirado de Gaze,2012 [96]

Esta suscetibilidade da região N-terminal resulta de um conjunto de alterações bioquímicas inerentes ao processo isquêmico e hipoxia, que levam à acidose, liberação de íons ferro e cobre, alterações da bomba Na^+/K^+ , formação de ROS e produtos de peroxidação lipídica e proteica (Fig.17) [95, 96].

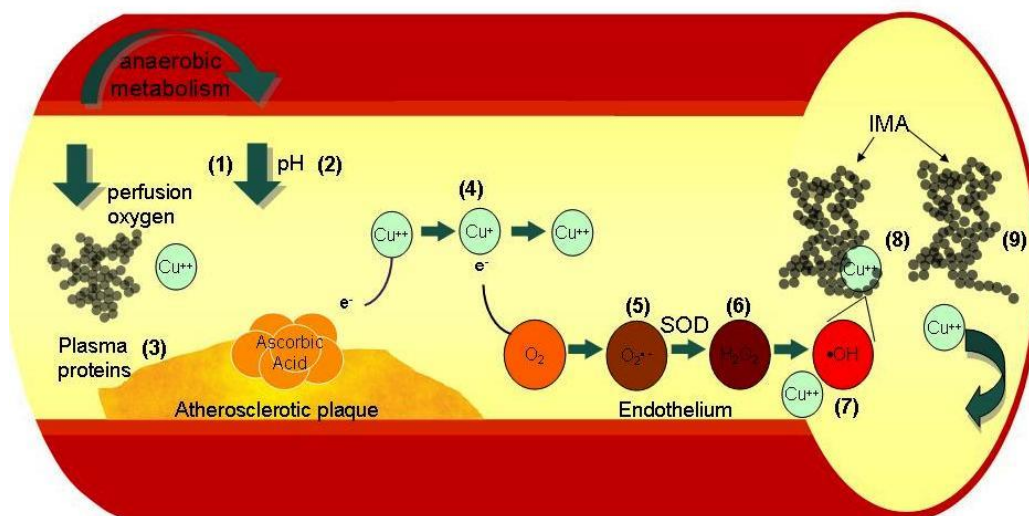


Figura 17 - Mecanismo de formação da Albumina modificada por isquemia. (1) Redução do fluxo sanguíneo origina hipoxia e redução de ATP (2) Diminuição do pH (3) Cobre (Cu^{++}) é libertado das proteínas plasmáticas (4) Na presença de ácido ascórbico o Cu^{++} é convertido a Cu^+ (5) Cu^+ reage com O_2 para formar O_2^- (5) A superóxido dismutase (SOD) transforma o O_2^- (6) originando H_2O_2 (7) H_2O_2 na presença de Cu^{++} ou Fe^+ , forma radicais hidroxila OH (8) A presença de OH provoca uma alteração conformacional da região N-terminal da albumina (9) com conseqüente incapacidade de ligação ao Cu^{++} . Retirado de Gaze,2012 [96]

O decréscimo da capacidade de ligação da Albumina aos metais de transição pode ser medido através da adição de uma quantidade específica de cobalto ao soro do paciente, seguida por uma avaliação colorimétrica que determina a quantidade de cobalto livre, sendo a Albumina modificada doseada indiretamente [95]. Esta é a base do teste da Albumina ligada ao cobalto (teste ACB®) para a IMA na avaliação da isquemia do miocárdio. No entanto, os níveis de IMA podem aumentar em outras situações não associadas à isquemia cardíaca, como em qualquer distúrbio que possa causar isquemia noutros tecidos como a nível gastrointestinal ou músculo-esquelético. Outro fator que pode afetar o resultado do teste ACB® é uma situação de hipoalbuminémia grave, em pacientes desnutridos, na doença hepática (diminuição da capacidade do hepatócito de produzir Albumina), ou em processos inflamatórios (libertação de Albumina no líquido intersticial) [95].

Vários estudos clínicos têm sido realizados, com o objetivo de avaliar a utilidade da IMA, através do teste ACB®, no diagnóstico da SCA.

Um estudo que envolveu 224 pacientes admitidos no serviço de urgência hospitalar com sintomas sugestivos de SCA inferior a 3 horas, testou a capacidade do teste ACB® em prever um resultado de Troponina I (cTnI) positivo ou negativo num intervalo de 6 a 24 horas após a apresentação. Neste estudo, o teste demonstrou uma sensibilidade e

especificidade de 83% e 69% respectivamente, com um valor preditivo negativo de 96% e um valor preditivo positivo de 33% utilizando um ponto de corte de 75 U/mL [97].

Uma metanálise que inclui o estudo de 1800 pacientes com suspeita de isquemia miocárdica, mostrou que a combinação de ECG, Troponina e IMA obteve uma sensibilidade diagnóstica de 94,4% e 97,1% de valor preditivo negativo para exclusão de SCA [98].

Noutro estudo, os resultados do ensaio ACB® foram correlacionáveis com o diagnóstico de pacientes com e sem isquemia miocárdica. O diagnóstico de isquemia miocárdica, com ou sem EAM, foi baseado em sintomas clínicos, imagem cardíaca, ECG e marcadores bioquímicos como CK-MB e cTnI. O teste ACB® obteve uma sensibilidade e especificidade para isquemia miocárdica de 88% e 94% respectivamente, e os valores preditivo positivo e negativo foram de 92% e 91% respectivamente. No entanto, o teste ACB® foi um fraco discriminador entre pacientes isquêmicos com e sem EAM [99].

Num estudo conduzido por Sinha et al. [100] foram correlacionados resultados de IMA, ECG e cTnT, isolados e em combinação, com o diagnóstico de dor torácica não isquêmica, Angina Instável e Enfarte Agudo do Miocárdio com ou sem elevação do segmento ST. Valores de IMA >85 U/ml foram considerados positivos para isquemia cardíaca. A Albumina modificada por isquemia medida pelo teste ACB® foi proposta como um novo marcador sensível para isquemia cardíaca, tendo potencial para se tornar uma ferramenta de triagem em combinação com ECG e cTn, demonstrando 95% de sensibilidade para o diagnóstico de SCA com um valor preditivo negativo de 84%.

Um estudo conduzido por Gurumurthy et al. [101] avaliou os níveis séricos médios de IMA em pacientes STEMI ($92,1 \pm 10,6$), NSTEMI ($87,3 \pm 5,95$) e AI ($88,9 \pm 6,16$), pacientes com dor torácica não cardíaca ($77,9 \pm 6,69$) e também em indivíduos saudáveis ($54,7 \pm 17,2$) em comparação com marcadores cTnI e CK-MB. Neste estudo, o IMA obteve uma sensibilidade de diagnóstica superior (88%) em relação aos marcadores de cTnI (52%) e CK-MB (56%) no diagnóstico precoce de SCA.

A utilização de marcadores CK-MB e cTnI para o diagnóstico de necrose cardíaca, é limitado para a exclusão de isquemia, uma vez que um resultado inicialmente negativo no início dos sintomas não exclui a presença de isquemia miocárdica. Desta forma, a utilização de um marcador de isquemia miocárdica altamente sensível e rapidamente detetável seria o ideal para identificar pacientes com um quadro de isquemia sem evidência de necrose [101]. Os autores descrevem o teste ACB® como tendo uma

elevada sensibilidade e um elevado valor preditivo negativo na deteção precoce de isquemia miocárdica. Desta forma, pacientes com resultados negativos de ECG e de marcadores de necrose e com um resultado IMA positivo podem beneficiar de uma intervenção precoce justificando um exame mais detalhado [102].

Na era de utilização de ensaios de Troponina de alta sensibilidade na identificação de pacientes com EAM, a utilidade clínica de IMA poderia ser posta em causa. O objetivo de um estudo conduzido por Mehta et al. [103] foi avaliar o papel da Troponina T de alta sensibilidade e da IMA no diagnóstico precoce em 75 pacientes admitidos no departamento de urgência com sintomas sugestivos de SCA. Em 45 pacientes diagnosticados com STEMI e NSTEMI verificou-se uma maior sensibilidade (95,6%) e VPN (95,8%) para hs-cTnT e maior especificidade (81,1%) e PPV (74,4%) para IMA. Ao combinar IMA com hs - cTnT, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram 95,7%, 81,1%, 88,6%, e 92,5%, respetivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação dos biomarcadores Albumina modificada por isquemia e Troponina T de alta sensibilidade (Isolados e combinados) em pacientes com enfarte agudo do miocárdio 6 horas após o início dos sintomas

Parameter	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	PLR (%)	NLR (%)	AUC
IMA (U/mL)	91.3	81.1	74.4	93.9	4.83	0.11	0.932
Hs-cTnT (pg/mL)	95.6	61.3	59.7	95.8	2.47	0.07	0.797
IMA+hs-cTnT	95.7	81.1	88.6	92.5	5.06	0.05	0.884

PPV: Valor preditivo positivo, NPV: Valor preditivo negativo, PLR: Razão de verossimilhança positiva, NLR: Razão de verossimilhança negativa, AUC: Área sob a curva ROC, IMA: Albumina modificada por isquemia, Hs-cTnT: Troponina cardíaca T de alta sensibilidade. Retirado de *Mehta et al.* [103]

Uma variedade de condições clínicas que não EAM podem estar associadas a níveis elevados de hs-cTn devido á sua alta sensibilidade analítica e associada ao seu baixo limite de deteção. Nestas circunstâncias, este estudo concluiu que a utilização de um biomarcador cardíaco precoce como IMA permite o aumento da eficácia do diagnóstico para EAM.

A Albumina modificada por isquemia é o único marcador de isquemia aprovado pela FDA [104] sendo um marcador útil na estratificação de risco em doentes que se apresentem no serviço de urgência com sintomas sugestivos de isquemia [98].

6.2 Marcadores de Necrose

A completa necrose das células do miocárdio requer pelo menos 2-4 horas e é dependente da existência ou não de circulação colateral na zona isquêmica, do tipo de oclusão arterial se intermitente ou persistente e da sensibilidade dos miócitos à isquemia. Os ácidos gordos são particularmente importantes para a homeostasia do miocárdio, uma vez que 50-80% da energia é proveniente da oxidação lipídica.

Proteína cardíaca de ligação aos ácidos gordos

Vários estudos relacionados com o metabolismo dos cardiomiócitos sugerem que a proteína cardíaca de ligação aos ácidos gordos (H-FABP) pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico precoce de EAM. Esta proteína (15 KDa) localiza-se no citoplasma, sobretudo, em tecidos com metabolismo ativo de ácidos gordos, incluindo o tecido cardíaco, tecido renal e intestino. A principal função biológica da H-FABP é o transporte intracelular de ácidos gordos de cadeia longa para as mitocôndrias (Fig.18). É indetetável em condições normais (<5 µg/L) mas é libertada pelo miocárdio após vários tipos de lesão, nomeadamente isquemia e necrose [4, 105].

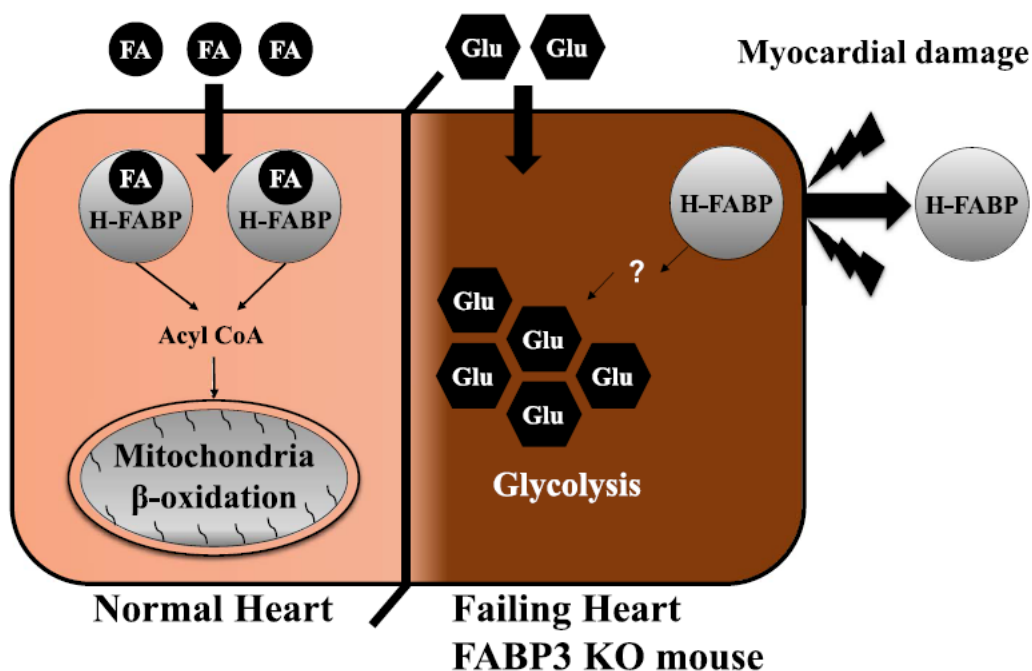


Figura 18 - Papel da H-FABP no coração. FA: Ácidos gordos. Glu: Glicose. H-FABP: proteína de ligação aos ácidos gordos. Retirado de *Otaki et al., 2017* [105]

No EAM, a H-FABP tem um comportamento cinético muito semelhante ao da Mioglobina [54]. Aparece no plasma duas horas após a lesão e atinge um pico de concentração em 3 - 7 horas, retornando aos seus valores normais em 20 horas, o que viabiliza a sua aplicação no diagnóstico precoce (Fig. 19). Apesar de não ser um marcador específico do tecido miocárdico, possui uma razão músculo - esquelético / cardíaco inferior em relação à Mioglobina [61], sendo que a distribuição H-FABP no coração é de 0,57 mg/g, enquanto que a distribuição de mioglobina é de 2,7 mg/g. O tecido esquelético contém H-FABP numa quantidade cerca de 0,04-0,14 mg / g e em relação á Mioglobina entre 2,2-6,7 mg / g; sendo útil na diferenciação de lesão do tecido miocárdio do músculo-esquelético [106]. Estas características fazem com que a H-FABP seja um marcador promissor de lesão miocárdica.

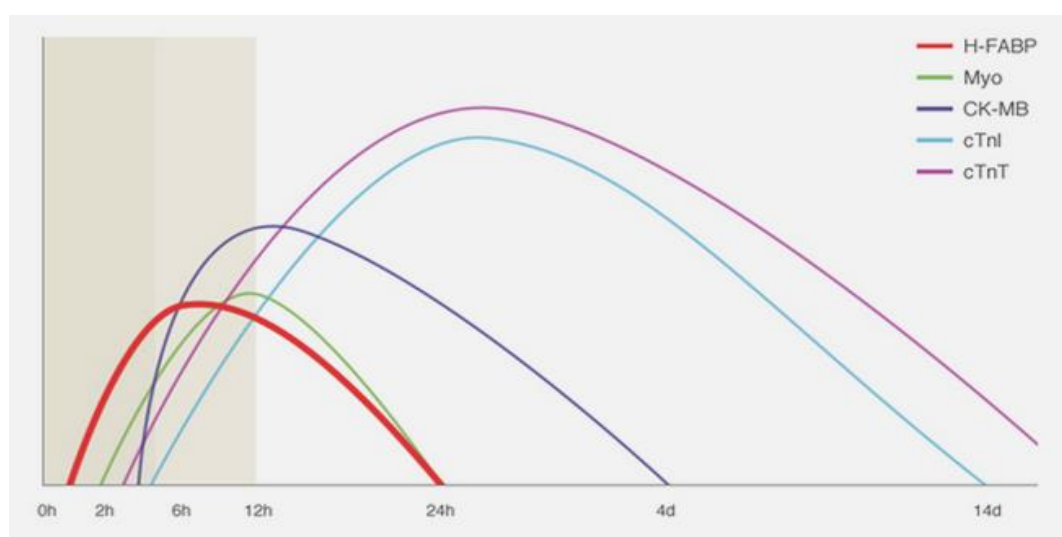


Figura 19 – Cinética de liberação da proteína cardíaca de ligação aos ácidos gordos em relação aos outros biomarcadores de enfarte agudo do miocárdio (<http://www.h-fabp.com/what-is-h-fabp/>, acedido em 12 de Maio de 2019)

Vários estudos documentam o valor do ensaio H-FABP para deteção precoce de EAM. Kabekkodu, *et al.* [107] observaram que, entre os pacientes com EAM que se apresentaram até quatro horas após o início dos sintomas, a sensibilidade da H-FABP foi de 60%, significativamente maior que a da cTnl (18,8%) e da CK-MB (12,5%). No entanto, a sua especificidade foi de apenas 23,53%, tendo sido inferior à da cTnl (66,67%) e da CK-MB (100%). Este estudo demonstrou que a H-FABP é um biomarcador sensível para o diagnóstico de EAM nas primeiras horas após o início dos sintomas,

quando os biomarcadores cardíacos padrão podem não estar elevados, mas é menos específico em comparação com Troponina I e CK-MB. Deste modo, este estudo sugere que a H-FABP pode ser considerada como um biomarcador cardíaco promissor, que pode ser utilizado em conjunto com Troponina e CK-MB para o diagnóstico de EAM.

Um estudo conduzido por Thielmann *et al.* [108] teve como objetivo comparar o comportamento no diagnóstico de enfarte do miocárdio perioperatório (PMI) após cirurgia de revascularização (GABG) dos biomarcadores H-FABP e IMA com a Troponina I (cTnI). Amostras de sangue foram colhidas no período perioperatório e nas primeiras 72 horas após a cirurgia. O PMI foi definido utilizando-se um ponto de corte de cTnI superior a 10,5 ng/mL, ocorrendo dentro de 24 horas após GABG ou novas alterações eletrocardiográficas. No grupo em que foram doseados os marcadores H-FABP e cTnI, os 14 pacientes que sofreram PMI, obtiveram ambos os marcadores significativamente aumentados ao contrário dos restantes pacientes que não sofreram PMI. No entanto a H-FABP demonstrou ser um biomarcador sensível e rápido na detecção de PMI de forma confiável 1 hora após a GABG, contrariamente à cTnI. O valor de diagnóstico do IMA para detecção de PMI foi muito limitado neste cenário não se tendo diferenciado em nenhum momento no pós operatório obtendo-se um baixo valor discriminativo entre os dois grupos (PMI e não PMI).

Vários estudos reportaram que a H-FABP possui maior sensibilidade do que outros biomarcadores (Troponina e CK-MB) na detecção precoce de isquemia miocárdica. No entanto possui menor especificidade, sendo que é necessária a combinação com outros marcadores para confirmar ou excluir EAM [109, 110].

Um total de 56 pacientes foram incluídos num estudo, cujos critérios de inclusão foram os de se apresentarem no serviço de urgência, no espaço de uma hora, após o início dos sintomas de dor no peito com um doseamento de Troponina I convencional (cTnI) negativo no momento de admissão. A cTnI inicialmente indetetável em todos os indivíduos, tornou-se positiva dentro de um período de três horas em 96% dos indivíduos e dentro de seis horas nos restantes 4% dos pacientes com EAM. Ao comparar a positividade de H-FABP e hs-cTnI no momento da apresentação, este estudo verificou uma diferença significativa entre os dois marcadores, uma vez que 6 pacientes foram somente positivos para H-FABP e 1 paciente foi somente positivo para hs-TnI. Em suma, os níveis de H-FABP aumentaram dentro de uma hora a partir do início da dor em 55,5% dos pacientes com EAM sem elevação da cTnI e 21% dos pacientes com EAM sem elevação hs-cTnI na admissão. Este estudo sugere que a H-FABP pode ser considerada

como um marcador de diagnóstico promissor para o EAM no momento da apresentação permitindo uma rápida decisão em pacientes cuja Troponina (tanto convencional como de alta sensibilidade) é inicialmente negativa promovendo um início imediato da terapia [111]. Uma vez que as *guidelines* de 2015 reconhecem que um valor baixo de hs-cTn em pacientes com dor torácica inferior a 3 horas não é suficiente para descartar EAM, a adição do valor incremental H-FABP com a Troponina demonstra ser útil para exclusão de EAM no momento da triagem [112].

No entanto outros autores reconhecem o poder de diagnóstico limitado da H-FABP comparando com hs-cTn no diagnóstico precoce de EAM. Kagawa et al. [113] descreve que para pacientes que se apresentaram 3 horas após o início da dor torácica, a sensibilidade de H-FABP foi de 89% e 100% para a Troponina I de alta sensibilidade. No entanto, a especificidade de H-FABP foi apenas de 19%, enquanto que para a Troponina foi de 79%.

Com base nestas observações, são necessários mais estudos para comprovar a utilidade clínica de H-FABP no diagnóstico precoce de EAM. No ano de 2010, o doseamento da H-FABP foi já aprovado no Japão para o diagnóstico precoce do EAM.

6.3 Marcadores de Inflamação

A SCA é causada, em grande parte, pela rotura de placas ateroscleróticas vulneráveis, com conseqüente trombose. Uma das principais causas da rotura e instabilidade é a inflamação das placas. Pacientes com placas instáveis têm níveis mais elevados de macrófagos e neutrófilos do que doentes com doença arterial coronária estável. Assim, a inflamação desempenha um papel central na aterosclerose, estando correlacionada com a isquemia miocárdica e o evento coronário agudo.

Relação Neutrófilos/ Linfócitos e Mieloperoxidase

A presença de leucocitose tem sido associada a alta mortalidade em pacientes com SCA. No entanto dados recentes demonstram que algumas classes de leucócitos têm maior valor preditivo na avaliação do risco cardiovascular, quando se utiliza a razão Neutrófilos/ Linfócitos (NLR, do inglês *Neutrophil/Lymphocyte ratio*). A principal vantagem dos

índices hematológicos é que estes apresentam custo-efetividade, estando amplamente e facilmente disponíveis na prática clínica diária [114].

Diversas evidências epidemiológicas demonstram o papel preditivo da NLR em manifestações ateroscleróticas [115-117] e utilidade no diagnóstico e prognóstico de doenças cardíacas relacionadas com a inflamação particularmente para EAM. Nalbant et al. concluíram que pacientes com $NLR > 7,4$ estavam mais propensos (2,18 vezes) a sofrer de EAM em comparação com pacientes cujo NLR era $\leq 7,4$ [118].

Um quadro de neutrofilia relativa juntamente com linfopenia, está associado a um aumento de risco cardiovascular [119]. A linfopenia está associada com a progressão da aterosclerose, causada por processos apoptóticos desencadeados durante as lesões ateroscleróticas, bem como com o aumento da produção de cortisol (stress fisiológico presente em condições isquêmicas) o que resulta numa redução da proporção relativa de linfócitos no sangue periférico [116, 120].

Do ponto de vista fisiopatológico, os neutrófilos exacerbam a resposta inflamatória através da secreção de diversos mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas, metabolitos do ácido araquidônico, fatores ativadores de plaquetas [121] e produção da Mieloperoxidase (MPO), estando assim esta metaloproteinase também a emergir como um biomarcador na patogênese de SCA.

Existem evidências de que os níveis plasmáticos de MPO se encontram elevados em pacientes com EAM em relação a pacientes com ou sem DAC (doença da artéria coronária), havendo uma correlação positiva com os níveis Neutrófilos/Linfócitos. Desta forma o aumento de neutrófilos circulatórios promove a libertação de MPO e o desenvolvimento da placa aterosclerótica propícia ao desenvolvimento da patologia de EAM [122].

A Mieloperoxidase tem sido implicada no processo aterosclerótico através de uma série de mecanismos que envolvem a oxidação das LDL, formação de ROS e redução da biodisponibilidade de NO através da sua atividade catalítica, prejudicial às propriedades vasoprotetoras do endotélio [123]. A permanência de um estado inflamatório característico da patologia de SCA, induz a ativação de macrófagos e neutrófilos que secretam metaloproteinases de matriz (MMPs) e MPO, degradando o colagénio e provocando vulnerabilidade da placa propensa á erosão ou rutura [123]. Desta forma, a MPO participa na transformação de placas ateroscleróticas estáveis em lesões instáveis,

surgindo evidências de concentrações mais elevadas de MPO em lesões de pacientes com EAM e AI [124].

Gazi et al [125] avaliaram o valor preditivo da contagem total de leucócitos e NLR em doentes STEMI e o risco cardiovascular. Um total de 522 pacientes foram divididos em tercís com base nos valores de NLR. O grupo pertencente ao terceiro tercíl ($> 5,77$) obteve uma incidência significativamente maior de mortalidade cardiovascular (13,8% vs 4,6%, $P < 0,001$) em relação ao grupo com valores de NLR $< 5,77$. Uma razão NLR $> 5,77$ foi descrita como um preditor independente de mortalidade cardiovascular intra hospitalar em pacientes STEMI.

Um estudo conduzido por Korkmaz et al. [126] demonstrou que níveis elevados de NLR podem ser úteis na discriminação de pacientes admitidos no serviço de urgência que apresentem dor torácica e reportou uma correlação positiva entre os níveis NLR e a elevação de Troponina. No grupo que obteve um resultado de Troponina positiva no período de seguimento, a NLR média foi 5,49. Por outro lado, o grupo que obteve um resultado de Troponina negativa apresentava um valor médio de NLR de 2,40. Um nível de corte NLR $> 2,80$ revelou 79% de sensibilidade e 73% de especificidade em prever a positividade da Troponina.

Num outro estudo, foi explorada a relação da NLR com o score GRACE de pacientes STEMI submetidos a PCI (intervenção coronária percutânea). Os resultados associaram o score GRACE > 100 pontos cujo NLR $> 2,65$ e um score GRACE > 140 pontos cujo NLR $> 6,48$ obtido na admissão e a NLR foi significativamente relacionada com efeitos adversos intra hospitalares (morte, reenfarte e insuficiência cardíaca), como um preditor de mau prognóstico [127].

A MPO está a emergir como uma ferramenta útil para avaliar o risco de eventos cardiovasculares e vários trabalhos tentam comprovar a sua importância nestas patologias (129-131). Mocatta et al. [128] estudaram 512 pacientes admitidos com EAM, verificando que as concentrações inicialmente elevadas de MPO (níveis medianos: MPO 55 ng/mL vs. 39 ng/mL no grupo controlo) estavam significativamente associadas ao aumento de risco cardiovascular, sendo a MPO um preditor independente de mortalidade num prazo de cinco anos. A MPO revelou informação prognóstica de mortalidade em conjunto com o fragmento N-terminal do Peptídeo Natriurético Cerebral (NT-proBNP), já que pacientes com concentrações acima da mediana destes biomarcadores apresentaram uma taxa de sobrevivência inferior.

Brennan et al. [129] avaliaram os níveis de MPO como preditor de risco de eventos cardiovasculares em 604 pacientes. Em pacientes sem evidência de necrose miocárdica (definido por Troponina sérica negativa), os níveis basais de MPO foram preditores de eventos cardíacos adversos incluindo EAM, reenfarte, necessidade de revascularização ou morte, num período de seguimento de 30 dias e ao fim de 6 meses, aumentando o risco conforme o maior quartil. Neste estudo verificou-se que os níveis de MPO se correlacionavam positivamente com os níveis de Troponina T e eram preditivos de EAM. Enquanto que o aumento dos níveis de Troponina T ocorre 3-6 horas após a dor torácica, os níveis de MPO já se encontram elevados 2 horas após o início dos sintomas. Desta forma, o doseamento de MPO é particularmente útil quando os pacientes apresentam dor torácica e quando a Troponina T ainda é negativa, sendo a MPO um marcador preditor de eventos cardíacos adversos em pacientes com sintomas, mas sem evidência de necrose miocárdica sendo útil na estratificação de risco.

O valor prognóstico do risco cardiovascular da MPO também foi documentado por Baldus *et al* [130] num estudo que consistiu na monitorização de 1090 doentes com SCA durante um período de 6 meses. Pacientes com níveis superiores a 350 µg/L e com níveis de Troponina T inferiores a 0,01 µg/L tinham um risco cardíaco significativamente superior de morte ou sofrer de EAM.

Para diagnosticar EAM em pacientes com SCA admitidos no serviço de urgência nas primeiras 6 horas após o início dos sintomas, a MPO demonstrou ser o marcador mais eficiente (82,5%), discriminando corretamente 94,5% dos pacientes com EAM apesar do baixo grau de especificidade de 56% [131]. A baixa especificidade é explicada pelo facto da elevação da MPO não ser exclusiva de EAM suportando o conceito de que a elevação dos níveis de MPO ocorre após a ativação de leucócitos; etapa precedente à necrose miocárdica. No entanto, a utilização de um score preditivo da combinação dos níveis basais de três marcadores (MPO, CK-MB e cTnI) discriminou corretamente 91% dos pacientes com EAM com uma especificidade de 76%, sugerindo que a combinação destes três biomarcadores é o ideal para um correto diagnóstico precoce de EAM.

Num estudo que teve como objetivo analisar o valor prognóstico da MPO plasmática e os níveis de ácido siálico em pacientes com suspeita de SCA, os níveis plasmáticos de MPO foram significativamente elevados em pacientes com STEMI e NSTEMI em relação aos pacientes diagnosticados com Angina estável ou instável. Níveis mais elevados de MPO e ácido siálico na admissão foram associados ao desenvolvimento de complicações durante o internamento hospitalar (reenfarte,

insuficiência cardíaca congestiva e arritmia). Por outro lado, aquando da categorização dos pacientes em grupos tercil com base nos níveis plasmáticos de MPO, verificou-se uma diminuição da fração de ejeção média no grupo pertencente ao maior tercil (>84.9 U/L) [132]. Um outro estudo associou o aumento das concentrações plasmáticas de MPO (≥ 1164 ng / mL) doseadas ao 3º e 4º dia em pacientes STEMI tratados com PCI como preditores de eventos cardiovasculares adversos (reenfarte, necessidade de revascularização e morte) durante os 14 meses de seguimento [133].

Apesar do aumento dos níveis de MPO não serem específicos para doenças cardíacas, uma vez que a ativação de neutrófilos e macrófagos pode ocorrer noutros processos, como doenças infecciosas, inflamatórias ou processos infiltrativos [134], a MPO tem demonstrado ser um fator de risco cardiovascular independente em pacientes com dor torácica, mas com um cTn sérico negativo na apresentação (sem evidência de necrose miocárdica). Desta forma, a MPO está a emergir não só como um potencial biomarcador de SCA mas também como contribuinte direto para o processo inflamatório, associada à severidade de obstrução microvascular e é considerada como um marcador de instabilidade de placa com um valor prognóstico adverso em pacientes com EAM [135, 136]. No entanto, são necessários mais estudos para determinar o papel da MPO como preditor de risco na SCA e particularmente no diagnóstico de EAM.

6.4 Marcadores de Disfunção Cardíaca

A isquemia do miocárdio resulta em disfunção local e aumento da tensão da parede ventricular. Para além disso, na sequência do EAM, a necrose extensa pode causar uma redução da performance cardíaca e sinais e sintomas de disfunção ventricular. Mais tarde, a remodelação ventricular pode conduzir a progressiva dilatação e disfunção do ventrículo esquerdo. Desta forma, os Péptidos Natriuréticos ao serem sintetizados nas paredes dos ventrículos e libertados para a corrente sanguínea estão relacionados com a fisiopatologia e o *outcome* clínico.

Peptídeo Natriurético Cerebral

As hormonas Natriuréticas são uma família de peptídeos vasoativos que atuam como vasodilatadores arteriais e venosos e promovem a natriurese e a diurese. O Peptídeo Natriurético cerebral ou Peptídeo Natriurético tipo B (BNP) é uma hormona originalmente isolada do tecido cerebral do porco. É sintetizado predominantemente nos ventrículos e libertado na corrente sanguínea em resposta à hipoxia, isquemia, sobrecarga de pressão na parede miocárdica e na dilatação ventricular com ausência de necrose [4]. O BNP circulante deriva de uma pró-hormona, proBNP, que é clivada dentro do miócito, dando origem a um fragmento C-terminal, ao BNP ativo e a um fragmento N-terminal da pró-hormona NT-proBNP. (Fig.20) [137].

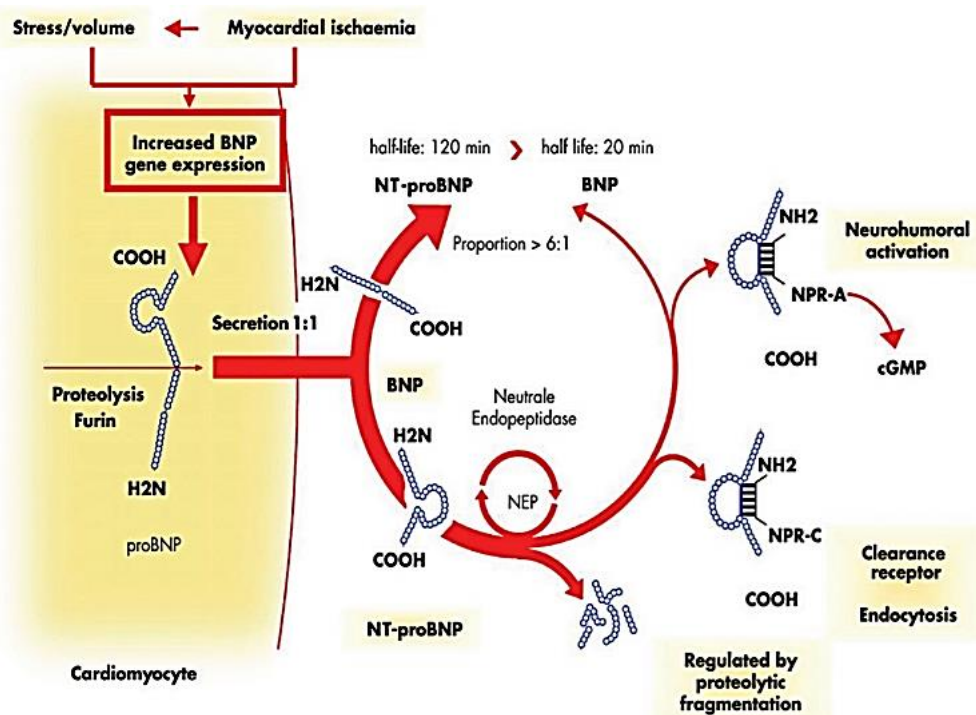


Figura 20 - Ilustração esquemática do Peptídeo Natriurético tipo B e síntese de NT-proBNP. Retirado de Kunj et al.,2017 [138]

Há uma forte evidência de que os níveis de BNP/NT-proBNP se correlacionam com a disfunção ventricular e evolução da doença, sendo considerado um marcador preditor de mortalidade [4, 139]. Aumentos das concentrações plasmáticas de peptídeos natriuréticos são indicativos de stress hemodinâmico, podendo ser utilizados para prognóstico e estratificação de risco em doentes com SCA. Os seus níveis podem estar elevados na

presença de arritmias, embolia pulmonar, insuficiência renal, doenças hepáticas e hipertensão pulmonar, bem como em situações onde há uma ativação do sistema renina-angiotensina [4].

Vários estudos documentam a importância do BNP e do NT-proBNP no prognóstico em pacientes com enfarte do miocárdio. Um estudo verificou que níveis de cerca de 100 pg/mL foram preditivos de EAM em pacientes com SCA sem elevação de ST [140]. Em 631 admitidos nos serviços de urgência, 72 dos pacientes vieram a ser diagnosticados como NSTEMI. Este grupo apresentou uma mediana do nível de BNP significativamente maior do que os pacientes que foram diagnosticados com angina instável ou com outras patologias (não SCA) na admissão. A sensibilidade BNP para EAM (valor de corte de 100 pg/mL) na admissão foi significativamente maior do que a CK-MB e Troponina I (70,8 vs 45,8 vs 50,7%, respectivamente) obtendo-se uma especificidade de 68,9%. O uso simultâneo desses marcadores melhorou significativamente a sensibilidade para 87,3% e o valor preditivo negativo para 97,3%.

Num estudo realizado por Morrow *et al*, [141], pacientes com BNP elevado (> 80 pg/mL) apresentaram maior risco de morte no seguimento de sete dias e seis meses, independente do valor de Troponina I. Para além disso, a maioria dos estudos reporta que pacientes que sofreram EAM sem disfunção ventricular ou elevação do segmento ST, apresentam uma associação positiva entre níveis elevados desses peptídeos e a mortalidade ou reenfarte no primeiro ano após o episódio agudo [142].

Num estudo conduzido por Kunj *et al*. [138] que teve como objetivo avaliar a relação entre os níveis de Peptídeo Natriurético NT-proBNP na admissão com EAM com elevação do segmento ST (STEMI) e as suas complicações a curto prazo durante um período de 7 dias, o nível mediano de NT-proBNP foi de 1483,50 pg /mL. Dos 40 pacientes estudados, os 13 pacientes (32,5%) que sofreram de eventos adversos a curto prazo, pertenciam ao grupo com níveis de NT-proBNP acima da mediana. Este estudo apoia o interesse do NT-proBNP como um marcador preditor de agravamento da insuficiência cardíaca, ocorrência de arritmias e morte dentro de um período de 7 dias em pacientes STEMI. Por outro lado, o NT-proBNP abaixo da mediana emergiu como um forte preditor para a ausência de eventos adversos.

Em resumo, de acordo com os trabalhos publicados recentemente, a maior utilidade do BNP será no campo do prognóstico e não do diagnóstico. Em todos os cenários em que o BNP foi estudado, parece ser um dos principais preditores independentes de eventos

cardiovasculares e está relacionado com a previsão da evolução da doença em síndromes isquémicas agudas [143]. A secreção dos fragmentos está aumentada pela distensão da parede ventricular e sobrecarga de volume, como acontece na insuficiência cardíaca. Assim, nesta condição crónica o BNP e o NT-proBNP são marcadores com forte implicação prognóstica, já bem estabelecida.

6.5 Marcadores de Stress

A Vasopressina, também conhecida Arginina Vasopressina (AVP) e por hormona antidiurética, participa na regulação hemodinâmica e osmótica do organismo através da regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, refletindo a resposta ao stress. A AVP é sintetizada pelos neurónios magnocelulares do hipotálamo e segregada para a circulação sanguínea pela hipófise posterior. A libertação da AVP é regulada pela hiperosmolalidade, hipovolemia, hipotensão e angiotensina II. Alterações na homeostasia do sistema AVP estão correlacionadas com a fisiopatologia de várias doenças crónicas como diabetes, insuficiência hepática crónica e insuficiência cardíaca crónica.

A lesão miocárdica caracteriza -se por uma série de alterações neuro endócrinas através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em resposta ao stress endógeno desencadeado por alterações hemodinâmicas e osmóticas e com consequente rápida libertação de catecolaminas e AVP na circulação sanguínea.

Copeptina

Tendo em conta o contributo da AVP na fisiopatologia seria importante o doseamento dos seus níveis plasmáticos para o diagnóstico e para a monitorização de doentes com patologia cardiovascular. No entanto, a AVP é instável e rapidamente eliminada da circulação o que dificulta o seu doseamento.

A AVP tem origem num peptídeo precursor designado por Preprovasopressina, que é constituída por um peptídeo de sinalização, AVP, neurofisina II e Copeptina. A Preprovasopressina é sintetizada nos núcleos magnocelulares do hipotálamo e sofre a intervenção de uma cascata de reações enzimáticas (Fig.21). Após a clivagem do peptídeo de sinalização, forma-se a Provasopressina, que é posteriormente clivada

durante o transporte axonal dos núcleos hipotalâmicos para a neurohipófise. Numa clivagem inicial liberta-se a AVP e uma segunda separa a Neurofisiina II da Copeptina [144].

A Copeptina é assim um peptídeo correspondente à região C-terminal da Preprovasopressina que é secretado em quantidades equimolares à Vasopressina. Em contraste com a AVP que é uma hormona instável e de rápida eliminação, a Copeptina é estável e pode ser mais facilmente quantificada [145].

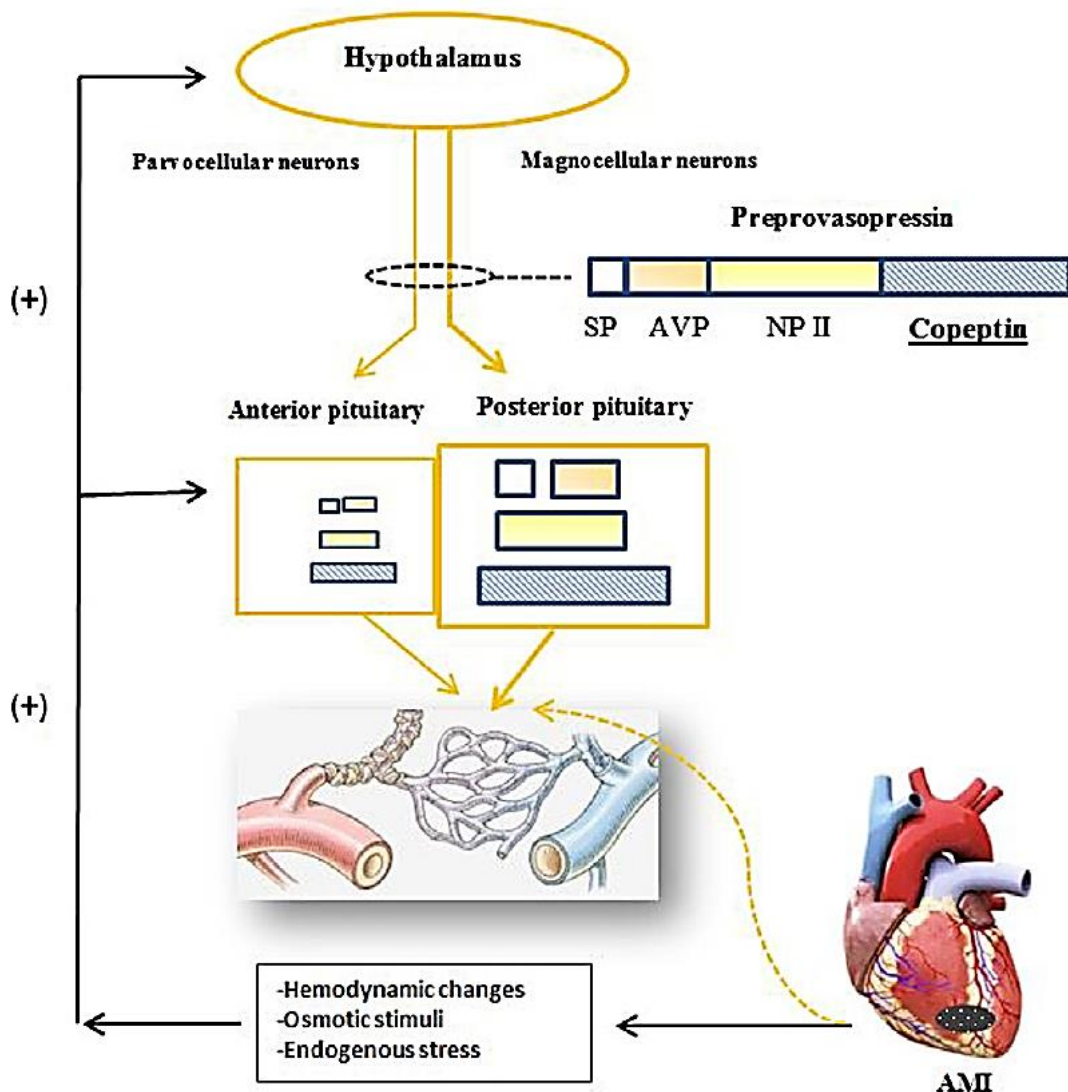


Figura 21 - Síntese e mecanismo de libertação da Copeptina durante o enfarte agudo do miocárdio. SP: Peptídeo sinal, AVP: Arginina Vasopressina, NP II: Neurofisiina II, EAM: Enfarte Agudo do Miocárdio. Retirado de Vargas et al., 2016 [144]

A Copeptina poderá ser considerada como um importante biomarcador para o prognóstico. Como a AVP é libertada em resposta às alterações da osmolaridade do plasma e com o intuito de aumentar a pós-carga, os valores de Copeptina em proporção estequiométrica à Vasopressina estão aumentados em pacientes com insuficiência cardíaca crónica e relacionados com a gravidade da doença. Num estudo foi determinada a precisão prognóstica da Copeptina após EAM em 980 pacientes, e foi observado que os níveis de Copeptina em pacientes que morreram ou que foram readmitidos com insuficiência cardíaca se encontravam significativamente elevados em comparação com os dos sobreviventes. Pacientes com nível de NT-proBNP acima de 900 pmol/L e nível de Copeptina acima de 7 pmol/L foram associados a um pior prognóstico, concluindo que a Copeptina foi um preditor independente de morte ou insuficiência cardíaca [146].

Keller *et al* [147] verificaram que o valor diagnóstico da Copeptina como marcador isolado é comparável ao da Mioglobina, sendo superior ao da Troponina (pelos métodos convencionais) durante as primeiras 3 horas após o início da dor torácica. Por outro lado, a determinação de Copeptina adicionada à informação diagnóstica da Troponina T (cTnT) na avaliação inicial dos pacientes melhorou a sensibilidade diagnóstica para EAM, fornecendo um valor preditivo negativo de 92,4% comparativamente com a determinação isolada da cTnT.

No estudo da utilidade da Copeptina como marcador para o diagnóstico rápido de EAM, Reichlin *et al* [148] verificaram que os níveis eram significativamente maiores em pacientes com EAM do que em pacientes com outros diagnósticos, sugerindo que as amostras seriadas poderiam ser limitadas apenas aos pacientes positivos para Troponina T ($> 0,01 \mu\text{g/L}$) ou Copeptina ($\geq 14 \text{ pmol/L}$), enquanto que para aqueles pacientes cujos dois marcadores eram negativos, a monitorização não seria necessária. O baixo nível de Copeptina ($<14 \text{ pmol/L}$) combinado com baixo nível de Troponina ($T \leq 0,01 \mu\text{g/L}$) exclui o diagnóstico de EAM, tendo uma sensibilidade de 98,8% e valor preditivo negativo de 99,7%. Esta estratégia de duplo marcador com cTn convencional e Copeptina permite a exclusão precoce do NSTEMI incluindo uma redução do tempo médio de diagnóstico em relação aos ensaios convencionais de cTn.

Uma metanálise conduzida por Shin *et al.* [149] incluiu um total de 7.998 participantes em 14 estudos observacionais. Esta metanálise incluiu apenas estudos com resultados de pacientes com sintomas sugestivos de EAM sem evidência de elevação do segmento ST. A análise de subgrupos foi realizada, comparando a adição de Copeptina aos testes de

Troponina I (cTnI) e Troponina T de alta sensibilidade (hs-cTnT). Verificou-se que a adição da Copeptina a cTnI e hs-cTnT melhorou significativamente a sensibilidade e diminuiu a especificidade em comparação com cTnI ou hs-cTnT isoladamente no diagnóstico de NSTEMI. Mais especificamente, a adição de Copeptina aumentou a sensibilidade para cTnI (0.71 vs. 0.89) e hs-cTnT (0.86 vs. 0.93) e reduziu a especificidade para cTnI (0.96 vs. 0.67) e hs-cTnT (0,76 vs 0,50). A adição de Copeptina aumentou o VPN para cTnI (0,96 vs. 0,97). No entanto, a adição de Copeptina à hs-cTnT diminui o VPN (0,97 vs. 0,94) conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de subgrupo na avaliação da precisão de diagnóstico na adição de Copeptina à Troponina. Retirado de Shin *et al.* [149].

Type of cTn	cTnI				hs-cTnT			
No. of studies	6				8			
No. of patients*	5398				2600			
Diagnostic tests (95% CI)	cTnI	cTnI with copeptin	Difference	p-value	hs-cTnT	hs-cTnT with copeptin	Difference	p-value
Sensitivity	0.71 (0.60, 0.82)	0.89 (0.86, 0.93)	0.18 (0.14, 0.22)	< .001	0.86 (0.79, 0.93)	0.93 (0.91, 0.96)	0.07 (0.04, 0.10)	< .001
Specificity	0.96 (0.92, 1.00)	0.67 (0.61, 0.72)	-0.29 (-0.31, -0.27)	< .001	0.76 (0.60, 0.91)	0.50 (0.40, 0.59)	-0.26 (-0.33, -0.19)	< .001
PPV	0.73 (0.58, 0.89)	0.29 (0.17, 0.40)	-0.44 (-0.50, -0.38)	< .001	0.44 (0.33, 0.56)	0.48 (0.30, 0.65)	0.04 (-0.03, 0.11)	0.136
NPV	0.96 (0.94, 0.98)	0.97 (0.96, 0.99)	0.01 (0, 0.02)	0.011	0.97 (0.95, 0.99)	0.94 (0.89, 0.98)	-0.03 (-0.05, -0.01)	0.001
AUC	0.93 (0.92, 0.95)	0.80 (0.78, 0.82)	NA	< .001	0.90 (0.88, 0.92)	0.83 (0.80, 0.86)	NA	< .001

Embora não seja específica de lesão miocárdica, a Copeptina é um biomarcador com elevada sensibilidade nas primeiras horas após o início dos sintomas.

As *guidelines* descrevem que a combinação da Copetina (<10 pmol/L) com níveis normais de Troponina convencional (cTn) na apresentação demonstra ter um alto valor preditivo negativo para a exclusão precoce de pacientes com enfarte agudo do miocárdio (NSTEMI), não sendo necessários mais doseamentos seriados. As mesmas *guidelines* recomendam o uso de Copeptina para a exclusão precoce do NSTEMI somente se os testes de hs-cTn não estiverem disponíveis [50].

6.6 Marcadores de expressão génica

Os microRNAs intervêm em diversos processos celulares nomeadamente na embriogénese, diferenciação celular, proliferação celular, apoptose e hematopoiese. Desde a sua descoberta, os microRNAs têm gerado um grande interesse como biomarcadores em diversas condições patológicas, como cancro, epilepsia, diabetes e doenças cardiovasculares.

No coração, estas moléculas são responsáveis não só pela regulação da diferenciação, proliferação ou apoptose das células cardíacas, mas também pela adaptação a condições como isquémia, hipertrofia e fibrogénese. A ação dos microRNAs pode ocorrer quer no sentido da promoção desses processos quer no sentido da inibição dos mesmos o que poderá também sugerir o seu interesse terapêutico.

MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples, não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos que atuam na regulação dos mRNA ao nível pós-transcricional. Os mecanismos podem ocorrer quer pela clivagem de um mRNA alvo ou pela repressão da sua tradução. Estas moléculas estão envolvidas em processos celulares como proliferação, apoptose e diferenciação em vários tecidos e na etiopatogenia de várias doenças como cancro e diabetes [150]. Os miRNAs são também expressos no sistema cardiovascular, contudo o seu papel na DCV ainda não está bem definido.

O EAM envolve a morte celular e uma série de processos implicados na adaptação da célula a condições fisiopatológicas como a isquemia e que visam a reparação e sobrevivência do cardiomiócito. Durante o EAM, diversos miRNAs são libertados para a corrente sanguínea (Fig. 22), e podem ser analisados por técnicas laboratoriais de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que possibilitam a deteção de baixos níveis de miRNAs. Assim, alterações nos níveis circulantes destes reguladores de expressão génica podem ser extremamente sensíveis para EAM. A maioria dos miRNAs extracelulares circulam ligados a proteínas (lipoproteínas HDL entre outras), enquanto que os restantes são incluídos em microvesículas extracelulares e exossomas. Estas associações permitem o transporte dos miRNAs e impedem a sua degradação por RNAses prolongando o seu tempo de permanência na circulação sanguínea [151].

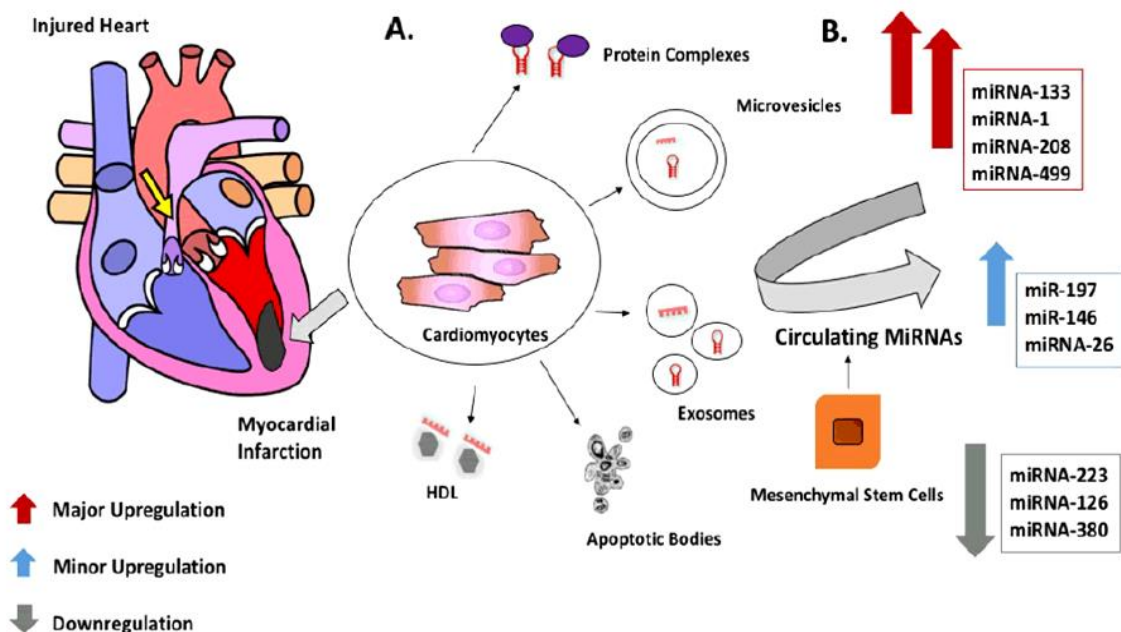


Figura 22 – miRNAs libertados para a circulação sanguínea no enfarte agudo do miocárdio. (A). Em resposta à isquemia os cardiomiócitos libertam os miRNAs por diversos mecanismos e em associação a complexos proteicos, microvesículas, exossomas e HDL. (B). Listagem e expressão dos miRNAs libertados. Retirado de *Khalil et al., 2017* [151]

No entanto, alterações nos níveis circulantes de miRNAs foram também descritas nas doenças cardiovasculares em geral e noutras patologias cardíacas nomeadamente na hipertrofia cardíaca em resposta patológica à hipertensão, isquemia cardíaca e valvulopatias não sendo por isso específicas para EAM [152].

O miR-133a desempenha um importante papel na miogénese, desenvolvimento e diferenciação e na hipertrofia dos cardiomiócitos mas não é exclusivo do tecido cardíaco. É um dos miRNAs mais estudados para o diagnóstico e monitorização dos pacientes pois existe em baixos níveis na circulação dos indivíduos saudáveis e é libertado em altos níveis para a circulação a partir do miocárdio necrótico. A grande vantagem do uso do miR-133 está na sua deteção precoce já que surge mais rapidamente do que a troponina I [153].

Han et al. [154] compararam níveis do miRNA-208 entre os grupos de doentes com EAM, Angina Instável e indivíduos saudáveis e verificaram que os seus níveis eram significativamente superiores em doentes com EAM em relação aos outros dois grupos, tendo ainda constatado uma correlação positiva com os níveis séricos de cTnI e CK-MB. Para além disso, os níveis do miRNA-208 diminuíram consideravelmente 24 horas após a intervenção coronária percutânea (PCI) em pacientes diagnosticados com EAM,

comprovando que a redução de expressão do miRNA-208 pode ser útil para avaliar uma reperfusão miocárdica eficaz e, portanto, um marcador útil na avaliação de intervenções clínicas precoces. Este estudo conclui que o miRNA-208 pode ser um biomarcador utilizado no diagnóstico e monitorização clínica para EAM.

O artigo de Yao *et al.*[155] descreve o miRNA-122-5p circulante como um potencial novo biomarcador para o diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio. Nesse estudo, os autores descobriram que a expressão aumenta ao longo do tempo em 4, 8, 12 e 24 horas em pacientes com EAM, comparativamente com o grupo controle (não EAM). Os resultados deste estudo mostraram que os níveis circulantes de miR-122-5p aumentaram 4,63 vezes (4 horas), 16,91 vezes (8 horas), 7,08 vezes (12 horas) e 3,13 vezes (24 horas) em relação ao grupo controle (Fig.23) e apresentaram uma correlação positiva com os níveis circulantes de cTnI.

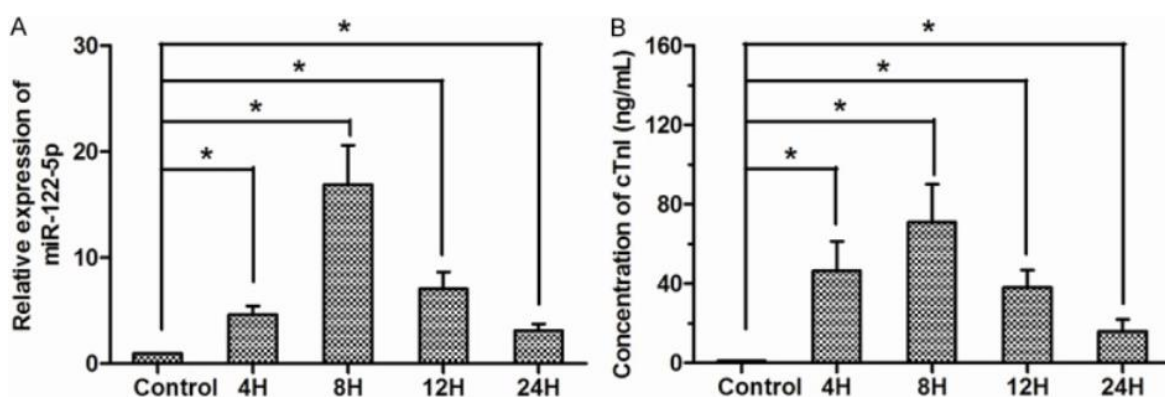


Figura 23 - Expressão do miR-122-5p circulante e concentrações de Troponina em pacientes com enfarte agudo do miocárdio. A) A expressão relativa de miR-122-5p circulante em pacientes com EAM doseada em 4, 8, 12 e 24 horas, em comparação com o grupo controle não EAM. B) Concentração de cTnI em pacientes com EAM doseada no mesmo período em comparação com o grupo controle não EAM. Retirado de Yao *et al.*,2015 [155]

Em resumo, vários estudos indicam que os miRNA poderão ser marcadores sensíveis para EAM e novas áreas de investigação estão em desenvolvimento para o estudo da sua utilização, quer como marcadores de dano isquêmico cardíaco quer como potenciais reguladores da função e da remodelação celular pós EAM [156]. Os miRNA constituem uma nova classe de biomarcadores com potencial interesse no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, no entanto são necessários mais estudos a fim de determinar a sua aplicação clínica para a patologia de enfarte agudo do miocárdio.

7. Conclusão

Os biomarcadores cardíacos são ferramentas importantes na avaliação de indivíduos com dor torácica, sendo que nas últimas décadas um número crescente de biomarcadores tem sido usado no auxílio do diagnóstico do EAM, estratificação de risco e prognóstico. Alguns desses biomarcadores são amplamente usados na prática clínica, outros ainda não apresentaram evidências científicas que sustentem o seu uso clínico. Atualmente, para diagnóstico de EAM sugere-se a utilização das isoformas de Troponina (T e I) e de CK-MB como marcadores de lesão miocárdica, sendo que os Consensos Americano e Europeu de Cardiologia referem a Troponina (T ou I) como biomarcador preferencial de lesão miocárdica, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade cardíaca. Se os ensaios de troponina não estiverem disponíveis, a melhor alternativa é o doseamento de CK-MB massa. No entanto a maior limitação no doseamento da Troponina pelos testes convencionais é a sua deteção tardia (4 a 6 horas) após o início dos sintomas, sendo útil o doseamento de CK-MB e da Mioglobina como marcadores sensíveis e mais precoces. A utilização das Troponinas de alta sensibilidade (hs-cTn) trouxe uma vantagem adicional no diagnóstico precoce de EAM surgindo também como um marcador útil no campo de prognóstico e estratificação de risco. Esta capacidade precoce permite uma rápida decisão clínica para uma terapêutica adequada, de modo a que haja um prognóstico mais favorável.

Novos biomarcadores estão a surgir refletindo diferentes aspetos fisiopatológicos na tentativa de melhorar a eficiência no diagnóstico e prognóstico de SCA. Estes marcadores podem estar associados a processos de isquemia, inflamação, instabilidade da placa de ateroma com risco de oclusão coronária, disfunção cardíaca e necrose. A utilização destes novos biomarcadores poderá fornecer informações adicionais, sendo capazes de identificar episódios de isquemia que não acarretam necrose do cardiomiócito sem elevação significativa da troponina. A investigação continua na busca do biomarcador ideal ou da combinação de biomarcadores, com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de EAM. Embora haja evidências de que a combinação de biomarcadores pode aumentar a precisão de diagnóstico precoce, o benefício na utilização destes biomarcadores necessita de ser comprovado e os critérios precisam de ser bem definidos. Espera-se que a intensa investigação nesta área contribua para a expansão do conhecimento sobre estes novos biomarcadores e para uma correta avaliação de doentes com SCA e estratificação de risco.

8. Bibliografia

1. Ministério da Saúde. Direção Geral da Saúde. Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares Lisboa, 2017 [Acedido a 3 de Setembro de 2018].
2. Kumar, A. and C.P. Cannon, *Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I*. Mayo Clin Proc, 2009. **84**(10): p. 917-38.
3. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(16): p. 1581-98.
4. Singh, V., et al., *Cardiac biomarkers - the old and the new: a review*. Coron Artery Dis, 2010. **21**(4): p. 244-56.
5. Seeley, R.R., T.D. Stephens, and P. Tate, *Anatomy and Physiology*. 2003: McGraw-Hill Higher Education.
6. Kobayashi, T., L. Jin, and P. de Tombe, *Cardiac thin filament regulation*. Vol. 457. 2008. 37-46.
7. Seropian, I.M., et al., *Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(16): p. 1593-603.
8. Renu Virmani, F.D.K., Allen P. Burke, Andrew Farb and Stephen M. Schwartz, *Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions*. Journal of American Heart Association, 2000.
9. Kramer, C.M. and J.D. Anderson, *MRI of atherosclerosis: diagnosis and monitoring therapy*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2007. **5**(1): p. 69-80.
10. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 365-72.
11. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
12. Barton, M., *Prevention and endothelial therapy of coronary artery disease*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 226-41.
13. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *Novel clinical markers of vascular wall inflammation*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 763-71.
14. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**: p. 868.
15. Davies, M.J., *The pathophysiology of acute coronary syndromes*. St George`s Hospital Medical School, 2000.
16. Damiano Baldassarre, P.M.A., PhD; Alighiero Bondioli, MD; Cesare R. Sirtori, PhD, MD; Elena Tremoli, PhD, *Carotid Artery Intima-Media Thickness Measured by Ultrasonography in Normal Clinical Practice Correlates Well With Atherosclerosis Risk Factors*. Journal of American Heart Association, 2000.
17. Scheuner, M.T., *Genetic evaluation for coronary artery disease*. Genet Med, 2003. **5**(4): p. 269-85.
18. Jousilahti, P., et al., *Sex, Age, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Heart Disease*. Circulation, 1999. **99**(9): p. 1165.
19. Ruiz-Larrea, B., et al., *Effects of estrogens on the redox chemistry of iron: A possible mechanism of the antioxidant action of estrogens*. Steroids, 1995. **60**(11): p. 780-783.
20. Collins, P., et al., *Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 1964-8.
21. Smith, A.R., F. Visioli, and T.M. Hagen, *Plasma membrane-associated endothelial nitric oxide synthase and activity in aging rat aortic vascular endothelia markedly decline with age*. Arch Biochem Biophys, 2006. **454**(1): p. 100-5.

22. Wienbergen, H. and R. Hambrecht, *Physical exercise and its effects on coronary artery disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(2): p. 218-25.
23. Hu, F.B., et al., *Physical activity and television watching in relation to risk for type 2 diabetes mellitus in men*. *Arch Intern Med*, 2001. **161**(12): p. 1542-8.
24. Wang, Y. and D. Xu, *Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins*. *Lipids in Health and Disease*, 2017. **16**: p. 132.
25. Lichtenstein, A.H., *Dietary fat and cardiovascular disease risk: quantity or quality?* *J Womens Health (Larchmt)*, 2003. **12**(2): p. 109-14.
26. Kragelund, C., et al., *Impact of obesity on long-term prognosis following acute myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 2005. **98**(1): p. 123-31.
27. Poirier, P., et al., *Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 898.
28. Barton, M., *Childhood obesity: a life-long health risk*. *Acta Pharmacol Sin*, 2012. **33**(2): p. 189-93.
29. Kronmal, R.A., et al., *Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age: A report based on the framingham data*. *Archives of Internal Medicine*, 1993. **153**(9): p. 1065-1073.
30. Antoniadis, C., et al., *Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(9): p. 1142-50.
31. Avogaro, A., S.V. de Kreutzenberg, and G. Fadini, *Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. **82 Suppl 2**: p. S94-s101.
32. Soldatos, G., M.E. Cooper, and K.A. Jandeleit-Dahm, *Advanced-glycation end products in insulin-resistant states*. *Curr Hypertens Rep*, 2005. **7**(2): p. 96-102.
33. Palatini, P. and S. Julius, *The physiological determinants and risk correlations of elevated heart rate*. *American journal of hypertension*, 1999. **12**(S1): p. 3S-8S.
34. Vanhoutte, P.M., M. Feletou, and S. Taddei, *Endothelium-dependent contractions in hypertension*. *Br J Pharmacol*, 2005. **144**(4): p. 449-58.
35. Burke, A. and G.A. Fitzgerald, *Oxidative stress and smoking-induced vascular injury*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2003. **46**(1): p. 79-90.
36. Zhu, B.Q. and W.W. Parmley, *Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking*. *Am Heart J*, 1995. **130**(6): p. 1270-5.
37. Ledue, T.B. and N. Rifai, *Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment*. *Clin Chem*, 2003. **49**(8): p. 1258-71.
38. Tanaka, A., et al., *Multiple plaque rupture and C-reactive protein in acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(10): p. 1594-9.
39. Sano, T., et al., *C-reactive protein and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2003. **108**(3): p. 282-5.
40. Michael B. Clearfield, D., *C-Reactive Protein A New Risk Assessment Tool for Cardiovascular Disease*.
41. Liuzzo, G., et al., *The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(7): p. 417-24.
42. Morrow, D.A., et al., *C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **31**(7): p. 1460-5.
43. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(1): p. 20-8.

44. Pearson, T.A., *Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 499-511.
45. WHO, *Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. Prevention of Cardiovascular Disease.
46. *Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature*. *Circulation*, 1979. **59**(3): p. 607-9.
47. *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2000. **21**(18): p. 1502-13.
48. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. *Circulation*, 2007. **116**(22): p. 2634-53.
49. Thygesen, K., et al., *Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)*. *Eur Heart J*, 2019. **40**(3): p. 237-269.
50. Roffi, M., et al., *2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(3): p. 267-315.
51. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(2): p. 119-177.
52. Anderson, J.L., et al., *ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(7): p. e1-e157.
53. Chacko, S., et al., *The role of biomarkers in the diagnosis and risk stratification of acute coronary syndrome*. *Future Science OA*, 2018. **4**(1): p. FSO251.
54. Rajappa, M. and A. Sharma, *Biomarkers of cardiac injury: an update*. *Angiology*, 2005. **56**(6): p. 677-91.
55. Twerenbold, R., et al., *Clinical Use of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Patients With Suspected Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(8): p. 996-1012.
56. null, n., et al., *Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2001. **69**(3): p. 89-95.
57. Azzazy, H.M.E. and R.H. Christenson, *Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing?* *Clinical biochemistry*, 2002. **35**(1): p. 13-27.
58. Kemp, M., et al., *Biochemical markers of myocardial injury*. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 2004. **93**(1): p. 63-73.
59. Ladue, J.S., F. Wroblewski, and A. Karmen, *Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction*. *Science*, 1954. **120**(3117): p. 497-9.
60. Brancaccio, P., G. Lippi, and N. Maffulli, *Biochemical markers of muscular damage*. Vol. 48. 2010. 757-67.

61. Penttila, I., K. Penttila, and T. Rantanen, *Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(3): p. 187-97.
62. Johnston, C.C. and E.C. Bolton, *Cardiac enzymes*. Ann Emerg Med, 1982. **11**(1): p. 27-35.
63. King, J. and A.P.B. Waind, *Lactic Dehydrogenase Activity in Acute Myocardial Infarction*. British Medical Journal, 1960. **2**(5209): p. 1361-1363.
64. Nowakowski, J.F., *Use of cardiac enzymes in the evaluation of acute chest pain*. Annals of Emergency Medicine, 1986. **15**(3): p. 354-360.
65. Rosalki, S.B., et al., *Cardiac biomarkers for detection of myocardial infarction: perspectives from past to present*. Clin Chem, 2004. **50**(11): p. 2205-13.
66. Robinson, D.J. and R.H. Christenson, *Creatine kinase and its CK-MB isoenzyme: the conventional marker for the diagnosis of acute myocardial infarction*. The Journal of emergency medicine, 1999. **17**(1): p. 95-104.
67. Kagen, L., et al., *Myoglobinemia following acute myocardial infarction*. Am J Med, 1975. **58**(2): p. 177-82.
68. Lackner, K.J., *Laboratory diagnostics of myocardial infarction--troponins and beyond*. Clin Chem Lab Med, 2013. **51**(1): p. 83-9.
69. Gibler, W.B., et al., *Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction*. Ann Emerg Med, 1987. **16**(8): p. 851-6.
70. Brogan, G.X., Jr., 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 Emergency Medicine, 1994. **24**(4): p. 665-671.
71. Montague, C. and T. Kircher, *Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain*. Am J Clin Pathol, 1995. **104**(4): p. 472-6.
72. de Winter, R.J., et al., *Value of Myoglobin, Troponin T, and CK-MB in Ruling Out an Acute Myocardial Infarction in the Emergency Room*. Circulation, 1995. **92**(12): p. 3401.
73. Kontos, M.C., et al., *Use of the combination of myoglobin and CK-MB mass for the rapid diagnosis of acute myocardial infarction*. Am J Emerg Med, 1997. **15**(1): p. 14-9.
74. 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**(14): p. 1832-7.
75. Kurz, K., et al., *Comparison of the new high sensitive cardiac troponin T with myoglobin, h-FABP and cTnT for early identification of myocardial necrosis in the acute coronary syndrome*. Clin Res Cardiol, 2011. **100**(3): p. 209-15.
76. Scharnhorst, V., et al., *Rapid detection of myocardial infarction with a sensitive troponin test*. American journal of clinical pathology, 2011. **135**(3): p. 424-428.
77. Lim, S.H. and Z. Lin, *Update on the use of cardiac markers in the diagnosis of acute coronary syndrome*. Journal of Acute Medicine, 2013. **3**(4): p. 125-131.
78. Murthy, V.V. and A. Karmen, *Activity concentration and mass concentration (monoclonal antibody immunoenzymometric method) compared for creatine kinase MB isoenzyme in serum*. Clin Chem, 1986. **32**(10): p. 1956-9.
79. Panteghini, M., *Diagnostic application of CK-MB mass determination*. Clinica Chimica Acta, 1998. **272**(1): p. 23-31.
80. Larca, L.J., J.T. Coppola, and S. Honig, *Creatine kinase mb isoenzyme in dermatomyositis: A noncardiac source*. Annals of Internal Medicine, 1981. **94**(3): p. 341-343.
81. Morrow, D.A., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes*. Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 552-74.
82. Newby, L.K., et al., *Frequency and clinical implications of discordant creatine kinase-MB and troponin measurements in acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(2): p. 312-8.

83. Saenger, A.K. and A.S. Jaffe, *Requiem for a heavyweight: the demise of creatine kinase-MB*. *Circulation*, 2008. **118**(21): p. 2200-6.
84. Katus, H.A., et al., *Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients*. *J Mol Cell Cardiol*, 1989. **21**(12): p. 1349-53.
85. Jaffe, A.S., *Troponin--past, present, and future*. *Curr Probl Cardiol*, 2012. **37**(6): p. 209-28.
86. Garg, P., et al., *Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin*. *Intern Emerg Med*, 2017. **12**(2): p. 147-155.
87. Higgins, J.P. and J.A. Higgins, *Elevation of cardiac troponin I indicates more than myocardial ischemia*. *Clin Invest Med*, 2003. **26**(3): p. 133-47.
88. Schreier, T., L. Kedes, and R. Gahlmann, *Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(34): p. 21247-53.
89. Daubert, M.A. and A. Jeremias, *The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings*. *Vascular Health and Risk Management*, 2010. **6**: p. 691-699.
90. Apple, F.S., P.O. Collinson, and I.T.F.o.C.A.o.C. Biomarkers, *Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays*. *Clin Chem*, 2012. **58**(1): p. 54-61.
91. Wu, A.H., et al., *Short- and long-term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: implications for clinical practice*. *Clin Chem*, 2009. **55**(1): p. 52-8.
92. Agewall, S., et al., *Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(4): p. 404-11.
93. Thygesen, K., et al., *How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(18): p. 2252-7.
94. Hoff, J., W. Wehner, and V. Nambi, *Troponin in Cardiovascular Disease Prevention: Updates and Future Direction*. *Curr Atheroscler Rep*, 2016. **18**(3): p. 12.
95. Immanuel, S. and A.I. Sanjaya, *Albumin cobalt binding (ACB) test: its role as a novel marker of acute coronary syndrome*. *Acta Med Indones*, 2006. **38**(2): p. 92-6.
96. Gaze, D.C., *Biomarkers of Cardiac Ischemia, 2012*. [Acedido a 3 de Julho de 2018] Disponível na Internet: <https://www.intechopen.com/books/ischemic-heart-disease/biomarkers-of-cardiac-ischemia#B12>
97. Christenson, R.H., et al., *Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study*. *Clin Chem*, 2001. **47**(3): p. 464-70.
98. Peacock, F., et al., *Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department*. *Am Heart J*, 2006. **152**(2): p. 253-62.
99. Bhagavan, N.V., et al., *Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction*. *Clin Chem*, 2003. **49**(4): p. 581-5.
100. Sinha, M.K., et al., *Role of "Ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes*. *Emerg Med J*, 2004. **21**(1): p. 29-34.
101. Gurumurthy, P., et al., *Estimation of Ischemia Modified Albumin (IMA) Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2014. **29**(3): p. 367-371.
102. Bhakthavatsala Reddy, C., C. Cyriac, and H.B. Desle, *Role of "Ischemia Modified Albumin" (IMA) in acute coronary syndromes*. *Indian Heart J*, 2014. **66**(6): p. 656-62.
103. Mehta, M.D., et al., *A synergistic role of ischemia modified albumin and high-sensitivity troponin T in the early diagnosis of acute coronary syndrome*. *J Family Med Prim Care*, 2015. **4**(4): p. 570-5.

104. Demirtas, A.O., T. Karabag, and D. Demirtas, *Ischemic Modified Albumin Predicts Critical Coronary Artery Disease in Unstable Angina Pectoris and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction*. J Clin Med Res, 2018. **10**(7): p. 570-575.
105. Otaki, Y., T. Watanabe, and I. Kubota, *Heart-type fatty acid-binding protein in cardiovascular disease: A systemic review*. Clin Chim Acta, 2017. **474**: p. 44-53.
106. Cavus, U., et al., *Heart-type, fatty-acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes*. J Natl Med Assoc, 2006. **98**(7): p. 1067-70.
107. Kabekkodu, S.P., S.R. Mananje, and R.P. Saya, *A Study on the Role of Heart Type Fatty Acid Binding Protein in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction*. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR, 2016. **10**(1): p. OC07-OC10.
108. Thielmann, M., et al., *Heart-Type Fatty Acid Binding Protein and Ischemia-Modified Albumin for Detection of Myocardial Infarction After Coronary Artery Bypass Graft Surgery*. Ann Thorac Surg, 2017. **104**(1): p. 130-137.
109. Hamza, M., S. Demerdash, and M. Ibrahim, *Heart-type fatty acid-binding protein as a diagnostic biochemical marker for early detection of myocardial infarction*. Acta Cardiol, 2016. **71**(5): p. 537-541.
110. Sotoudeh Anvari, M., et al., *Complementary Diagnostic Value of Heart Type Fatty Acid-binding Protein in Early Detection of Acute Myocardial Infarction*. Crit Pathw Cardiol, 2018. **17**(1): p. 43-46.
111. Agnello, L., et al., *Heart-type fatty acid binding protein is a sensitive biomarker for early AMI detection in troponin negative patients: a pilot study*. Scand J Clin Lab Invest, 2017. **77**(6): p. 428-432.
112. Young, J.M., et al., *Heart Fatty Acid Binding Protein and cardiac troponin: development of an optimal rule-out strategy for acute myocardial infarction*. BMC Emerg Med, 2016. **16**(1): p. 34.
113. Kagawa, Y., et al., *Comparison of heart-type fatty acid binding protein and sensitive troponin for the diagnosis of early acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **166**(2): p. 347-51.
114. Budzianowski, J., et al., *The Role of Hematological Indices in Patients with Acute Coronary Syndrome*. Disease markers, 2017. **2017**: p. 3041565-3041565.
115. Kaya, H., et al., *Association between neutrophil to lymphocyte ratio and severity of coronary artery disease*. Clin Appl Thromb Hemost, 2014. **20**(1): p. 50-4.
116. Açar, G., et al., *Relationship of neutrophil-lymphocyte ratio with the presence, severity, and extent of coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography*. American Journal of Cardiology, 2014. **113**(7): p. S114.
117. Paquissi, F.C., *The role of inflammation in cardiovascular diseases: the predictive value of neutrophil-lymphocyte ratio as a marker in peripheral arterial disease*. Ther Clin Risk Manag, 2016. **12**: p. 851-60.
118. Nalbant, A., et al., *Neutrophil to lymphocyte ratio might help prediction of acute myocardial infarction in patients with elevated serum creatinine*. Pakistan journal of medical sciences, 2016. **32**(1): p. 106-110.
119. Horne, B.D., et al., *Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(10): p. 1638-43.
120. Thomson, S.P., L.J. McMahon, and C.A. Nugent, *Endogenous cortisol: a regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood*. Clin Immunol Immunopathol, 1980. **17**(4): p. 506-14.
121. Tamhane, U.U., et al., *Association between admission neutrophil to lymphocyte ratio and outcomes in patients with acute coronary syndrome*. Am J Cardiol, 2008. **102**(6): p. 653-7.
122. Mayyas, F.A., et al., *Level and significance of plasma myeloperoxidase and the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with coronary artery disease*. Exp Ther Med, 2014. **8**(6): p. 1951-1957.

123. Soehnlein, O., *Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis*. Circulation Research, 2012. **110**(6): p. 875-888.
124. Naruko, T., et al., *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2894-900.
125. Gazi, E., et al., *Prognostic Value of the Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Patients With ST-Elevated Acute Myocardial Infarction*. Clin Appl Thromb Hemost, 2015. **21**(2): p. 155-9.
126. Korkmaz, A., et al., *Utility of Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Predicting Troponin Elevation in the Emergency Department Setting*. Clin Appl Thromb Hemost, 2015. **21**(7): p. 667-71.
127. Oncel, R.C., et al., *Relation of neutrophil-to-lymphocyte ratio with GRACE risk score to in-hospital cardiac events in patients with ST-segment elevated myocardial infarction*. Clin Appl Thromb Hemost, 2015. **21**(4): p. 383-8.
128. Mocatta, T.J., et al., *Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(20): p. 1993-2000.
129. Brennan, M.L., et al., *Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain*. N Engl J Med, 2003. **349**(17): p. 1595-604.
130. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1440-5.
131. Omran, M.M., et al., *Role of myeloperoxidase in early diagnosis of acute myocardial infarction in patients admitted with chest pain*. J Immunoassay Immunochem, 2018. **39**(3): p. 337-347.
132. Govindarajan, S., V.M. Raghavan, and A.C. Rao, *Plasma Myeloperoxidase and Total Sialic Acid as Prognostic Indicators in Acute Coronary Syndrome*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(8): p. Bc09-13.
133. Kacprzak, M. and M. Zielinska, *Prognostic value of myeloperoxidase concentration in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention*. Int J Cardiol, 2016. **223**: p. 452-457.
134. Loria, V., et al., *Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 135625.
135. Cavusoglu, E., et al., *Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome*. The American journal of cardiology, 2007. **99**(10): p. 1364-1368.
136. Stamboul, K., et al., *Relation between high levels of myeloperoxidase in the culprit artery and microvascular obstruction, infarct size and reverse remodeling in ST-elevation myocardial infarction*. 2017. **12**(7): p. e0179929.
137. Akio Ogawa, M.Y.S., MD; Teruyo Yamashita, MD; and M.T.T. Ken-ichi Ogata, MD, *Difference in Elevation of N-Terminal Pro-BNP and Conventional Cardiac Markers Between Patients With ST Elevation vs Non-ST Elevation Acute Coronary Syndrome*.
138. Kunj, M., B. Kumar, and A. Kumar, *N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide as a Predictor of Complication and Mortality in Acute St Segment Elevation Myocardial Infarction*. 2017.
139. Thomas J. Wang, M.D., Martin G. Larson, Sc.D., Daniel Levy, M.D., M.D. Emelia J. Benjamin, Eric P. Leip, M.S., Torbjorn Omland, M.D., and M.D. Philip A. Wolf, and Ramachandran S. Vasam, M.D., *Plasma Natriuretic Peptide Levels and the Risk of Cardiovascular Events and Death*. The new england journal of medicine, 2004.
140. Bassan, R., et al., *B-type natriuretic peptide: a novel early blood marker of acute myocardial infarction in patients with chest pain and no ST-segment elevation*. Eur Heart J, 2005. **26**(3): p. 234-40.
141. Morrow, D.A., et al., *Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: B-type natriuretic peptide and prognosis in TACTICS-TIMI 18*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(8): p. 1264-72.

142. Fertin, M., et al., *Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2012. **110**(2): p. 277-83.
143. Daniels, L.B. and A.S. Maisel, *Natriuretic Peptides*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(25): p. 2357-2368.
144. Vargas, K.G., et al., *Copeptin for the early rule-out of non-ST-elevation myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2016. **223**: p. 797-804.
145. Parizadeh, S.M., et al., *The diagnostic and prognostic value of copeptin in cardiovascular disease, current status, and prospective*. 2018. **119**(10): p. 7913-7923.
146. Khan, S.Q., et al., *C-terminal proavopressin (copeptin) as a novel and prognostic marker in acute myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) study*. Circulation, 2007. **115**(16): p. 2103-10.
147. Keller, T., et al., *Copeptin improves early diagnosis of acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(19): p. 2096-106.
148. Reichlin, T., et al., *Incremental value of copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1): p. 60-8.
149. Shin, H., B.H. Jang, and T.H. Lim, *Diagnostic accuracy of adding copeptin to cardiac troponin for non-ST-elevation myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis*. 2018. **13**(7): p. e0200379.
150. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
151. Athar Khalil, A.K., Georges Nemer, *MicroRNAs and Myocardial Infarct: Investigating the Controversial Role of Second Generation Biomarkers*. Journal of Cholesterol and Heart Disease. 2017, 1 (1): p- 8-13.
152. Zhou SS, J.J., Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L, *miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges*. Acta Pharmacologica Sinica. 2018, 39(7): p-1073-1084.
153. Zhu, L., et al., *Diagnostic performance of microRNA-133a in acute myocardial infarction: A meta-analysis*. Cardiol J, 2018. **25**(2): p. 260-267.
154. Han, Z., et al., *Change of plasma microRNA-208 level in acute myocardial infarction patients and its clinical significance*. Ann Transl Med, 2015. **3**(20): p. 307.
155. Yao, X.-L., et al., *Circulating miR-122-5p as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**(12): p. 16014-16019.
156. D'Alessandra, Y., et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2010. **31**(22): p. 2765-73.

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Parte II

Relatório Final de Estágio Profissional

**Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa
Hospital CUF, Porto**

**2º ciclo de Estudos Conducentes ao Grau de Mestre em
Análises Clínicas**

Relatório de estágio realizada sob a orientação:

Dr. Fleming Torrinha,

Diretor Clínico

Maria Joana Lopes Santiago Rodrigues de Sousa

Junho de 2019

Agradecimentos

O presente trabalho não seria possível sem os incentivos e o apoio que recebi dos que me rodeiam, e deixo aqui o meu agradecimento a todos os que contribuíram de alguma forma para que este objetivo fosse cumprido.

Agradeço ao Dr. Fleming Torrinha, Dr. João Pessanha e Dra. Elsa Calado pela disponibilidade, orientação, apoio, críticas, e a grande colaboração com que me presentearam.

Agradeço aos meus colegas de trabalho pelo exemplo de profissionalismo que me deram.

Agradeço aos meus amigos que, nos momentos menos bons, sempre estiveram comigo.

Resumo

O presente trabalho constitui o relatório de estágio realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, Hospital CUF, Porto, elemento de avaliação final do 2º Ciclo de estudos conducentes ao Mestrado em Análises Clínicas (MAC) ministrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP).

Este relatório caracteriza-se por descrever, sucintamente, todo o trabalho laboratorial desenvolvido ao longo do estágio no Centro de medicina Laboratorial Germano de Sousa, sob orientação do Dr. Fleming Torrinha, Diretor Clínico, nas várias valências frequentadas (Imunoquímica clínica, Hematologia, Serologia e Microbiologia), destacando os equipamentos utilizados, parâmetros analíticos efetuados, o fundamento dos métodos, técnicas manuais e controlo de qualidade.

Palavras-chave: Imunoquímica, Hematologia, Microbiologia, Controlo de qualidade

Abstract

The present work constitutes the internship report carried out at the Germano de Sousa Laboratory Medical Center, Hospital CUF, Porto, element of final evaluation of the 2nd Cycle of studies leading to the Master in Clinical Analyzes (MAC) given by the College of Pharmacy of the University of Porto (FFUP).

This report is characterized by briefly describing all the laboratory work developed during the internship at the Germano de Sousa Laboratory Medical Center, under the guidance of Dr. Fleming Torrinha, Clinical Director, in the various valences attended (Clinical Immunochemistry, Hematology, Serology and Microbiology), highlighting the equipment used, analytical parameters performed, the basis of the methods, manual techniques and quality control.

Key words: Immunochemistry, Hematology, Microbiology, Quality control

Índice

Parte II – Relatório Final de Estágio Profissional

1.Introdução	1
2.Caracterização do serviço de Patologia Clínica do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML GS) - Hospital CUF Porto	2
2.1 Garantia de Qualidade	4
2.1.1 Fase pré-analítica	4
2.1.2 Fase analítica	7
2.1.3 Fase pós-analítica	7
2.1.4 Controlo de Qualidade Interno	8
2.1.5 Controlo de Qualidade Externo	9
2.2 Atividades desenvolvidas	10
3.Estágio em Imunoquímica clínica	11
3.1 Dimension EXL	12
3.1.1 Fundamento do método	12
3.1.2 Parâmetros realizados no equipamento Dimension EXL	13
3.2 ADVIA Centaur XP	17
3.2.1 Fundamento do método	18
3.2.2 Parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP	20
3.3 LIAISON XL	26
3.3.1 Parâmetros realizados no equipamento LIAISON XL	26
3.4 VIDAS	27
3.4.1 Testes realizados no equipamento VIDAS	27
3.5 AUTION MAX-4280	28
3.5.1 Fundamento do método	28
3.5.2 Parâmetros realizados no equipamento AUTION MAX-4280	29
3.6 Fluxo analítico	29

3.7 Atividades desenvolvidas na área de Imunoquímica Clínica	30
4. Estágio em Hematologia	31
4.1 Sysmex XE-2100	31
4.1.1 Fundamento do método	32
4.2 Hemograma	39
4.3 Valores de referência do Hemograma	40
4.4 Esfregaço Sanguíneo	41
4.5 Ves-Matic 30/30 Plus	44
4.5.1 Fundamento do método	44
4.5.2 Valores de referência de Velocidade de Sedimentação Globular	45
4.6 ADAMS A1C HA-8160	45
4.6.1 Fundamento do método	45
4.6.2 Valores de referência de hemoglobina glicada	46
4.7 Estudo da coagulação	46
4.7.1 Sysmex CA-500	46
4.7.2 Parâmetros realizados no equipamento Sysmex CA-500	47
4.8 Atividades desenvolvidas na área de Hematologia	47
5. Serologia/ Técnicas manuais	48
5.1 Serologia para <i>Treponema pallidum</i>	48
5.2 Serologia para Mononucleose Infeciosa	48
5.3 Serologia para <i>Brucella</i> spp.	48
5.4 Serologia Fator Reumatóide	49
5.5 Antígenos febris	49
6. Estágio em Microbiologia Clínica	50
6.1 Metodologia geral do estudo microbiológico	50
6.1.1 Exame Macroscópico	51
6.1.2 Exame Microscópico	51
6.1.3 Exame cultural	52

6.2 Métodos de identificação de Microrganismos isolados	54
6.2.1 Métodos manuais	54
6.2.2 Métodos automáticos	56
6.2.2.1 Vitek 2 Compact	56
6.3 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	57
6.3.1 Métodos manuais	57
6.3.2 Métodos automáticos	57
6.4 Processamento de produtos biológicos	58
6.4.1 Amostras de Urina	58
6.4.1.1 Procedimento Laboratorial em amostras de Urina	59
6.4.2 Amostras de Exsudado Vaginal	61
6.4.2.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Vaginal	62
6.4.3 Amostras de Exsudado Uretral	63
6.4.3.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Uretral	64
6.4.4 Pesquisa de Estreptococos do grupo B - Exsudado vaginal/ retal	64
6.4.4.1 Procedimento laboratorial para pesquisa de Estreptococos do grupo B - Exsudado Vaginal/Retal	65
6.4.5 Amostras de Exsudado Nasal	66
6.4.5.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Nasal	67
6.4.6 Amostras de Exsudado Orofaríngeo	69
6.4.6.1 Procedimento laboratorial em amostra de Exsudado Orofaríngeo	69
6.4.7 Amostras de Exsudado Auricular	70
6.4.7.1 Procedimento laboratorial em amostra de Exsudado Auricular	71

6.4.8 Amostra de Secreções	72
Respiratórias	
6.4.8.1 Procedimento laboratorial em amostras de Secreções Respiratórias	73
6.4.9 Exame cultural para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	74
6.4.9.1 Procedimento laboratorial para pesquisa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
6.4.10 Amostras de Exsudado Ocular	76
6.4.10.1 Procedimento laboratorial em amostra de Exsudado Ocular	76
6.4.11 Amostras Purulentas	78
6.4.11.1 Procedimento laboratorial em amostras Purulentas	78
6.4.11.2 Procedimento laboratorial em aspirados de amostras Purulentas	79
6.4.12 Amostras de Esperma	81
6.4.12.1 Procedimento laboratorial em amostras de Esperma	81
6.4.13 Amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares	82
6.4.13.1 Procedimento laboratorial em amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares	82
6.4.14 Amostras de Líquido Céfalo-Raquidiano	83
6.4.14.1 Procedimento laboratorial em amostras de Líquido Céfalo-Raquidiano	84
6.4.15 Amostras de Líquidos das Cavidades Serosas e Bile	85
6.4.15.1 Procedimento laboratorial das Cavidades Serosas e Bile	85
6.4.16 Amostras de Fezes	86
6.4.16.1 Procedimento Laboratorial em amostras de Fezes	87

6.4.16.2 Pesquisa de Sangue Oculto	88
6.4.16.3 Exame Parasitológico	88
6.4.16.4 Pesquisa de Toxina A e B de <i>Clostridium difficile</i>	88
6.4.17 Amostras de Sangue	88
6.4.17.1 Procedimento laboratorial em amostras de Sangue	89
6.4.18 Amostras de Cateter Venoso Central	90
6.4.18.1 Procedimento laboratorial em amostras de Cateter Venoso Central	91
6.4.19 Amostras para exame Micológico	92
6.4.19.1 Procedimento laboratorial de amostras para exame Micológico	92
6.5 Resistência aos Antibióticos	92
6.6 Atividades desenvolvidas na área de Microbiologia Clínica	95
7. Eliminação de resíduos	96
8. Conclusão	98

Índice de imagens

Figura 1 - Atenuação de luz monocromática por uma solução absorvente	12
Figura 2 - Imunoensaio do tipo Sandwich	18
Figura 3 - Imunoensaio competitivo - antígeno marcado com Éster de Acridina	19
Figura 4 - Imunoensaio competitivo - anticorpo marcado com Éster de Acridina	19
Figura 5 - Formato de captura de anticorpos	20
Figura 6 - Método SLS-Hb	32
Figura 7 - Contagem de células pelo método de focagem hidrodinâmica	33
Figura 8 - Citometria de fluxo	34
Figura 9 - Histograma executado no Sysmex XE-2100	37
Figura 10 - Diagrama esquemático do histograma executado no Sysmex XE-2100	38
Figura 11 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Urina	59

Figura 12 - Culturas puras de <i>Escherischia coli</i> e <i>Proteus mirabillis</i> após repicagem em meio CPS	61
Figura 13 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Vaginal	62
Figura 14 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Uretral	64
Figura 15 - Fluxograma procedimento laboratorial para pesquisa de estreptococos do grupo B - Exsudado Vaginal/ Retal	65
Figura 16 - Cultura de <i>Streptococcus agalactiae</i> em meio de Granada	66
Figura 17 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Nasal	67
Figura 18 - Cultura <i>Staphylococcus aureus</i> em meio Gelose Manitol	68
Figura 19 - Teste sensibilidade à Meticilina em meio Gelose Mueller-Hinton E	68
Figura 20 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Orofaríngeo	69

Figura 21 - Fluxograma procedimento laboratorial em mostras de Exsudado Auricular	71
Figura 22 - Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio Gelose Chocolate PolyviteX	72
Figura 23 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Secreções Respiratórias	73
Figura 24 - Cultura de <i>klebsiella pneumoniae</i> em meio Gelose Mac Conkey	74
Figura 25 - Cultura de BK em meio de Lowenstein-Jensen	75
Figura 26 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Ocular	76
Figura 27 - Halos de suscetiilidade em cultura de <i>Haemophilus</i> spp. no meio Gelose Mueller Hinton + 5% de sangue de cavalo	77
Figura 28 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras Purulentas	78
Figura 29 - Fluxograma procedimento laboratorial em aspirados de amostras Purulentas	79

Figura 30 - Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e Gelose de Chocolate PolyviteX	80
Figura 31 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Esperma	81
Figura 32 - Procedimento laboratorial em amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares	82
Figura 33 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de líquido Céfaló-Raquidiano	84
Figura 34 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Líquidos das Cavidades Serosas e Bile	85
Figura 35 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Fezes	87
Figura 36 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Sangue	89
Figura 37 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Cateter Venoso Central	91
Figura 38 - Prova de sinergismo em meio Gelose Mueller-Hinton E	93
Figura 39 - Teste RAPIDEC CARBA NP	94

Índice de tabelas

Tabela I: Equipamentos disponíveis no Laboratório Centro de Medicina Laboratorial - Hospital Cuf Porto	3
Tabela II: Periodicidade do controle interno de qualidade	8
Tabela III: Periodicidade do controle externo de qualidade	10
Tabela IV: Ensaios analíticos realizados no equipamento Dimension EXL	13
Tabela V: Valores de referência dos parâmetros realizados no equipamento Dimension EXL	16
Tabela VI: Parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP	20
Tabela VII: Valores de referência dos parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP	23
Tabela VIII: Parâmetros realizados no equipamento Liaison XL e respectivos valores de referência	26
Tabela IX: Parâmetros realizados no equipamento VIDAS e respectivos valores de referência	27
Tabela X: Parâmetros realizados no equipamento AUTION MAX-4280	29

Tabela XI: Valores de referência do Hemograma	40
Tabela XII: Valores de críticos de Hemograma	41
Tabela XIII: Observações no esfregaço sanguíneo	42
Tabela XIV: Valores de referência de Velocidade de Sedimentação Globular	45
Tabela XV: Parâmetros realizados no equipamento Sysmex CA-500 e respectivos valores de referência	47
Tabela XVI: Produtos processados no Laboratório de Microbiologia	51
Tabela XVII: Meios de cultura utilizados no Laboratório de Microbiologia	52
Tabela XVIII: Cartas de identificação sistema VITEK 2 Compact	56
Tabela XIX: Cartas de testes de sensibilidade aos antimicrobianos sistema VITEK 2 Compact	58
Tabela XX: Quantificação do sedimento urinário	60
Tabela XXI: Classes de resíduos	96

Abreviaturas

Ac - Anticorpo

Ag - Antigénio

BAAR - Bacilos álcool-ácido-resistentes

BASO - Basófilos

BHI - Meio de cultura de Cérebro e Coração

β -hCG - Hormona Gonadotrofina coriónica Humana

BNP - Péptido Natriurético Humano Tipo B

CA 19.9 - Antigénio Carboidratado 19.9

CA 125 - Antigénio Carboidratado 125

CA 15.3 - Antigénio Carboidratado 15.3

CAM - Gelose Campilose

CCI - Comissão de controlo da infeção

CEA - Antigénio Carcinoembrionário

Cl⁻ - Cloreto

CHGM - Concentração de hemoglobina globular média

CMI - Concentração mínima inibitória

CML GS - Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

CK-MB - Isoenzima MB da Creatina Cínase

CO₂ - Dióxido de Carbono

COS - Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro

CPS - Gelose ChromID™ CPS® Agar

CQI - Controlo de Qualidade Interno

CQE - Controlo de Qualidade Externo

CVC - Cateter Venoso Central

EA - Éster de Acridina

EBV - *Epstein-Barr*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELFA - *Enzyme linked fluorescent assay*

ESBL - Beta-lactamases de espectro alargado

FSH - Hormona Gonadotrófica Foliculoestimulante

FT3 - Triiodotironina Livre

FT4 - Tiroxina Livre

GRAN -Gelose Granada

Hb - Hemoglobina

HbA1c - Hemoglobina Glicada
HCT - Hematócrito
HGM - Hemoglobina globular média
HEKT - Gelose Hektoen
HIV - Vírus da imunodeficiência Humana tipo 1/2
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
INR - Razão de Normalização Internacional
INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISE - Eléctrodo Seletivo de Iões
K⁺ - Potássio
KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases
LBA - Lavado Broncoalveolar
LCR - Líquido Céfaloraquidiano
LH - Hormona Gonadotrófica Luteinizante
MCK - Meio de Cultura Mac Conkey
MHE - Gelose Mueller Hinton E
MSA2 - Gelose Manitol
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina
Na⁺ - Sódio
NEQAS - *UK National External Quality Assessment Scheme*
PLT- Plaquetas
PPM - Partículas paramagnéticas
PRP - *Rapid Plasma Reagin*
PSA - Antígeno Específico da Próstata
PTH - Paratormona
PVX - Gelose Chocolate PolyViteX
RBC - Glóbulos vermelhos
SEQC - *Sociedad Española De Bioquímica Clínica Y Patología Molecular*
SGB - Estreptococos do grupo B
SGC2 - Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2
SLS - Surfactante laurilsulfato de sódio
T3 - Triiodotironina Total
T4 - Tiroxina Total
TPHA - *Treponema pallidum Hemagglutination*
TSA - Teste de sensibilidade aos antibióticos

TSH - Hormona Estimulante da Tiróide
VCA - Antígenos virais da cápside
VCAT3 - Gelose Chocolate PolyViteX VCAT3
VGM - Volume globular médio
VPM - Volume plaquetário médio
VSG - Velocidade de sedimentação globular
WBC - Glóbulos brancos

1. Introdução

O presente relatório de estágio pretende descrever as atividades que acompanhei e realizei durante o estágio curricular no âmbito do curso de Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O estágio decorreu por um período de 450 horas no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF - Porto, sob a orientação do Diretor Clínico Dr. Fleming Torrinha, Médico Patologista, nas valências de Imunoquímica clínica, Hematologia e Serologia. O estágio na valência de Microbiologia decorreu sob a orientação da Dra. Elsa Calado, Médica Patologista Microbiologista, no mesmo local.

Neste relatório pretendo descrever sucintamente todo o trabalho laboratorial desenvolvido ao longo do estágio, destacando os equipamentos utilizados, parâmetros analíticos efetuados, o fundamento dos métodos, técnicas manuais e o controlo de qualidade.

O Laboratório tem implementado um sistema informático de gestão laboratorial - programa "Apollo", em rede com o sistema de gestão de doentes do Hospital CUF (Glint). Em todos os postos de colheita foi implementado o WebApollo, o que permite um acesso mais rápido aos resultados do utente, e atender às necessidades de resposta rápida solicitadas pelos utentes. O sistema informático está concebido e implementado para evitar erros, e respeitar a confidencialidade dos dados que contém. Os serviços encontram-se todos informatizados, ao longo de todas as etapas, desde a abertura de fichas dos utentes até à emissão de resultados, o que facilita o trabalho nas áreas pré-analítica, analítica e pós-analítica no laboratório de Análises Clínicas.

A qualidade e o rigor são valores que orientam a política de qualidade do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, pelo que o sistema de gestão de qualidade do laboratório foi definido, implementado, e é mantido e melhorado de acordo com as cláusulas da Norma NP EN ISO 9001:2008, Manual das Boas Práticas Laboratoriais (Despacho nº8835/ 2001 27 de Abril), e restantes requisitos legais e regulamentares aplicáveis.

2. Caracterização do serviço de Patologia Clínica do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML GS) - Hospital CUF Porto

O Grupo Germano de Sousa é uma organização privada que exerce a sua atividade no âmbito das Análises Clínicas, nomeadamente no laboratório CML GS Porto.

Recursos Humanos CML GS CUF Porto

Diretor Clínico: Dr. José Luís Pinto de Oliveira Fleming Torrinha

Diretor Clínico substituto: Dra. Elsa Maria de Senna Fernandes Calado

Responsável da qualidade: Dra. Eduarda Figueiredo

Equipa técnica

- 3 Patologistas Clínicos
- 3 Farmacêuticos Especialistas em Análises Clínicas
- 15 Técnicos de Análises Clínicas
- 1 Administrativo

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa localizado no Hospital CUF Porto, é uma unidade multifuncional que presta atividade assistencial aos doentes do serviço de internamento, consultas externas, serviço de urgência e ambulatório.

O laboratório de Patologia Clínica é constituído por uma central de colheitas (Piso 0) e por uma área laboratorial (Piso 1) compatível com as valências que executa. Esta última dispõe de áreas próprias claramente identificadas:

- Receção
- Área administrativa
- Área de triagem de amostras
- Laboratório Central (valência de Imunoquímica clínica, Hematologia e Serologia)
- Laboratório de Microbiologia
- Laboratório de Citometria de fluxo

- Sala de lavagem de material
- Armazém de reagentes
- Área de eliminação de resíduos

Com o objetivo de minimizar ao máximo o erro humano, e permitindo a evidência de todas as operações realizadas, o laboratório possui diversos equipamentos automatizados garantindo o rigor e a qualidade dos processos pré-analítico, analítico e pós-analítico (Tabela I).

Tabela I: Equipamentos disponíveis no Laboratório Centro de Medicina Laboratorial - Hospital CUF Porto

Área Laboratorial	Equipamento	Fornecedor
Imunoquímica Clínica	Dimension EXL	Siemens
	VIDAS	bioMérieux
	Advia Centaur XP	Siemens
	LIAISON XL	DiaSorin
	AUTION MAX-4280	Ménarini
Hematologia	Sysmex XE-2100	Emílio Azevedo Campos
	Ves-Matic 30/30 Plus	Ménarini
	ADAMS A1C HA-8160	Ménarini
	Sysmex CA-500	Siemens
Microbiologia	Vitek 2 Compact	bioMérieux
	Bactec 9050	Blood Culture System

Horário de Funcionamento Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML GS) - Hospital CUF Porto

- Central de Colheitas: Dias úteis: 7:30H - 16:00H
Sábados: 7:30H - 11:30H
- Área Laboratorial: 24 horas/ dia, 7 dias por semana

2.1 Garantia de Qualidade

O centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa tem como missão, o dever e a responsabilidade médica, técnica, científica e humana, de dar aos que nele confiam um saber e uma resposta de qualidade, visando a obtenção de valores exatos e fiáveis dos resultados analíticos.

No âmbito da execução dos exames laboratoriais, o laboratório estabeleceu processos e metodologias de forma a garantir as condições de qualidade nos serviços prestados, e nos resultados obtidos, de modo a que tenham utilidade clínica. O desempenho desses processos é verificado e avaliado através de auditorias, do acompanhamento de objetivos, sendo planeadas ações que garantam o seu cumprimento, e conduzam a melhorias de desempenho.

A garantia de qualidade aplica-se a todas as atividades e processos com influência direta e indireta nos resultados, e na qualidade do serviço a fornecer no âmbito da realização de Análises Clínicas, e compreende três fases distintas:

- A fase pré-analítica, que envolve todos os procedimentos que antecedem a execução da análise;
- A fase analítica que compreende todo o processamento técnico dado á amostra para obtenção de resultados analíticos;
- A fase pós-analítica que está relacionada com a validação dos resultados executados.

A atividade laboratorial está integrada num programa de garantia do controlo de qualidade laboratorial interno e externo, e respeita o cumprimento escrupuloso do Manual de Boas Práticas Laboratoriais em Patologia Clínica.

2.1.1 Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inicia-se através do contacto direto com o utente, que apresenta a requisição de exames laboratoriais feita pelo médico prescritor.

Caso se verifique na requisição apresentada exames laboratoriais que necessitem de preparação prévia para a sua realização, são fornecidas ao utente as instruções referentes aos procedimentos pré-analíticos, de acordo com os procedimentos constantes no “Manual

de Colheitas”, podendo ser entregue por escrito as instruções de preparação para a(s) colheita(s) a realizar.

Os pedidos de análises são inseridos na plataforma informática. O sistema emite códigos de barras que vão identificar todos os produtos biológicos necessários para a execução da(s) a(s) análise(s) solicitada(s).

Uma vez na sala de colheitas, o flebotomista confirma junto do utente a sua identificação, e quando necessário, confirma ainda se o utente cumpriu as instruções das condições especiais a serem observadas para algumas análises, como o jejum, dieta, assepsia, medicação.

Em seguida procede à etiquetagem de todos os tubos que vai utilizar para efetuar a colheita, de modo a garantir que todas as amostras colhidas estão devidamente identificadas com códigos de barras, onde conste o nome do paciente e a informação do serviço a que se destina. O flebotomista procede á colheita utilizando material esterilizado e não reutilizável (1).

Face às especificidades analíticas de cada procedimento na colheita de amostras de sangue, é extremamente importante a utilização de um anticoagulante específico em função do(s) parâmetro(s) a determinar (Anexo 1) (2).

A colheita de amostras para exame microbiológico (urina, fezes, exsudados, expetoração, esperma, cabelos, unhas, etc.), são realizadas de acordo com procedimentos próprios, visando manter a viabilidade dos microrganismos mais sensíveis, evitando a contaminação da amostra com flora saprófita, ou com microrganismos do meio ambiente.

Em caso de dúvida, o flebotomista deve consultar o Manual de colheitas para obter um melhor esclarecimento das etapas fundamentais na execução de exames laboratoriais, nomeadamente o tipo de amostra, a sua conservação, as condições pré-analíticas que se devem respeitar, o método pelo qual é executado e o tempo de resposta para cada parâmetro.

O acondicionamento das amostras biológicas é fundamental para evitar possíveis alterações dos resultados analíticos. É da responsabilidade dos técnicos garantir que as amostras se encontram devidamente acondicionadas, e nas condições térmicas ideais (refrigeradas / temperatura ambiente) para o transporte, de acordo com o que está definido para as diferentes análises no Manual de colheitas.

Todas as amostras biológicas são registadas informaticamente quando dão entrada no laboratório, devendo o técnico responsável proceder à sua verificação através da leitura

dos respetivos códigos de barra. O técnico responsável pela triagem deve confirmar sempre se o nome e o número da amostra são os mesmos que aparecem no sistema informático.

Após a centrifugação, as amostras são analisadas visualmente para verificar se apresentam as condições exigidas à continuidade do processo.

Caso as amostras estejam hemolisadas, deve registar-se a ocorrência, e deve consultar-se informaticamente as análises pedidas. Caso a hemólise interfira com a execução das análises pedidas, o utente tem de ser convocado para nova colheita.

As amostras biológicas devem ser rejeitadas nos seguintes casos (3):

- Amostras colhidas / rececionadas em tubos ou recipientes diferentes dos indicados no Manual de colheitas;
- Amostras biológicas cujos volumes colhidos não respeitem as indicações volumétricas assinaladas nos respetivos tubos;
- Amostras biológicas sem qualquer identificação;
- Tubos mal fechados, sujos ou a verter;
- Amostras biológicas que se considerem indevidos para a determinação da análise a que respeitam (ex: amostras coaguladas).

Após a triagem atenta de todos os produtos, procede-se à realização das análises. Para isso, as amostras são colocadas em suportes ou tabuleiros das secções a que se destinam, e entregues aos responsáveis para o seu processamento analítico.

2.1.2 Fase analítica

A fase analítica corresponde a todo o processamento técnico dado á amostra para obtenção de resultados analíticos. As etapas que compreendem esta fase são:

- Execução de procedimentos predefinidos de limpeza, tais como a realização de manutenções diárias, semanais, mensais e anuais dos equipamentos automatizados, de acordo com as especificações dos respetivos fabricantes, e de acordo com as instruções que constam no manual de instruções do equipamento;

Os equipamentos controlados através de manutenção periódica são geridos por um plano de manutenção. Estas operações, bem como reparações de assistência técnica, ficam registadas por escrito no livro de ocorrências de cada aparelho;

- Utilização do material necessário ao funcionamento dos aparelhos em conformidade com as normas especificadas pelos fabricantes, como por exemplo, áreas de armazenamento, com a temperatura adequada às matérias primas, reagentes e consumíveis;
- Os reagentes preparados ou reconstituídos no laboratório exibem sempre a data de preparação ou reconstituição, e a data limite de validade, respeitando sempre as instruções sobre as condições de armazenamento em conformidade com as especificações da bula técnica;
- Utilização diária de amostras de controlo de qualidade interno antes do início da atividade técnica, e após a realização de calibrações e manutenções;
- Monitorização periódica de cartas de controlo de qualidade interno;
- Utilização de amostras de controlo de concentração desconhecida para avaliação externa da qualidade.

2.1.3 Fase pós-analítica

A fase pós-analítica compreende a validação dos resultados obtidos pelo Patologista Clínico, a quem compete assegurar a compatibilidade dos resultados, ou do conjunto de análises realizadas, com os fatores demográficos (idade, sexo, raça), a informação clínica (diagnóstico, terapêutica e estado fisiológico), e o histórico do doente.

Por fim, são enviados os resultados ao utente ou ao médico, contribuindo para a facilitação do diagnóstico definitivo ou de uma proposta terapêutica.

2.1.4 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) é feito a nível intralaboratorial e consiste na análise diária de “amostra controlo” com diferentes níveis de concentração, cujos valores analíticos são conhecidos, e desta forma avalia a precisão dos ensaios (4).

Para a avaliação da precisão são criados gráficos de Levey-Jennings, para os níveis de controlo de cada parâmetro. A análise destes gráficos permite avaliar o comportamento dos controlos através da aplicação das regras de Westgard, e em conformidade com os valores de referência instituídos pelas bulas controlo (5).

A análise é efetuada por parâmetro e por níveis de execução. É um processo extremamente importante na rotina laboratorial, uma vez que permite a reprodutibilidade dos resultados, e tem como objetivo a validação dos métodos analíticos e a aplicação de ações corretivas, caso haja alguma não conformidade. Sempre que se verifique um desvio sobre os limites de aceitação definidos, são desencadeadas as ações corretivas convenientes, ou seja, repetição da amostra controlo com alíquota fresca, calibração do ensaio caso se justifique, e se mesmo assim persistirem desvios é contactada a casa fornecedora.

Em cada um dos equipamentos, distribuídos pelas diferentes áreas, são feitos controlos específicos (Tabela II).

Tabela II: Periodicidade do controlo interno de qualidade

Equipamento	Valência	Monitorização	Periodicidade
Sysmex XE-2100	Hematologia	3 Níveis alternados	Diária
Ves-Matic 30/30 Plus	Hematologia	2 Níveis	Diária
Sysmex CA-500	Hematologia	2 Níveis	Diária
ADAMS A1C HA-8160	Hematologia	2 Níveis alternados	Diária

Dimension EXL	Química Clínica	3 Níveis alternados	Diária
AUTION MAX-4280	Química Clínica	2 Níveis alternados	1x semana
VIDAS	Imunologia	2 Níveis	1 x semana
Advia Centaur XP	Imunologia	2 Níveis alternados	Diária
LIAISON XL	Imunologia	2 Níveis alternados	Diária

2.1.5 Controlo de Qualidade Externo

O controlo de qualidade externo (CQE) permite a avaliação de desempenho do serviço do laboratório através de programas efetuados por uma entidade externa, que disponibilizam amostras com valores não conhecidos pelo laboratório (4).

A participação nos programas de CQE é uma ferramenta estatística da qualidade, e tem como objetivo assegurar que os resultados obtidos nos parâmetros analisados se aproximam do valor real (exatidão) (5). O resultado de cada parâmetro analisado no laboratório participante é comparado com os restantes laboratórios do seu grupo.

O controlo externo de qualidade utilizado no Laboratório é o NEQAS (UK National External Quality Assessment Scheme) e o SEQC (Sociedad Española De Bioquímica Clínica Y Patología Molecular) (Tabela III).

Tabela III: Periodicidade do controlo externo de qualidade

Equipamento	Valência	Periodicidade
Sysmex XE-2100	Hematologia	12 x ano
Systemex CA-500	Hematologia	12 x ano
ADAMS A1C HA-8160	Hematologia	12 x ano
Dimension EXL	Química Clínica	12 x ano
AUTION MAX- 4280	Química Clínica	12 x ano
VIDAS	Imunologia	12 x ano
Advia Cantaur XP	Imunologia	12 x ano/ Trimestral
LIAISON XL	Imunologia	Trimestral

2.2 Atividades desenvolvidas

- Particpei e executei os procedimentos necessários nas diferentes fases de execução dos exames laboratoriais;
- Realizei funções na execução de colheitas, seguindo os procedimentos das normas de colheita, nomeadamente o tipo de anticoagulante a utilizar, a preparação adequada dos utentes e cumprimento de regras de higiene e segurança;
- Tomei conhecimento de fatores de variabilidade pré-analítica e das principais causas de erro que ocorrem nesta fase;
- Executei e participei no processamento de amostras biológicas e realização do controlo interno e externo da qualidade.

3. Estágio em Imunoquímica clínica

Laboratório/ Serviço	Duração	Período de estágio
Valência de Imunoquímica Clínica, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF	150 horas	5 de Março de 2018 a 30 de Março de 2018

Responsável pela valência de Imunoquímica Clínica: Dr. Armando Manuel Henriques Santos Moura, Licenciado em Farmácia, Especialista em Análises Clínicas

O sector de Imunoquímica Clínica está inserido no Laboratório Central, e o espaço físico compreende uma sala ampla onde se efetua todo o processamento de amostras após a triagem, preparação para os testes requisitados, execução de técnicas manuais e automatizadas, análise e validação de resultados.

No Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF os serviços de rotina e urgência encontram-se separados, funcionando a urgência em regime de turnos, 24 horas por dia. Os pedidos provenientes do serviço de urgência, internamento ou consulta externa são considerados prioritários.

O maior volume de amostras recebidas no sector de Imunoquímica para processamento das análises são amostras de soro e urina.

O sangue é colhido em tubos de gel, e após ocorrer a retração do coágulo, são centrifugados a 3500 rpm durante 10 min de modo a obterem-se amostras de soro.

Relativamente às amostras de urina, estas podem chegar em pequenos contentores onde são analisadas quimicamente, ou em contentores de urina de 24 horas, onde é necessário proceder á leitura do volume da urina, e posteriormente proceder-se à determinação dos parâmetros bioquímicos.

3.1 Dimension EXL

O Dimension EXL consiste num analisador bioquímico clínico automatizado, com capacidade de dosear diversos parâmetros analíticos em soro humano, plasma, urina e outros fluídos corporais. O sistema de química clínica integrada funciona através de cartuchos de reagentes de múltiplos testes (*flex*), cuvetes de reação descartáveis, e tecnologia de microssensores integrados (QuikLYTE Integrated Multisensor Technology), de forma a fornecer resultados rápidos, precisos e exatos (6).

3.1.1 Fundamento do método

Espectrofotometria/ Colorimetria - Método que se baseia na medida de intensidade de luz absorvida por uma amostra, quando incidida por um feixe de luz monocromática num determinado comprimento de onda. Quando um feixe de luz incide numa cuvette que contém uma solução, esta absorve e transmite luz numa intensidade inferior à da luz incidente (Fig.1). Esta capacidade de uma substância absorver radiação, é definida como absorvância. A absorvância é proporcional à concentração do analito que se pretende quantificar ou inversamente proporcional ao logarítmo da luz transmitida, em relação à luz incidente, que é determinada por extrapolação gráfica com base na Lei de Lambert Beer (7).

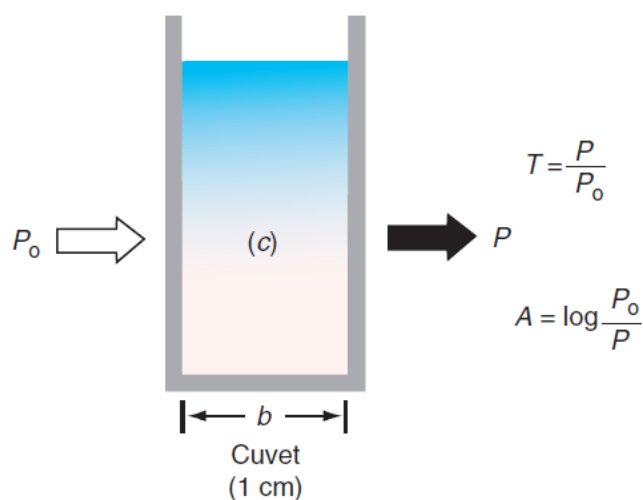


Figura 1 - Atenuação de luz monocromática por uma solução absorvente. (A) Absorvância, (P_0) luz incidente, (P) luz transmitida (retirado de Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods)(7)

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se em testes colorimétricos através da medição das variações de absorção na zona visível (400 e 700 nm). Os métodos envolvem reações enzimáticas, que podem ser determinadas num tempo fixo (método ponto final) ou numa determinação contínua da atividade enzimática (método cinético) (4).

Turbidimetria – A Turbidimetria é uma medida da diminuição da intensidade da luz incidente que atravessa uma solução de partículas, estando dependente da concentração e tamanho das partículas presentes numa solução (4).

Este método baseia-se na formação de imunocomplexos Ag/Ac in vitro, de forma a aumentar a turbidez no meio reacional, levando à diminuição do feixe de luz incidente que atravessa a solução.

Potenciometria – Técnica eletroquímica que se baseia na diferença de potencial de um eléctrodo indicador em relação a um eléctrodo de referência. O eléctrodo com uma voltagem constante é denominado por eléctrodo de referência. O eléctrodo de medição é denominado por eléctrodo indicador. O eléctrodo indicador utilizado é um eléctrodo seletivo de iões (ISE), constituído por uma membrana com permeabilidade seletiva para os aniões, ou catiões que se pretende analisar (Na^+ , K^+ , Cl^-). A concentração de iões numa solução, pode ser calculada a partir da diferença de potencial medida entre os dois eléctrodos (7).

O Dimension EXL possui um sistema específico com o sensor QuikLYTE Integrated Multisensor Technology, que desenvolve um potencial eléctrico proporcional à atividade de cada ião na amostra, sendo esse potencial comparado com o potencial eléctrico de uma solução standard (6).

3.1.2 Parâmetros realizados no equipamento Dimension EXL

Tabela IV: Ensaios analíticos realizados no equipamento Dimension EXL (8)

Parâmetro	Produto	Método
Avaliação do metabolismo dos Hidratos de Carbono		
Glicose	Soro, plasma, urina e LCR	Técnica bicromática de ponto final (hexoquinase)
Lípidos		

Triglicéridos	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (lípase, glicerol-3-fosfato-oxidase, glicerol quinase, peroxidase)
Colesterol Total	Soro, plasma	Técnica policromática de ponto final (colesterol esterase/oxidase/peroxidase)
Colesterol HDL	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (colesterol esterase/oxidase/peroxidase após formação de complexos de VLDL e LDL resistentes às enzimas)
Colesterol LDL	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (colesterol esterase/oxidase/peroxidase após dissolução das lipoproteínas não LDL)
Avaliação da função renal		
Creatinina	Soro, plasma, urina	Técnica cinética bicromática (método de Jaffé modificado)
Clearance da Creatinina	Urina	Cálculo: $CL \text{ (mL/min)} = (\text{CrUrina} / \text{CrSoro}) \times (\text{Vol. (mL)} / 1440 \text{ min.})$
Ureia	Soro, plasma, urina	Técnica cinética bicromática (urease, glutamato desidrogenase/NADH)
Avaliação da função hépato-biliar		
Alanina Aminotransferase	Soro, plasma	Técnica cinética bicromática (malato desidrogenase)
Aspartato Aminotransferase	Soro, plasma	Técnica cinética bicromática (lactato desidrogenase)
Fosfatase Alcalina	Soro, plasma	Técnica cinética bicromática (p-nitrofenilfosfato)
Gama – Glutamiltransferase	Soro, plasma	Técnica cinética bicromática (substrato: γ glutamil-3-carboxi-4-nitroanilina)
Bilirrubina Total	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (ácido sulfanílico diazotado)
Bilirrubina Direta	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (ácido sulfanílico diazotado)
Produtos do metabolismo		
Ácido Úrico	Soro, plasma, urina	Técnica bicromática de ponto final (uricase/peroxidase)
Avaliação da função pancreática		
Amilase	Soro, plasma, urina	Técnica cinética bicromática (2-cloro-nitrofenil- α -D-maltotriósídeo)
Avaliação do metabolismo das proteínas		
Proteínas Totais	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (biureto)
Proteínas Totais	Urina, LCR	Técnica bicromática de ponto final (vermelho de pirogalol)

Albumina	Soro, plasma	Técnica policromática de ponto final (púrpura de bromocresol)
Avaliação da função cardíaca		
Creatina Cinase	Soro, plasma	Técnica bicromática (fosfato de creatina)
Creatina Cinase isoenzima MB	Soro, plasma	Técnica bicromática (fosfato de creatina após inibição da subunidade M)
Lactato Desidrogenase	Soro, plasma	Reação cinética (L-Lactato)
Estudo do metabolismo do Ferro		
Ferro	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (Ferene)
Transferrina	Soro, plasma	Técnica bicromática de ponto final (polietienoglicol)
Marcadores de inflamação		
Proteína C reativa	Soro, plasma	PETIA*
Equilíbrio eletrolítico e iões inorgânicos		
Sódio	Soro, plasma urina, líquidos biológicos	Potenciometria indireta - Tecnologia de Mutisensor integrado (IMT)
Potássio	Soro, plasma urina, líquidos biológicos	Potenciometria indireta - Tecnologia de Mutisensor integrado (IMT)
Cloro	Soro, plasma urina, líquidos biológicos	Potenciometria indireta - Tecnologia de Mutisensor integrado (IMT)
Cálcio	Soro, plasma, urina	Técnica bicromática de ponto final (O-cresoltaleina complexona)
Fosfato	Soro, plasma, urina	Técnica bicromática de ponto final (Fosfomolibdato)
Magnésio	Soro, plasma, urina	Técnica bicromática de ponto final (azul de metiltimol)

*PETIA – Técnica de imunoensaio turbidimétrico melhorado de partículas

Tabela V: Valores de referência dos parâmetros realizados no equipamento Dimension EXL

Parâmetro	Valores de Referência
Avaliação do metabolismo dos Hidratos de Carbono	
Glicose	70 - 110 mg/dL
Lípidos	
Triglicérides	40 - 150 mg/dL
Colesterol Total	<190 mg/dL
Colesterol HDL	40 - 60 mg/dL
Colesterol LDL	<160 mg/dL
Avaliação da função renal	
Creatinina	0,70 - 1,30 mg/dL
Clearance da Creatinina	71 - 151 mL/ min (24H)
Ureia	Soro: 7 - 18 mg/dL Urina: 7 - 20 g/mL (24H)
Avaliação da função hépato- biliar	
Alanina Aminotransferase	16 - 63 U/L
Aspartato Aminotransferase	15 - 37 U/L
Fosfatase Alcalina	46 - 116 U/L
Gama – Glutamiltransferase	15 - 85 U/L
Bilirrubina Total	0,20 - 1,00 mg/dL
Bilirrubina Direta	<0,20 mg/dL
Produtos do metabolismo	
Ácido úrico	2,5 - 6,0 mg/dL
Avaliação da função pancreática	
Amilase	Soro: 25 - 115 U/L Urina: 59 - 401 U/L
Avaliação do metabolismo das proteínas	
Proteínas Totais	5,7- 8,2 g/dL
Albumina	3,4 - 5,0 g/dL
Avaliação da função cardíaca	
Creatina Cinase	Homem: 39 - 308 U/L Mulher: 26 - 192 U/L
Creatina Cinase isoenzima MB	7 - 25 U/L

Lactato Desidrogenase	85 - 227 U/L
Estudo do metabolismo do Ferro	
Ferro	65 - 175 mg/dL
Transferrina	215 - 365 mg/dL
Marcadores de inflamação	
Proteína C reativa	0,050 - 1,000 mg/dL
Equilíbrio eletrolítico e iões inorgânicos	
Sódio	Soro: 136 - 145 mmol/L
	Urina: 40 - 220 mmol/mL (24H)
Potássio	Soro: 3,5 - 5,1 mmol/L
	Urina: 25 - 125 mmol/mL (24H)
Cloro	Soro: 98 - 107 mmol/L
	Urina: 110 - 250 mmol/mL (24H)
Cálcio	Soro: 8,7 - 10,4 mg/dL
	Urina: 43 - 353 mg/dL
Fosfato	Soro: 2,4 - 5,1 mg/dL
	Urina: 0,4 - 1,3 g/mL (24H)
Magnésio	Soro: 1,3 - 2,7 mg/dL
	Urina: 24 - 255 g/ mL (24H)

3.2 ADVIA Centaur XP

O sistema ADVIA Centaur XP é um analisador automático de imunoensaio que utiliza a tecnologia de quimiluminescência direta.

A quimiluminescência é uma reação química, que emite energia em forma de luz quando um eletrão retorna de um nível de energia excitado ou mais alto, para um nível de energia inferior (4).

Os ensaios do ADVIA Centaur XP utilizam “Éster de Acridina” (EA) como o marcador quimioluminescente no Reagente Lite e as PPM (partículas paramagnéticas) como fase sólida, utilizando uma variedade de formatos para detetar antigénios (Ag) e anticorpos (Ag) (9).

3.2.1 Fundamento do método

- Imunoensaio do tipo Sandwich

Os formatos do tipo sanduíche utilizam um anticorpo marcado com EA, que se liga especificamente ao antígeno específico do analito na amostra. A Fase Sólida que contém as PPM revestidas com anticorpos específicos do antígeno na amostra, ligam-se aos antígenos, que estão ligados ao anticorpo marcado com EA formando o Complexo PPM-Anticorpo-Antígeno-Anticorpo-EA (Fig.2).

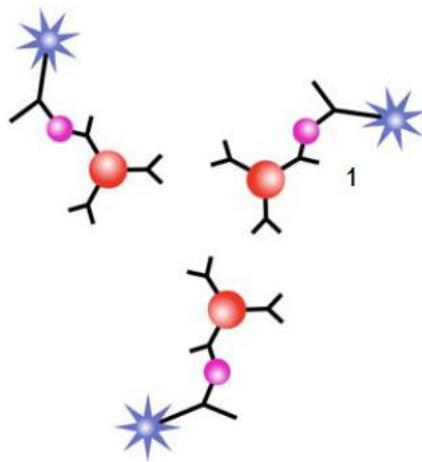


Figura 2 - Imunoensaio do tipo Sandwich (1) Complexo PPM-Anticorpo-Antígeno-Anticorpo-EA. Retirado de ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador (9)

Num formato do tipo Sandwich, o sistema mede a emissão de luz em unidades relativas de luz (RLUs) produzida pela oxidação do EA, sendo diretamente proporcional à concentração do antígeno.

- Imunoensaio competitivo apresenta dois tipos:
 - Antígeno marcado com EA compete com o Ag da amostra para os mesmos locais de ligação ao Anticorpo que está ligado às micropartículas paramagnéticas (Fig.3)
 - Anticorpo marcado com EA para o qual vai competir com o Ag específico do analito na amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas com Ag (Fig.4)

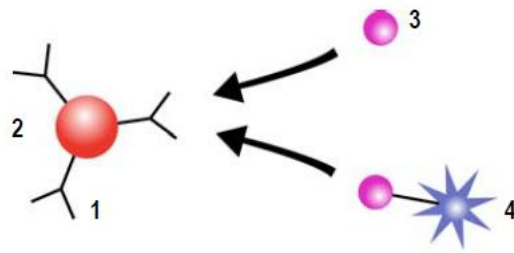


Figura 3 - Imunoensaio competitivo - Antígeno marcado com Éster de Acridina (1) Anticorpo, (2) PPM, (3) Antígeno específico do analito na amostra, (4) Antígeno marcado com EA. Retirado de ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador (9)

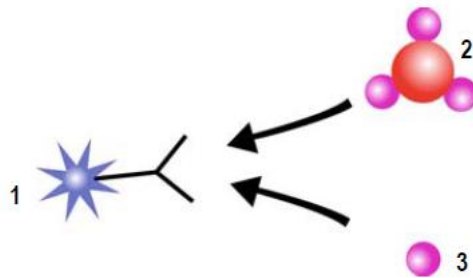


Figura 4 - Imunoensaio competitivo - Anticorpo marcado com Éster de Acridina (1) Anticorpo marcado com EA, (2) Antígeno marcado com PPM, (3) Antígeno específico do analito na amostra. Retirado de ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador (9)

Num ensaio competitivo, a concentração de antígeno ou anticorpo presentes na amostra e a emissão de luz em RLUs são inversamente proporcionais.

- Formato de captura de anticorpo

O sistema utiliza um Ac monoclonal que reveste a fase sólida, e que é especificamente direcionado contra o anticorpo na amostra (Fig.5). Os ensaios de captura de anticorpos detetam anticorpos IgG ou anticorpos IgM específicos nas amostras dos doentes.

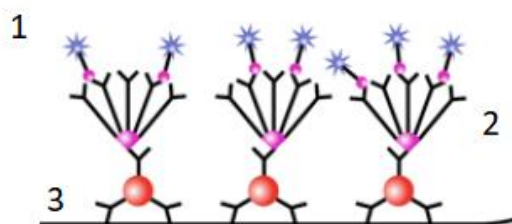


Figura 5 - Formato de captura de anticorpos (1) Antígeno marcado em EA (2) Anticorpo Humano específico da amostra (3) Anticorpo anti – humano ligado às PPM. Adaptado de ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador (9)

No ensaio de captura de anticorpos, quanto mais anticorpos (IgG ou IgM) estiverem presentes na amostra, mais EA estará presente, pelo que a emissão de luz será maior, tendo uma relação direta.

3.2.2 Parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP

Tabela VI: Parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP (10)

Parâmetro	Produto	Método
Marcadores Tumorais		
Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Antígeno Carboidratado 19.9 (CA 19.9)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Antígeno Carboidratado 125 (CA 125)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Antígeno Carboidratado 15.3 (CA 15.3)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich

Antigénio Específico da Próstata (PSA)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Antigénio Específico da Próstata Livre (PSA Livre)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Alfa – fetoproteína	Soro, líquido amniótico	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Avaliação da função endócrina pancreática		
Insulina	Soro, Plasma	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Estudo da função endócrina		
Hormona Estimulante da Tiróide (TSH)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Tiroxina Total (T4)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Triiodotironina Total (T3)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Tiroxina Livre (FT4)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Triiodotironina Livre (FT3)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Estradiol	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Progesterona	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Gonadotrofina Coriónica Humana	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Testosterona	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Hormona Gonadotrófica Luteinizante (LH)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Hormona Gonadotrófica Foliculoestimulante (FSH)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich

Prolactina	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Estudo do metabolismo do cálcio e patologia óssea		
Paratormona (PTH)	Soro, Plasma	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Estudo das anemias		
Ferritina	Soro, Plasma	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Ácido Fólico	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Vitamina B12	Soro, Plasma	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Monitorização de Fármacos		
Ácido Valpróico	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Serologia das infeções víricas		
Vírus da imunodeficiência Humana tipo 1/2 (HIV)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Antigénio de superfície da Hepatite B (HBsAg)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Anticorpos totais do Antigénio de superfície da Hepatite B (aHBs2)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Anticorpos totais para o antigénio central do vírus da Hepatite B (HBcT)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich
Anticorpos IgM para o antigénio central da hepatite B (aHBcM)	Soro	Quimioluminiscência - Formato de captura de anticorpo

Anticorpos totais contra o vírus da Hepatite A (aHAVT)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio competitivo
Anticorpos IgM para o vírus da Hepatite A (aHAVM)	Soro	Quimioluminiscência - Formato de captura de anticorpo
Anticorpos de imunoglobulina G (IgG) para o vírus da hepatite C (HCV)	Soro	Quimioluminiscência - Imunoensaio do tipo Sandwich

Tabela VII: Valores de referência dos parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur XP

Parâmetro	Valores de Referência	
Marcadores Tumorais		
Antigénio Carcinoembrionário (CEA)	Não Fumadores	Fumadores
	<5,0 ng/mL	<6,5 ng/mL
Antigénio Carboidratado 19.9 (CA 19.9)	<27 U/mL	
Antigénio Carboidratado 125 (CA 125)	<35 U/mL	
Antigénio Carboidratado 15.3 (CA 15.3)	<28,5 U/mL	
Antigénio Específico da Próstata (PSA)	Idade (anos)	Valor Referência
	<40	<1,4 ng/mL
	40 – 49	<2,0 ng/mL
	50 – 59	<3,1 ng/mL
	60 – 69	<4,1 ng/mL
	70 – 79	<4,4 ng/mL
Antigénio Específico da Próstata Livre (PSA Livre)	% PSA Livre é a relação entre o PSA livre e o PSA total X 100	
Alfa – fetoproteína	<0,20 ng/mL	
Avaliação da função endócrina pancreática		
Insulina	3,0 – 25,0 mcUI/mL	

Estudo da função endócrina		
	Idade (anos)	Valor.Referência
Hormona Estimulante da Tiróide (TSH)	2 - 12	0,64 – 6,27 mUI/L
	12 – 18	0,51 – 4,94 mUI/L
	>18	0,55 – 4,78 mUI/L
Tiroxina Total (T4)		5,1 – 14,1 mcg/dL
Triiodotironina Total (T3)		0,8 – 2,0 ng/mL
Tiroxina Livre (FT4)		0,93 – 1,70 ng/dL
Triiodotironina Livre (FT3)		2,30 – 4,20 pg/mL
	Mulheres	
Estradiol	Fase Folicular:	18,9 – 246,7 pg/mL
	Pico do ciclo:	33,5 – 570,8 pg/mL
	Fase Luteínica:	22,4 – 156,0 pg/mL
	Pós – menopausa:	<44,5 pg/mL
	Mulheres	
Progesterona	Fase Folicular:	0,15 – 1,40 ng/mL
	Pico do ciclo:	4,44 – 28,3ng/mL
	Fase Luteínica:	3,34 – 25,56 ng/mL
	Pós – menopausa:	<0,73 ng/mL
	Homens	
	0,28 – 1,22 ng/ml	
Gonadotrofina Coriônica Humana (β-hCG)	Não Gestantes <5 mU/mL	
Testosterona	8,69 – 54,69 ng/dL	
	Mulheres	
Hormona Gonadotrófica Luteinizante (LH)	Fase Folicular:	1,9 – 12,5 UI/L
	Pico do ciclo:	8,7 – 77,3 UI/L
	Fase Luteínica:	0,5 – 16,9 UI/L
	Pós – menopausa:	15,9 – 54,0 UI/L
	Homens	
	1,5 – 9,3 U/L	
	Mulheres	
Hormona Gonadotrófica Foliculoestimulante (FSH)	Fase Folicular:	2,5 – 10,2 UI/L
	Pico do ciclo:	3,4 – 33,4 UI/L

	Fase luteínica:	1,5 - 9,1 UI/L
	Pós – menopausa:	23,0 - 116,3 UI/L
	Homens	
	1,4 - 18,1 UI/L	
	Mulheres	
	Idade Reprodutiva:	2,8 - 29,2 ng/mL
	Pós – menopausa:	1,8 - 20,3 ng/mL
	Homens	
	2,1 - 17,7 ng/mL	
	Estudo do metabolismo do cálcio e patologia óssea	
	Paratormona (PTH)	15,0 - 65,0 pg/mL
	Estudo das anemias	
	Ferritina	30,0 - 400,0 ng/mL
	Ácido Fólico	4,5 - 32,2 ng/mL
	Vitamina B12	211,0 - 911,0 pg/mL
	Monitorização de Fármacos	
	Ácido Valpróico	Valores terapêuticos: 50 - 100 mcg/mL
	Serologia das infecções víricas	
	Vírus da imunodeficiência Humana tipo 1/2 (HIV)	Não reativo: <1,0 mIU/mL Reativo: >1,0 mIU/mL
	Antigénio de superfície da Hepatite B (HBsAg)	Negativo: <1,0 mIU/mL Positivo: >1 - <50,0 mIU/mL
	Anticorpos totais do Antigénio de superfície da Hepatite B (aHBs2)	Negativo: <7,5 mIU/mL Indeterminado: 7,5 – 12,5 mIU/mL Positivo: >12,5 mIU/mL
	Anticorpos totais para o Antigénio central do vírus da Hepatite B (HBcT)	Negativo: <0,80 mIU/mL Indeterminado: 0,80 – 1,0 mIU/mL Positivo: >1,00 mIU/mL
	Anticorpos IgM para o antigénio central da hepatite B (aHBcM)	Negativo: <0,8 mIU/mL Indeterminado: 0,8 – 1,0 mIU/mL Positivo: >1,0 mIU/mL
	Anticorpos totais contra o vírus da hepatite A (aHAVT)	Negativo: <20 mIU/mL Positivo: >20 mIU/mL
	Anticorpos IgM para o vírus da Hepatite A (aHAVM)	Negativo: <0,80 mIU/mL Indeterminado: 0,80 – 1,20 mIU/mL

	Positivo: >1,20 mIU/mL
Anticorpos de imunoglobulina G (IgG) para o vírus da hepatite C (HCV)	Negativo: <0,80 mIU/mL
	Indeterminado: 0,80 – 1,0 mIU/mL
	Positivo: >1,0 mIU/mL

3.3 LIAISON XL

O LIAISON XL adota uma tecnologia de quimioluminescência com fase sólida de micropartículas paramagnéticas.

3.3.1 Parâmetros realizados no equipamento LIAISON XL

Tabela VIII: Parâmetros realizados no equipamento LIAISON XL e respectivos valores de referência (11)

Parâmetro	Produto	Método	Valores de referência
25 - Hidroxivitamina D	Soro, Plasma	Quimioluminescência - Imunoensaio competitivo	19,90 – 79,30 pg/mL
Toxoplasmose IGM	Soro	Quimioluminescência - Formato de captura de anticorpo	Negativo: <10 UA/mL Positivo: >10 UA/mL
Toxoplasmose IGG	Soro	Quimioluminescência – Método indirecto	Negativo: <7,2 IU/mL Indeterminado: 7,2 – 8,8 IU/mL Positivo: >8,8 IU/mL
Rubéola IGM	Soro	Quimioluminescência - Formato de captura de anticorpo	Negativo: <25,0 UA/mL Positivo: >25,0 UA/mL
Rubéola IGG	Soro	Quimioluminescência – Método indirecto	Negativo: <10,0 IU/mL Positivo: >10,0 IU/mL

Citomegalovírus IGM	Soro	Quimioluminiscência - Formato de captura de anticorpo	Negativo: <22 UA/mL Positivo: >=22 UA/mL
Citomegalovírus IGG	Soro	Quimioluminiscência – Método indirecto	Negativo: <14 UI/mL Positivo: >=14 UI/mL

3.4 VIDAS

O laboratório Central utiliza o equipamento VIDAS onde são feitos alguns parâmetros imunológicos, requisitados maioritariamente pelo Serviço Hospitalar (Serviço de Internamento e Serviço de Urgência). O VIDAS é um equipamento com um sistema multiparamétrico de imunoensaio, em que o princípio do doseamento associa o método imunoenzimático do tipo Sandwich com uma deteção final em fluorescência – ELFA (*Enzyme linked fluorescent assay*)(12).

3.4.1 Testes realizados no equipamento VIDAS

Tabela IX: Parâmetros realizados no equipamento VIDAS e respetivos valores de referência

Parâmetro	Fundamento do Método	Valores de referência
β-hCG	ELFA	Não Gestantes <2 mUI/mL
D-dímeros	ELFA	<500 ng/mL
NT-proBNP	ELFA	<75 Anos: <125 pg/mL >75 Anos: <450 pg/mL
Mioglobina	ELFA	10 – 45 µg/L
CK-MB Massa	ELFA	<5 ng/mL
Troponina	ELFA	<19 ng/L
EBV VCA IGM	ELFA	Negativo: <20 U/mL Positivo: >40 U/mL
EBV VCA IGG	ELFA	Negativo: <20 U/mL Positivo: >20 U/mL
Digoxina	ELFA	0,90 – 2,00 ng/mL

3.5 AUTION MAX-4280

O AUTION MAX-4280 é um aparelho totalmente automatizado para a urianálise, com leitor de código de barras integrado, e que combina os princípios da espectroscopia por reflectância com a utilização de tiras impregnadas de reagentes, fornecendo resultados qualitativos e semiquantitativos.

3.5.1. Fundamento do método

Na fotometria de reflectância, um feixe de luz é direcionado para uma superfície de uma mistura de reação, sendo a luz refletida quantificada. A intensidade da luz refletida da superfície de reagentes é comparada à intensidade da luz refletida por uma superfície de referência (4). A densidade é determinada através da utilização do método de índice de refração da luz emitida pelo diodo emissor de luz (LED) á medida que esta atravessa a célula do prisma triangular que contém a amostra passando depois no detetor. O índice de refração muda conforme a densidade da amostra na célula do prisma triangular. A dispersão de luz é utilizada na determinação da turvação da amostra (13).

O equipamento faz a determinação completamente automática da urianálise, determinando parâmetros físicos da urina (cor e densidade específica), e parâmetros químicos usando tiras testes (pH, glicose, proteínas, sangue, leucócitos, cetonas, bilirrubina, urobilinogénio e nitritos) (Tabela X).

Após a análise feita pelo equipamento, consoante os resultados, são selecionadas as urinas que necessitam de ser centrifugadas para observação do sedimento urinário. Os resultados são enviados informaticamente através do programa "Apollo" para o computador central, onde são validados após observação do sedimento urinário.

3.5.2 Parâmetros realizados no equipamento AUTION MAX-4280

Tabela X: Parâmetros realizados no equipamento AUTION MAX-4280

Parâmetro	Método
Cor	Refletância
Turvação	Dispersão da luz
Densidade	Índice de refração da luz
Ph	
Glicose	
Proteínas	
Bilirrubina	
Urobilinogénio	Refletância
Corpos Cetónicos	
Eritrócitos	
Leucócitos	
Nitritos	

Neste sector, realizam-se ainda os seguintes estudos urinários por método de imunocromatografia em papel:

- Teste imunológico de gravidez para pesquisa de hCG total
- Pesquisa de drogas de abuso: Anfetamina, Benzodiazepinas, Cocaína, Opiáceos e Canabinóides.
- Pesquisa de *Legionella pneumophila*
- Pesquisa de *Pneumococcus pneumoniae*

3.6 Fluxo analítico

É da responsabilidade do técnico de Análises Clínicas garantir as condições de todo o fluxo analítico (urgência e/ou rotina), de modo a salvaguardar a exatidão, reprodutibilidade, conformidade de unidades e valores de referência e rastreabilidade, garantindo que seja realizada uma validação técnica e biopatológica, em conformidade com o perfil clínico-laboratorial.

No serviço de urgência sempre que é solicitado um pedido de análises, é da responsabilidade do técnico conferir as amostras de recolha com as prescrições, e

proceder à avaliação da sua qualidade, respeitando os critérios de rejeição referidos anteriormente.

Caso exista uma amostra não conforme, deve preencher-se uma ficha de ocorrência no sistema informático Apollo, e classificar o motivo de repetição da colheita, no campo de observações. Em seguida, compete ao técnico comunicar telefonicamente com o respetivo serviço e solicitar uma nova colheita.

O processo analítico só é efetuado após a execução do controlo interno, sempre no cumprimento do plano de controlo de qualidade estabelecidos para cada parâmetro. Os resultados são validados tecnicamente e imediatamente após o processamento técnico, se os resultados do CQI estiverem dentro dos limites estabelecidos, se não existirem alarmes instrumentais (mensagens emitidas pelos equipamentos analíticos), e se as condições de execução analítica estiverem em conformidade com os procedimentos descritos.

A validação técnica é efetuada por técnicos, e supervisionada pelos especialistas responsáveis pelas respetivas áreas técnicas. A validação biopatológica dos resultados é feita num contexto clínico laboratorial do doente. Os relatórios e as informações importantes para o Clínico são inseridos no boletim, com os respetivos valores de referência.

3.7 Atividades desenvolvidas na área de Imunoquímica Clínica

Uma vez que exerço funções de Técnica Superior de Laboratório, e estou integrada na dinâmica do Laboratório, executei durante o estágio:

- Processos de manutenção, controlo, e calibração dos diversos equipamentos;
- Execução diária de preparação de amostras e doseamento de diferentes parâmetros analíticos;
- Avaliação da qualidade de amostras, das suas características intrínsecas (hemólise, lipémia e outras), as quais podem interferir nos resultados obtidos;
- Realização, avaliação e monitorização dos programas de controlo de qualidade interno e externo executados no sector.

4. Estágio em Hematologia

Laboratório/ Serviço	Duração	Período de estágio
Valência de Hematologia, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF	150 horas	2 de Abril de 2018 a 4 de Maio de 2018

Responsável pela valência de Hematologia: Dr. José Luís Pinto de Oliveira Fleming Torrinha, Médico Patologista e Diretor Clínico.

O sector de Hematologia está inserido no Laboratório Central onde se efetua todo o processamento de amostras de rotina e da urgência após triagem, execução de técnicas manuais e automatizadas, análise e validação de resultados.

Apesar do avanço na automatização da tecnologia laboratorial aplicada ao estudo qualitativo e quantitativo dos elementos do sangue, a intervenção do Patologista Clínico representa um papel fundamental, quer no reconhecimento de alterações morfológicas em esfregaços de sangue periférico, quer na correta interpretação de avaliações mais específicas para um diagnóstico adequado dentro de um contexto clínico.

As amostras de sangue total são colhidas para o tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) ou Citrato de sódio.

4.1 Sysmex XE-2100

O Sysmex XE-2100 caracteriza-se por ser um equipamento que executa a contagem diferencial de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, e a determinação do valor da hemoglobina das amostras analisadas através de diversos métodos, de modo a obter resultados rápidos e precisos.

4.1.1 Fundamento do método

O contador hematológico XE-2100 utiliza um laser dÍodo, que lhe confere a sensibilidade necessária para quantificar e diferenciar os elementos figurados do sangue, utilizando como metodologias a citometria de fluxo, condutividade elétrica com focagem hidrodinâmica e colorimetria.

- Determinação de hemoglobina

- **Canal HGB - Método SLS-Hb**

A metodologia utilizada pelo canal HGB consiste no método SLS-Hb, que permite a determinação da hemoglobina através do uso do surfactante laurilsulfato de sÓdio (SLS). ApÓs a lise dos eritrÓcitos, a cadeia globina da molÉcula de hemoglobina é alterada por açÓo do SLS, através da oxidação do grupo heme, formando metahemoglobina. Posteriormente, os grupos hidrofÍlicos do SLS vÓo ligar-se à metahemoglobina anteriormente formada, formando um complexo SLS-Hb (Fig.6).

Este complexo colorido é medido espectrofotometricamente, e a absorvÓncia é proporcional à concentraçÓo de hemoglobina presente na amostra (14, 15).

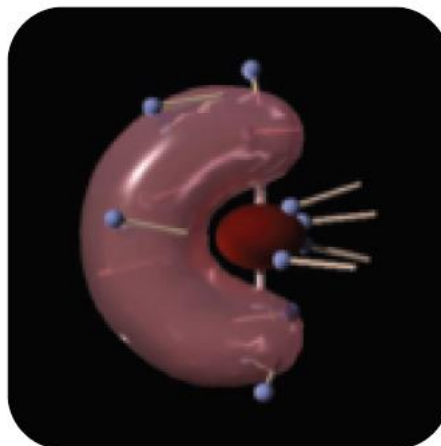


Figura 6 - Método SLS-Hb Retirado de:
<https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>
[Acedido a: 25 de Junho de 2018]

- Contagem de eritrócitos e plaquetas
 - **Canal RBC/PLT – Método de impedância e focagem hidrodinâmica**

Os eritrócitos e as plaquetas são contados num canal próprio, utilizando o método de detecção de impedância, ou corrente contínua (DC), combinado com a tecnologia de focagem hidrodinâmica (Fig.7).

O objetivo da focagem hidrodinâmica é minimizar fenômenos de perda e variação dos impulsos elétricos na zona de detecção, devido à recirculação de células, evitando desta forma erros nas contagens celulares. As células sanguíneas são injetadas sobre ligeira pressão num pequeno orifício, conhecido como abertura, onde existem dois elétrodos de cada lado da abertura, através dos quais passa uma corrente contínua.

A resistência à corrente contínua entre os elétrodos varia à medida que as células passam através da abertura. Desta forma, a quantificação celular está relacionada com o número de impulsos, e a dimensão celular está relacionada com a amplitude (intensidade) do impulso elétrico.

Neste canal obtém-se a contagem de eritrócitos e plaquetas, e é calculado o volume globular médio (VGM) e o volume plaquetário médio (VPM).

O hematócrito (HCT) é diretamente determinado através da detecção individual do volume de cada eritrócito (VGM) (14, 15).

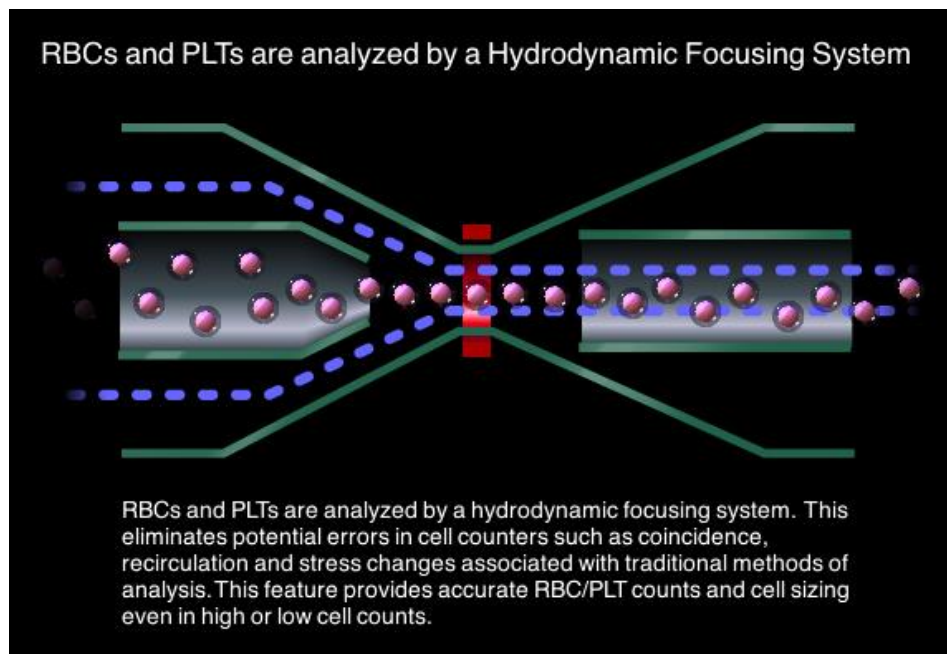


Figura 7 - Contagem de células pelo método de focagem hidrodinâmica Retirado de: <https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx> [Acedido a: 25 de Junho de 2018]

- Fórmula leucocitária – método citometria de fluxo
- **Canal 4Diff, WBC/BASO, RET/PLT-O**

A citometria de fluxo com fluorescência (FFC, fluorescence flow cytometry) (Fig.8) é utilizada para analisar as propriedades fisiológicas e químicas das células, através do uso do marcador fluorescente Polimetina, que se liga especificamente aos ácidos nucleicos. A amostra é transportada para a célula de fluxo e iluminada por um laser semiconductor, que consegue separar as células, utilizando três sinais diretos através de medições simultâneas de fluorescência e dispersão da luz (4, 14, 15):

- FSC, Forward Scatter: Dispersão frontal - avalia o volume celular;
- SSC, Side Scatter: Dispersão lateral - avalia o conteúdo celular núcleo e grânulos;
- SFI, Side Fluorescence: Fluorescência lateral - indica a atividade fluorescente celular relacionada com a quantidade de DNA e RNA presente na célula

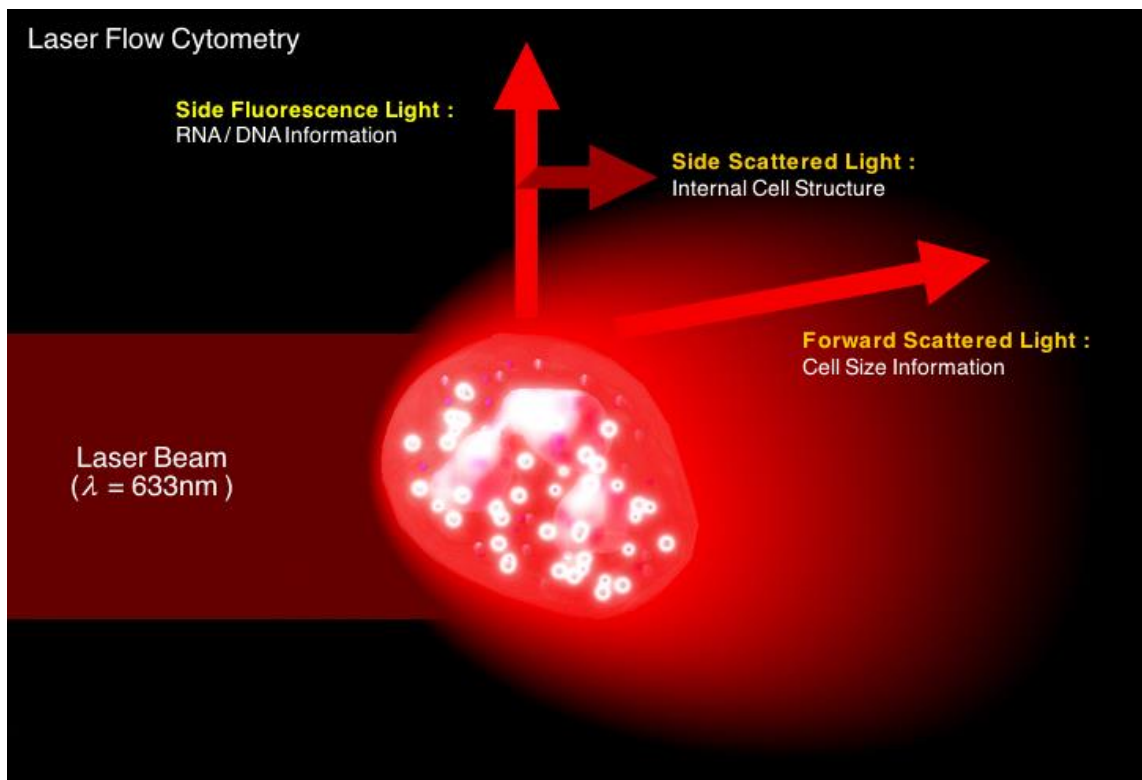


Figura 8 - Citometria de fluxo Retirado de:
<https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>
[Acedido a: 25 de Junho de 2018]

- **Canal 4Diff**

A análise diferencial consiste numa reação citoquímica das células com um reagente surfactante, que induz a lise total de eritrócitos, seguida de uma análise por citometria de fluxo com fluorescência.

A combinação de sinais de medição relacionados com o Side Scatter (aumenta consoante a complexidade interna da célula), e do Side Fluorescence (aumenta consoante a quantidade de material genético - DNA/RNA), são analisados e apresentados num diagrama de dispersão. Células com propriedades citoquímicas semelhantes são incluídas na mesma área do diagrama, diferenciando as classes leucocitárias em 4 tipos: Neutrófilos, Eosinófilos, Linfócitos e Monócitos.

O canal diferencial fornece as contagens de todas as subpopulações celulares normais de leucócitos, sinalizando também a informação referente a anomalias (14, 15).

- **Canal WBC/BASO**

Nesta câmara é feita a contagem de basófilos, bem como a contagem total de leucócitos. As diferenças volumétricas resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas a partir das informações provindas dos feixes Forward Scatter e Side Scatter.

- **Canal NRBC**

O canal NRBC utiliza combinação de sinais de medição relacionados com o Side Fluorescence e o Forward Scatter para a análise dos eritroblastos. Essa metodologia permite a separação dos leucócitos e eritroblastos, uma vez que os leucócitos apresentam uma quantidade maior de material genético e conseqüentemente maior fluorescência que os eritroblastos. Por sua vez, os eritroblastos são menores que os leucócitos resultando num padrão distinto e na separação dessas populações (14).

- **Canal RET/PLT-O**

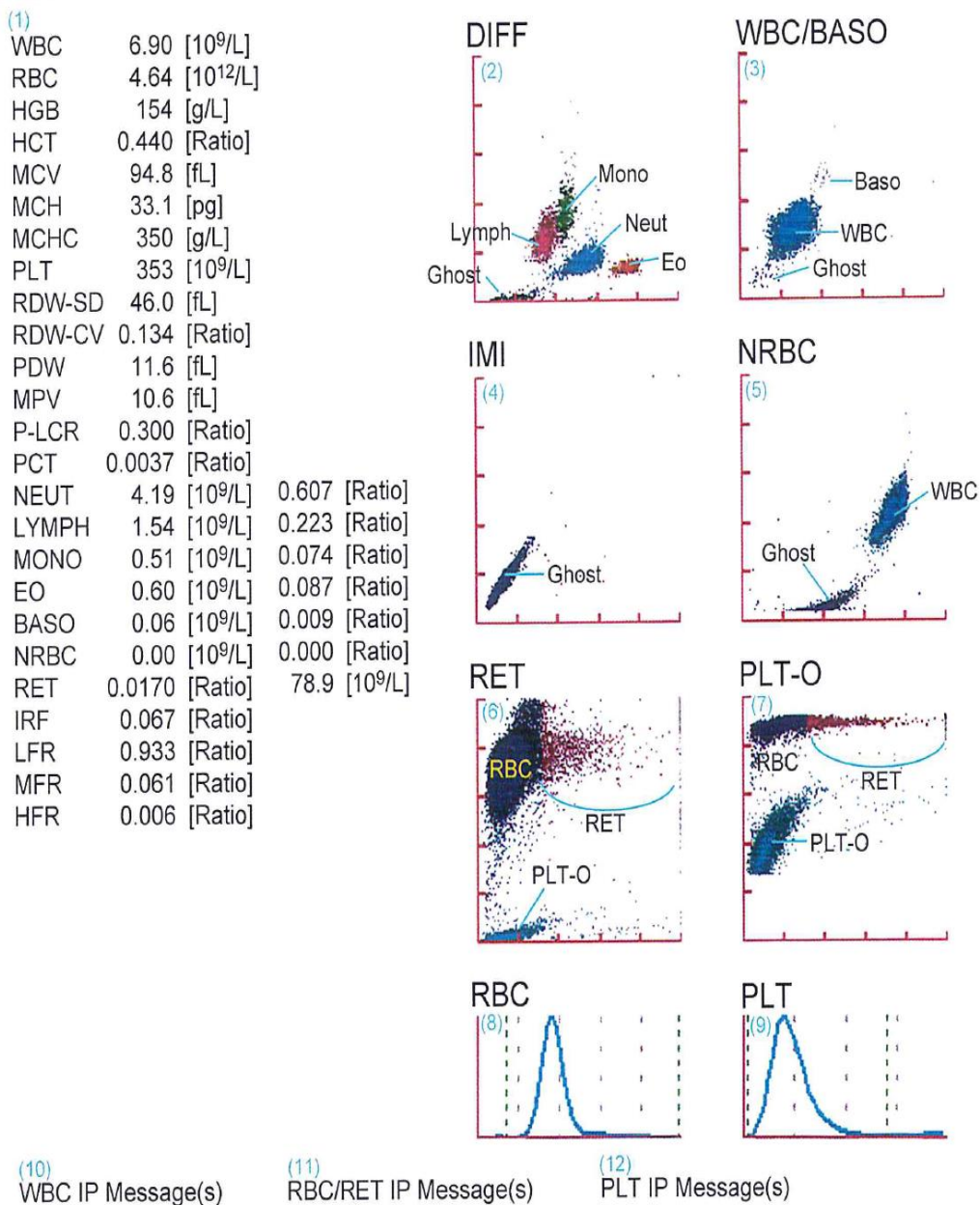
A tecnologia de Citometria de Fluxo Fluorescente também é utilizada para analisar de forma eficiente e reprodutível a contagem de reticulócitos e os seus estágios de maturação de acordo com o seu grau de fluorescência:

- LFR (low fluorescence reticulocytes, reticulócitos de baixa fluorescência)
- MFR (medium fluorescence reticulocytes, reticulócitos de média fluorescência)
- HFR (high fluorescence reticulocytes, reticulócitos de alta fluorescência)

A IRF (immature reticulocyte fraction, fração de reticulócitos imaturos) reflete a proporção de reticulócitos imaturos e é calculada pela soma de MFR + HFR, fornecendo informações sobre a atividade medular.

A contagem óptica de plaquetas também é aqui determinada, permitindo uma contagem mais precisa das plaquetas quando o método de impedância apresenta interferências. A combinação de sinais de medição relacionados com o Forward Scatter e do Side Fluorescence são analisados e apresentados num diagrama de dispersão (14, 15).

Nas figuras seguintes encontra-se um exemplo de um resultado de um histograma executado no Sysmex XE-2100 (Fig.9) e o diagrama esquemático do respetivo histograma (Fig.10).



(1)Analysis data (2)DIFF scattergram (3)WBC/BASO scattergram (4)IMI scattergram (5)NRBC scattergram (6)RET scattergram (7)PLT-O scattergram (8)RBC histogram (9)PLT histogram (10)WBC system IP message (11)RBC/RET system IP message (12)PLT system IP message

Figura 9 - Histograma executado no Sysmex XE-2100 (Imagens cedidas por Sysmex Corporation)

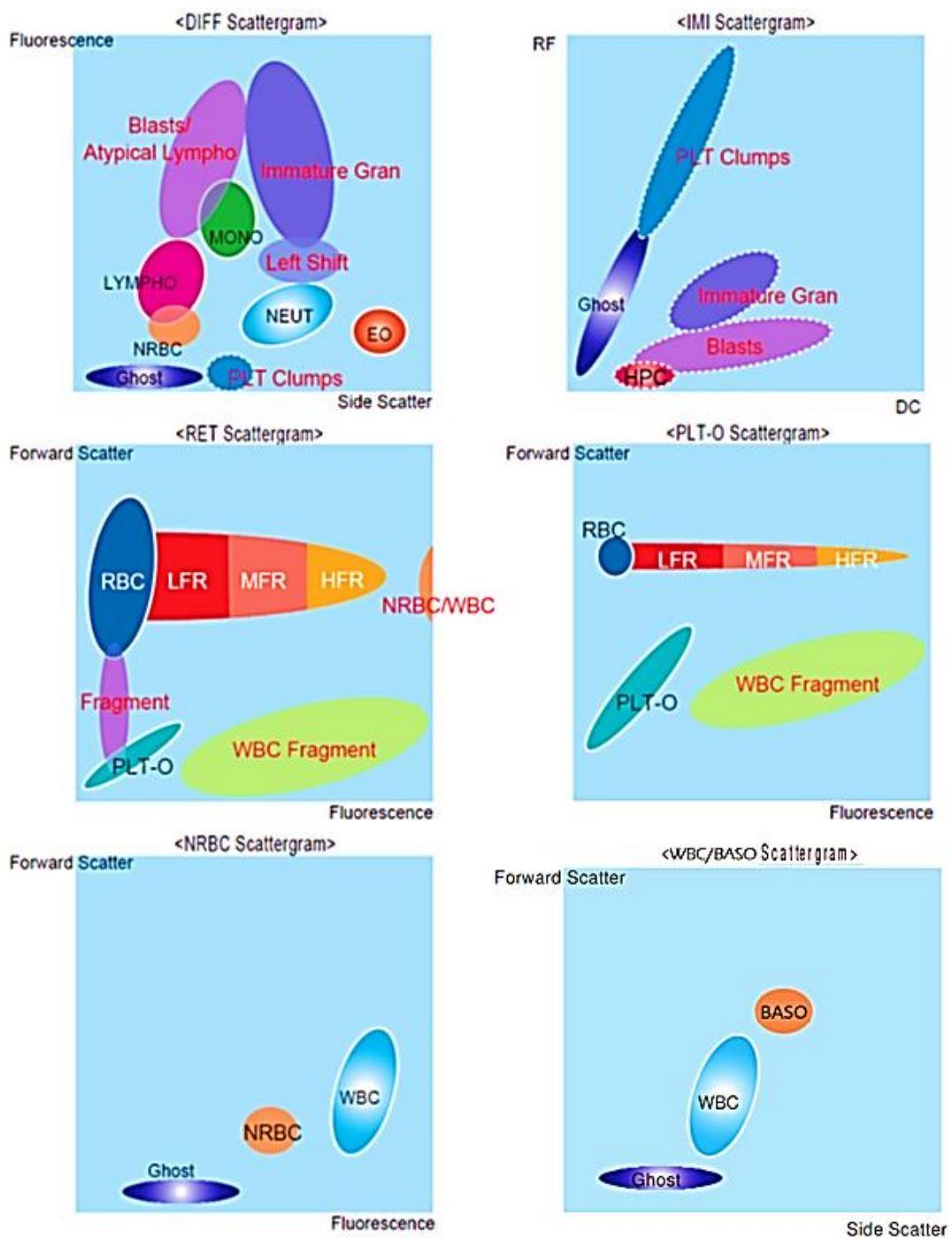


Figura 10 - Diagrama esquemático do histograma executado no Sysmex XE-2100 (Imagens cedidas por Sysmex Corporation)

4.2 Hemograma

O maior volume de análises no sector de Hematologia é constituído pelo Hemograma.

Este representa o exame de primeira linha no estudo da função hematológica, que permite a quantificação dos elementos figurados do sangue periférico, bem como, uma avaliação qualitativa da sua morfologia.

É uma análise que permite uma diversidade de informações no estudo de patologias eritrocitárias, leucocitárias e distúrbios trombocíticos.

O Hemograma é uma ferramenta importante na avaliação de diversas situações, tais como diagnóstico e evolução de doenças hematológicas, deteção de quadros infecciosos e na monitorização terapêutica (16); sendo constituído por:

Eritrograma

Consiste na quantificação de glóbulos vermelhos e concentração de hemoglobina, bem como a determinação dos índices globulares e a morfologia eritrocitária.

Os eritrócitos definem-se por três parâmetros quantitativos principais:

- Contagem de eritrócitos - Número de eritrócitos circulantes, presentes num dado volume de sangue
- Hematócrito – Volume ocupado pelos eritrócitos num litro de sangue
- Concentração de hemoglobina

Os índices eritrocitários permitem descrever características qualitativas médias, e são calculados automaticamente pelo aparelho através dos parâmetros RBC (contagem de glóbulos vermelhos), HGB (hemoglobina) e HCT (hematócrito):

- VGM (Volume globular médio) – Corresponde á média dos volumes ocupados pelos glóbulos vermelhos
- HGM (Hemoglobina globular média) - Avalia a quantidade de hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos
- CHGM (Concentração de hemoglobina globular média) - Estima a concentração média de hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos
- RDW - Coeficiente de distribuição das dimensões dos eritrócitos, traduzindo a variação de tamanho entre os eritrócitos - índice de anisocitose

Leucograma

A fórmula leucocitária é calculada pelos equipamentos hematológicos disponíveis no laboratório, tal como já foi referido anteriormente, fornecendo uma contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária e avaliação morfológica.

Os leucócitos existentes no sangue periférico normal representam três populações celulares morfológicamente distintas: granulócitos, linfócitos e monócitos.

Plaquetograma

Consiste na quantificação de plaquetas.

4.3 Valores de referência do Hemograma

Tabela XI: Valores de referência do Hemograma

	Homem	Mulher	Unidades
Eritrograma			
Eritrócitos	4,5 – 5,9	3,9 – 5,0	$\times 10^{12}$ /L
Hemoglobina	13,5 – 17,5	12 – 16	g/dL
HCT	40,6 – 50,4	36 – 46	%
VGM	80 – 100	80 – 100	fL
HGM	26 – 34	26 – 34	Pg
CHGM	32 – 36	32 – 36	g/dL
Leucograma			
Leucócitos	4 – 10	4 – 10	$\times 10^9$ /L
Neutrófilos	50 – 75	50 – 75	%
Eosinófilos	1 – 5	1 – 5	%
Basófilos	0 – 2	0 – 2	%
Linfócitos	20 – 45	20 – 45	%
Monócitos	1 – 12	1 – 12	%
Plaquetograma			
Plaquetas	150 – 400	150 – 400	$\times 10^9$ /L

4.4 Esfregaço Sanguíneo

O sistema automático Sysmex XE-2100 está programado para fornecer contagens sanguíneas exatas e reprodutíveis em amostras normais. No entanto sempre que se obtém um hemograma com resultados alterados nos histogramas, o aparelho imite alertas (flags). Estes alertas podem estar na origem da presença de células blásticas, granulócitos imaturos, eritroblastos, linfócitos atípicos, trombocitose, trombocitopenia, agregação plaquetária, microcitose, macrocitose, hipocromia, anemia, o que pode indicar a necessidade de se proceder á observação do esfregaço sanguíneo.

Caso se verifiquem os valores da tabela seguinte, e depois de verificadas as condições pré-analíticas em doentes sem histórico ou contexto clínico, deve contactar-se o médico prescritor de imediato, e executar o esfregaço sanguíneo.

Tabela XII: Valores de críticos de Hemograma

Parâmetro	Valores de referência		Unidades
Hemoglobina	<7	>19,9	g/dL
Hematócrito	<18	>61	%
Leucócitos	<2	>30	$\times 10^9/L$
Neutrófilos	<1		$\times 10^9/L$
Plaquetas	<50	>1000	$\times 10^9/L$

O exame de esfregaço sanguíneo constitui uma parte essencial na investigação hematológica de um doente, e tem como objetivo a avaliação morfológica dos diferentes elementos figurados do sangue, bem como outros elementos como, por exemplo, parasitas.

Assim, o esfregaço sanguíneo permite o estudo da morfologia eritrocitária, leucocitária, efetua contagem diferencial de leucócitos, e o estudo da morfologia plaquetária.

A visualização de esfregaços sanguíneos é uma das análises mais utilizados no auxílio do diagnóstico de determinadas doenças, que têm associadas alterações morfológicas das células do sangue. Existem patologias que interferem com a normal eritropoiese provocando variações na forma, no conteúdo da hemoglobina e no tamanho dos eritrócitos.

De uma forma geral num esfregaço sanguíneo podem ser identificadas variações de tamanho (anisocitose), de forma (poiquilocitose) ou variações de cor (anisocromia) (Tabela XIII).

Relativamente à qualidade do esfregaço, este deve ser fino, regular, com margens paralelas aos bordos da lâmina, mas deles afastados, não devendo apresentar estrias ou espaços lacunados. De facto, devem evitar-se esfregaços muito espessos ou muito finos, uma vez que isso significa que as células ficam mal espalhadas ou muito dispersas. Os esfregaços devem estar bem secos, para posteriormente serem corados pela coloração de *Wright*.

Tabela XIII: Observações no esfregaço sanguíneo

Série eritrocitária
Alterações morfológicas
Conteúdo de hemoglobina
Inclusões eritrocitárias
Presença de eritroblastos
Presença de parasitas
Série leucocitária
Alterações morfológicas
Contagem diferencial de leucócitos
Identificação de células imaturas atípicas
Série plaquetar
Avaliação semiquantitativa
Avaliação da presença de agregados
Alterações morfológicas

Em relação às alterações da série vermelha, tive oportunidade de observar diversas lâminas, cujas particularidades eritrocitárias observadas descrevo:

- Alterações da dimensão – anisocitose, microcitose, macrocitose;
- Alterações da cor – anisocromia, hipocromia, policromatofilia;
- Corpos de Howell-Jolly - fragmentos nucleares redondos de cor azul escura (coloração de Wright), resultantes de DNA condensado, normalmente removidos pelo baço. Frequentes em anemias hemolíticas severas, pacientes com disfunção do baço ou após esplenectomia;

- Alterações na distribuição – rouleaux (GV empilhados), aglutinação;
- Alterações associadas a um aumento da eritropoiese – presença de eritroblastos (células imaturas);
- Alterações da forma – poiquilocitose. Os eritrócitos normalmente têm forma de disco bicôncavo, contudo podem apresentar outras formas, sendo que se houver uma prevalência de algumas destas formas é indicativo de algumas patologias;
- Burr cells – eritrócitos de aspeto crenado muito típico na insuficiência renal onde há acumulação de metabolitos levando a uma composição anormal do plasma que determina modificações na morfologia da célula;
- Eliptócitos- eritrócitos com forma elíptica devido a uma alteração da composição proteica da membrana do eritrócito comum na anemia hemolítica hereditária;
- Estomatocitos – eritrócitos em forma de boca muito frequente em doentes hepáticos
- Células em alvo- eritrócitos com periferia corada, uma zona incolor e de novo uma zona corada no centro típico das talassemias;
- Drepanócitos- eritrócitos característicos da anemia falciforme em que as células se apresentam numa forma de foice.

Em muitas situações neoplásicas, inflamatórias e imunológicas, as proporções celulares podem surgir alteradas, apesar de uma contagem total inalterada.

A contagem diferencial de células é uma técnica manual, que tem como princípio estabelecer a percentagem das diferentes linhagens leucocitárias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos), através da contagem de 200 leucócitos ao longo do esfregaço sanguíneo corado pela técnica de Wright.

Esta diferenciação é feita tendo em conta o tamanho da célula, e as características do núcleo e do citoplasma. O resultado deve ser expresso em percentagem e em valor absoluto.

No período do estágio, as alterações observadas na série branca, foram sobretudo em relação a alterações da morfologia de:

- Neutrófilos em banda e com hipersegmentação nuclear
- Linfócitos atípicos ou reativos com citoplasma hiperbasófilo e núcleos atípicos de contornos irregulares;
- Presença de blastos das várias linhagens leucocitárias.

Em relação a alterações na série plaquetária, também foram observadas lâminas com anisocitose plaquetária, assim como a presença de agregados plaquetários e trombocitose. As plaquetas aglomeradas provocam a diminuição da contagem destas. Nestes casos, e se clinicamente justificar, deve repetir-se a colheita em tubo de citrato.

4.5 Ves-Matic 30/30 Plus

Na área de Hematologia é utilizado o analisador de bancada Ves-Matic 30/30 Plus. O exame é executado em completa automação (agitação e leitura) e os resultados são comparáveis aos obtidos pelo método de Westergren (1 hora) em 25 minutos.

A velocidade de sedimentação globular (VS) representa uma medição de fase aguda de resposta a uma doença inflamatória, e reflete a rapidez com que sedimentam os eritrócitos. Este é caracterizado como sendo um exame pouco específico, mas bastante útil no rastreio de processos infecciosos e na monitorização do tratamento de algumas patologias inflamatórias ou infecciosas, como mieloma múltiplo, leucemias, linfomas, carcinomas, artrite reumatoide e Lupus (17)

4.5.1 Fundamento do método

O sangue inicialmente colhido em tubos de EDTA é cuidadosamente misturado pelo dispositivo, ficando as amostras em repouso por um tempo predefinido para que se verifique a sedimentação. O dispositivo determina automaticamente o nível de sedimentação dos eritrócitos, sendo a leitura efetuada por sensores óptico- eletrónicos.

Este método tem como princípio a medição da altura da coluna de plasma livre, que corresponde à distância que os glóbulos vermelhos percorrem em 1 hora.

Os dados são elaborados, automaticamente impressos e visualizados o ecrã e transmitidos para o computador.

Em casos de amostras pediátricas ou em caso de um resultado superior a 50 mm pelo método automático, procede-se á determinação da velocidade de sedimentação manualmente.

Na técnica manual, utiliza-se uma pipeta graduada que é preenchida com o sangue periférico até à marca zero e deixada numa posição vertical durante uma hora. A VS,

expressa em mm/h, será a distância da coluna inicial de eritrócitos (marca 0) até ao sedimento.

4.5.2 Valores de referência de Velocidade de Sedimentação Globular

Tabela XIV: Valores de referência de Velocidade de Sedimentação Globular

Sexo Masculino	<10 mm
Sexo Feminino	<15 mm

4.6 ADAMS A1C HA-8160

Este aparelho automático é usado com a finalidade de efetuar o doseamento de hemoglobina glicada (Hb A1c). A hemoglobina glicada resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos.

A glicação da hemoglobina varia em função da concentração da glicose a que os eritrócitos são expostos, sendo um indicador de grande utilidade clínica, que reflete a glicemia média nas últimas 8 a 12 semanas, uma vez que o tempo médio de vida dos eritrócitos é cerca de 120 dias. A sua determinação é utilizada como teste de rotina para a monitorização de doentes com Diabetes *Mellitus* (3 em 3 meses), e também ao diagnóstico desta patologia (18).

Segundo a norma 002/2011 da Direção Geral de Saúde, é critério de diagnóstico de Diabetes *Mellitus* um valor de Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$, devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma a duas semanas (19).

4.6.1 Fundamento do método

O doseamento da hemoglobina é feito usando a técnica cromatográfica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), onde a coluna é composta por uma resina de troca catiónica de fase reversa, que se baseia na distribuição diferencial dos solutos entre a fase móvel líquida e a fase estacionária. A maior ou menor afinidade para a resina, determina o tempo de retenção/separação de uma substância, face à passagem de uma solução eluente.

Esta técnica possibilita separar a HbA1c das outras frações de hemoglobina presentes na amostra, de acordo com diferenças de carga e, após separação, passam por um fotómetro numa célula de fluxo em que são medidas alterações na absorvância (4).

4.6.2 Valores de Referência de hemoglobina glicada

4% - 6%

Valores elevados encontram-se associados a um risco de complicações crónicas.

4.7 Estudo da coagulação

A rotina diária do laboratório inclui a realização de estudos da coagulação, provenientes dos diferentes serviços do Hospital CUF para a monitorização do tratamento anticoagulante, quer dos doentes em ambulatório, quer de doentes internados. A elaboração de planos de Hipocoagulação, é realizado através do programa Athis.

4.7.1 Sysmex CA-500

O Sysmex CA-500 é um instrumento totalmente automatizado envolvido no estudo da hemostase secundária (coagulação). O equipamento determina o tempo da coagulação utilizando princípios fotométricos e turbidimétricos, através de alterações na intensidade da luz dispersa na amostra, devido a um aumento da turvação provocada pela formação do coágulo de fibrina. Desta forma, os raios de luz provenientes do díodo emissor de luz (LED) são refletidos e dispersos em simultâneo com a formação coágulo, com conseqüente alteração da densidade ótica do meio de reação e que é convertido em sinais elétricos. Por fim um microprocessador controla esses sinais e utiliza-os para contabilizar o tempo de coagulação na amostra (20).

4.7.2 Parâmetros realizados no equipamento Sysmex CA-500

Tabela XV: Parâmetros realizados no equipamento Sysmex CA-500 e respectivos valores de referência

Parâmetros	Valores de Referência
Tempo de Protrombina	11.8 – 15.1 segundos
Taxa de Protrombina	74 – 132 %
INR (Razão de Normalização Internacional)	≤ 1.18
Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado	24.3 – 35 segundos
Fibrinogénio	180 - 350 mg/dL

4.8 Atividades desenvolvidas na área de Hematologia

- Executei a manutenção e controlo de todos os equipamentos existentes no sector
- Avaliei a qualidade e volume de amostras
- Interpretei os resultados fornecidos pelos analisadores
- Realizei e corei esfregaços sanguíneos e procedi á sua observação microscópica
- Acompanhei a elaboração de planos de hipocoagulados no programa Athis

5 Serologia / Técnicas Manuais

As técnicas manuais de serologia têm como base a detecção sérica de anticorpos específicos produzidos contra antígenos, em resposta à presença de um agente infeccioso, sendo úteis no auxílio de diagnóstico de patologias infecciosas.

Amostra

Soro ou plasma

5.1 Serologia para *Treponema pallidum*

- RPR (*Rapid Plasma Reagin*) - Teste não treponémico de determinação qualitativa e titulação de anticorpos (reaginas) por aglutinação direta em placa (21)
- TPHA (*Treponema Pallidum Hemagglutination*) - Teste treponémico de determinação qualitativa e titulação de anti – *Treponema pallidum* por método de hemaglutinação passiva do soro (22)

5.2 Serologia para Mononucleose Infecciosa

- Monospot – Teste rápido para determinação qualitativa de anticorpos heterófilos por técnica de aglutinação direta em placa (23).

5.3 Serologia para *Brucella* spp.

- Brucelloslide – Test – Teste de aglutinação direta em placa em que perante aglutininas específicas da Brucelose o antígeno corado de Rosa Bengala é aglutinado (24)

5.4 Serologia Fator Reumatóide

- A reação de Waaler Rose é um método hemaglutinação para a determinação semi-quantitativa do fator reumatóide no soro humano (25)

5.5 Antígenos febris

- Reação de Widal é um método serológico por reação de aglutinação direta em placa com suspensões antigénicas de Salmonela (*S. paratyphi A O*; *S. paratyphi A H*; *S. paratyphi B O*; *S. paratyphi B H*; *S. typhi O*; *S. typhi H*).
- Reacção de Weil-Felix é um método serológico por reação de aglutinação direta em placa com suspensões antigénicas Proteus (*Proteus OX19*; *Proteus OX2*; *Proteus OXK*) (26)

6. Estágio em Microbiologia Clínica

Laboratório/ Serviço	Duração	Período de estágio
Laboratório de Microbiologia Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF Porto	150 horas	7 de Maio de 2018 a 8 de Junho de 2018

O papel fundamental do Laboratório de Microbiologia prende-se com o diagnóstico e respetivo tratamento das doenças infecciosas. Conjuga a necessidade de resposta rápida e assertiva com as rigorosas normas de orientação e técnicas utilizadas, desde a colheita das amostras até à identificação de microrganismos responsáveis pelo processo infeccioso e determinação do respetivo perfil de suscetibilidade dos antibióticos.

Responsável pela valência de Microbiologia: Dra. Elsa Maria de Senna Fernandes Calado, Médica Patologista Clínica

6.1 Metodologia geral do estudo microbiológico

O estudo dos produtos biológicos rececionados, dependem do tipo de amostra, do tipo de exame requisitado pelo médico, e da informação clínica que acompanha a requisição. As amostras para estudo microbiológico são recebidas pelo serviço de triagem, ou através do serviço de urgência, onde são colocadas em tabuleiros e enviadas para o Laboratório de Microbiologia. Após a receção, são impressas as folhas de trabalho, podendo iniciar-se o processamento da análise dos produtos biológicos.

Durante o estágio foram estudados e processados os seguintes produtos biológicos (Tabela XVI):

Tabela XVI: Produtos processados no Laboratório de Microbiologia

Produtos Estudados
Sangue (punção venosa e colheita através de cateter)
Secreções respiratórias (lavado broncoalveolar, expetoração, aspirado brônquico)
Urina
Secreções purulentas (pús de abscesso, aspirado de ferida, exsudado de ferida)
Fezes
Exsudados vaginais e uretrais
Exsudados nasais e da orofaringe
Pontas de cateteres
Líquidos serosos (líquido pleural, peritoneal, pericárdico, bile)
Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR)
Exsudados oculares
Biópsias e fragmentos tecidulares
Esperma

6.1.1 Exame Macroscópico

Observação e avaliação do aspeto global da amostra relativamente ao aspeto, odor, consistência, presença de muco, saliva ou sangue.

6.1.2 Exame Microscópico

O exame direto além de permitir classificar os microrganismos segundo as suas características morfológicas e coloração, também permite avaliar a qualidade de determinado tipo de amostra e fazer o diagnóstico presuntivo de alguns agentes infecciosos:

- Observação microscópica de exame a fresco entre lâmina e lamela, permite apreciar a presença de elementos celulares e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas)
- O exame microscópico de preparações coradas permite precisar as características morfológicas das bactérias e fungos (forma e afinidade para os corantes):
- Método de Gram, permite a diferenciação de bactérias Gram positivo que coram de roxo escuro de bactérias Gram negativo que coram de vermelho

- Método de Ziehl- Neelsen modificado, permite a pesquisa de bacilos ácido álcool resistente
- Coloração com azul Lactofenol utilizado para exame micológico de fungos filamentosos

6.1.3 Exame cultural

Os meios de Cultura são meios que promovem o crescimento microbiano *in vitro* por incluírem na sua composição todos os nutrientes indispensáveis, (água e pH adequados), de forma a manterem microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas.

No laboratório de microbiologia utilizam-se meios de cultura da *bioMérieux* essenciais à inoculação das diferentes amostras recebidas (tabela XVII).

Tabela XVII: Meios de cultura utilizados no Laboratório de Microbiologia (27)

Meios de cultura	Função
Meios de cultura sólidos	
Gelose ChromID CPS Agar (CPS)	Isolamento de germens urinários
Gelose Manitol (MSA2)	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp.
Gelose Mac Conkey (MCK)	Isolamento de bactérias Gram negativas
Gelose Chocolate PolyviteX (PVX)	Isolamento de bactérias exigentes pertencentes ao género <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Gelose Chocolate PolyViteX (VCAT3)	Isolamento de bactérias <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Isolamento de bactérias exigentes
Gelose de Sabouraud (SGC2)	Isolamento de fungos

Gelose Hektoen (HEKT)	Isolamento de bactérias <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>
Gelose Granada (GRAN)	Isolamento de <i>Streptococcus agalactiae</i>
Gelose Mueller-Hinton E (MHE)	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
Gelose Mueller Hinton + 5% de sangue de cavalo (MHF)	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
Meio de Lowenstein-Jensen	Isolamento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e outras micobactérias
Gelose Campilysel (CAM)	Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.
Meios de cultura líquidos	
Caldo de GN	Meio de enriquecimento para <i>Enterobacteriaceae</i>
Meio BHI	Meio de enriquecimento para aeróbios e anaérobios
Caldo Todd Hewitt	Meio de isolamento para <i>Streptococcus</i> β – hemolítico

O exame cultural implica as seguintes fases:

- Preparação da amostra (concentração, homogeneização)
- Seleção dos meios de cultura apropriados à natureza do produto e ao exame pretendido
- Inoculação no meio de cultura respetivo por técnicas de “sementeira” adequadas.
- Condições de incubação apropriada, isto é, seleção da atmosfera, temperatura, humidade e tempo de incubação apropriados
- Seleção e isolamento das diferentes estirpes a valorizar de forma a obter culturas puras para posterior identificação dos microrganismos e realização de TSA
- A decisão do modo de processamento do exame cultural e valorização clínica das estirpes isoladas, baseia-se no conhecimento do processo inflamatório da flora

comensal habitual e dos respetivo agentes patogénicos dos diferentes locais anatómicos

6.2 Métodos de identificação de Microrganismos isolados

A identificação dos microrganismos isolados a partir do exame cultural é realizada no Laboratório com base numa grande variedade de métodos manuais e automáticos.

6.2.1 Métodos manuais

- Morfologia macroscópica das colónias: forma, dimensão, elevação, cor, consistência, opacidade/ brilho, margem (bordo da colónia), cheiro, alterações provocadas no meio de cultura (hemólise, “swarming”, produção de pigmento)
- Condições ambientais de crescimento: temperatura, humidade, atmosfera (aerobiose, microaerofília e atmosfera de CO₂)
- Morfologia microscópica e características de coloração de Gram e Ziehl-Neelsen
- Provas rápidas de caracterização bioquímica/ enzimática:

Prova da Catalase

A enzima catalase intervém na quebra da molécula de peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. Quando um pequeno inóculo de microrganismos produtores de catalase é colocado em peróxido de hidrogénio libertam-se bolhas de oxigénio resultante da atividade enzimática.

A prova da catalase é uma prova presuntiva, que auxilia na diferenciação de Cocos Gram positivos, os *Staphylococcus* (catalase positiva) e os *Streptococcus* (catalase negativa).

Prova da Coagulase

A coagulase é produzida por *Staphylococcus aureus* que permite a conversão do fibrinogénio em fibrina. A atividade da coagulase é utilizada para distinguir espécies

patogénicas por *Staphylococcus* de espécies não patogénicas, sendo um bom indicador da patogenicidade de *S.aureus*.

Prova da oxidase

As citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo elétrões (hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água. O teste utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio. Na presença de cor azul é indicativo de um resultado positivo.

A prova da oxidase é um teste que permite identificar bactérias que possuem o citocromo oxidase. Este teste permite distinguir bactérias não fermentadoras (oxidase positiva) de *Enterobactereaceas* (oxidase negativa).

Prova da solubilidade na bile

Os sais biliares têm a capacidade de lisar seletivamente de *S. pneumoniae*. A prova da solubilidade na bile (desoxicalato de sódio) permite a diferenciação entre *Streptococcus pneumoniae* de outros *streptococcus* α - hemolíticos (resistentes à bile). O *S.pneumoniae* é solúvel na presença de bile, pois o desoxicalato de sódio lisa a parede do pneumococo.

Teste Indol Direto

O indol é um dos produtos de degradação metabólica do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolizar e desaminar o triptofano com a produção de indol, ácido pirúvico e amónia. Na presença de cor verde é indicativo de um resultado positivo.

- Provas de identificação com discos impregnados:

Teste de sensibilidade à Optoquina

O teste de sensibilidade à Optoquina permite distinguir duas espécies de *Streptococcus* α -hemolíticos.

Inicialmente é feita uma sementeira por esgotamento total em meio de gelose de sangue no qual é, posteriormente, impregnado um disco de Optoquina. A presença de um halo de inibição > 14 mm da cultura em placa, indica que a bactéria é sensível à ação da Optoquina. O *S. pneumoniae* é sensível à optoquina enquanto o *S. viridans* é resistente.

Teste de sensibilidade à Bacitracina

A presença de um halo de inibição em volta do disco de Bacitracina em cultura da placa, indica identificação presuntiva de estreptococos hemolítico do grupo A.

6.2.2 Métodos automáticos

Para a identificação microbiana das estirpes isoladas, o laboratório de microbiologia utiliza o sistema automatizado VITEK 2 Compact

6.2.2.1 Vitek 2 Compact

O equipamento Vitek 2 Compact, da bioMérieux - é utilizado para a realização de testes de diagnóstico *in vitro*, que utiliza cartas de identificação (tabela XVIII) com reagentes colorimétricos, inoculadas com uma suspensão microbiana da cultura, permitindo monitorizar por turbidimetria o crescimento microbiano durante o período de incubação. A leitura é feita por espectrofotometria. O sistema óptico utiliza díodos emissores de luz (LEDs) que produzem luz nos comprimentos de onda apropriados que medem o crescimento dos microrganismos através da quantidade de luz que é impedida de atravessar o poço.

Tabela XVIII: Cartas de identificação Sistema VITEK 2 Compact

Painel	Utilização
GN	Bactérias Gram negativos
GP	Bactérias Gram positivos
NH	Bactérias dos géneros <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.
YST	Identificação de fungos leveduriformes

6.3 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

6.3.1 Métodos manuais

No laboratório, os métodos manuais de TSA são realizados para bactérias fastidiosas, para testes de antibiótico inexistentes nas cartas do VITEK 2 para detecção de alternativas terapêuticas a agentes multirresistentes, para confirmação de resultados obtidos e para pesquisa de alguns mecanismos de resistência (ESBL e KPC) (28).

- Método de difusão de discos: Este método de difusão consiste na colocação de discos de papel de filtro impregnados com antimicrobianos na superfície de um meio apropriado com a suspensão bacteriana padronizada a testar. Após incubação, são observados e medidos os halos de inibição formados em redor dos antibióticos. O tamanho dos halos é expresso em mm e traduzido em resistente (R), intermédio (I) ou sensível (S).
- E- teste: Combina o princípio do método de difusão com disco (a preparação do inóculo é igual) com o do método de diluição (concentrações seriadas do antimicrobiano impregnadas em tiras)
- Métodos fenotípicos para detecção e comprovação da resistência aos Carbapenemos (KPC)

6.3.2 Métodos automáticos

O Vitek 2 Compact permite a execução de testes de sensibilidade (Tabela XIX) por técnica de microdiluição em meio líquido, utilizando as cartas constituídas por conjuntos específicos de antibióticos, em várias concentrações devidamente definidas e localizadas em poços. O equipamento possui sistemas de detecção ótica capazes de medir alterações de crescimento bacteriano permitindo a avaliação dos valores de CMI (concentração mínima inibitória).

Tabela XIX: Cartas de testes de sensibilidade aos antimicrobianos Sistema VITEK 2 Compact

Galerias	Utilização
AST N355	Antibiograma para <i>Enterobacteriaceae</i>
AST 373	Antibiograma para <i>Enterobacteriaceae</i> não fermentadores
AST P586	Antibiograma para <i>Enterococcus</i>
AST P648	Antibiograma para <i>Staphylococcus</i>
AST ST03	Antibiograma para <i>Streptococcus</i>

6.4 Processamento de produtos biológicos

Consoante o tipo de amostra e a sua finalidade, os produtos biológicos são inoculados em diferentes meios de cultura. Em seguida irei descrever de uma forma resumida, o processamento das amostras que tive oportunidade de realizar durante o estágio no laboratório de Microbiologia Clínica.

6.4.1 Amostras de Urina

O exame bacteriológico da urina é um meio complementar de diagnóstico capaz de confirmar a presença de infeção urinária. As infeções do aparelho urinário são das infeções mais frequentes, geralmente causadas por bactérias da flora intestinal “saprófita”, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra (28). Este exame está indicado na suspeita de alguns destes sintomas: cistite, pielonefrite, bacteriúria assintomática, prostatite aguda, abscesso renal, sépsis com ponto de partida urológico. Os pilares essenciais do processamento biológico são a presença de leucócitos e bacteriúria (29).

6.4.1.1 Procedimento laboratorial em amostras de Urina

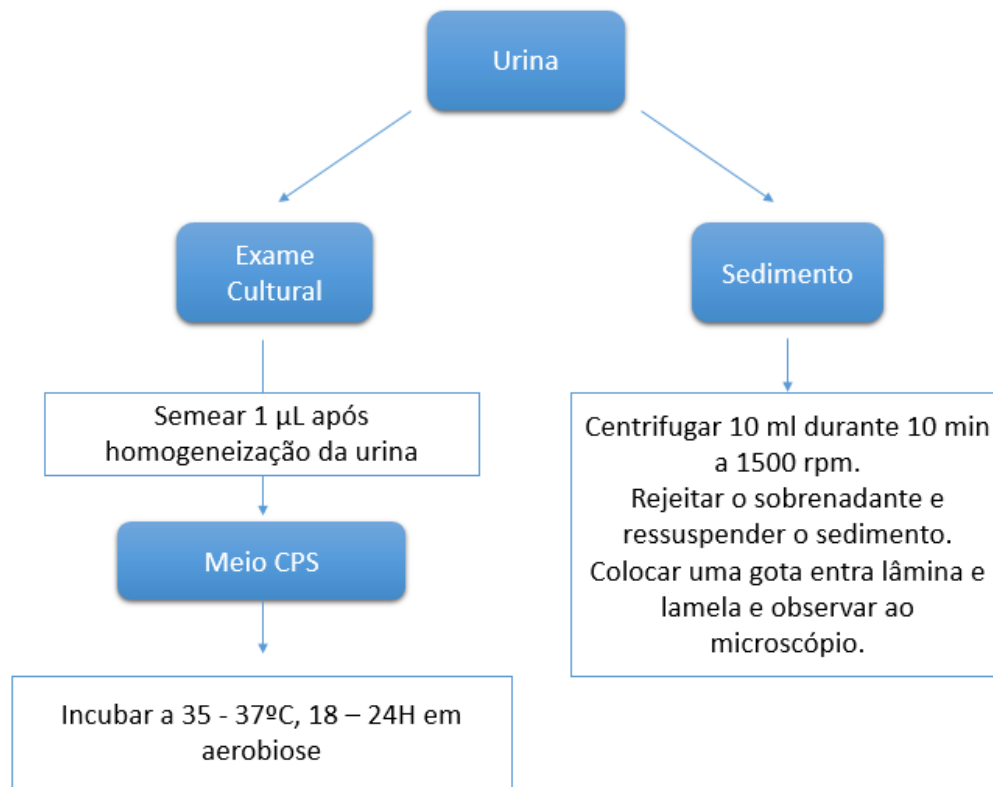


Figura 11 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Urina

Exame Direto

- Esfregaço da urina corado pelo Gram
- Exame direto a fresco do sedimento urinário:

As urinas são centrifugadas a 1500 rpm ($V = 10 \text{ mL}$) durante 10 minutos. Após desprezar o sobrenadante, ressuspende-se o sedimento ($V = 1 \text{ mL}$) e procede-se à visualização do sedimento no microscópio.

Observam-se dez campos diferentes com a objetiva de 40x e regista-se a presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, sendo que os resultados são dados por campo (raras, alguns, bastantes, numerosos) – Tabela XX. Podem ainda estar presentes cilindros, cristais, muco, fungos e bactérias.

Tabela XX: Quantificação do sedimento urinário

Parâmetro visualizado	Quantificação (por campo)
Células epiteliais	1-2: Raras
	3-6: Algumas
	7- 15: Bastantes
	>15: Numerosas
Leucócitos	1-5: Raras
	5-10: Algumas
	10-25: Bastantes
	>26: Numerosos
Eritrócitos	1-3: Raros
	4-6: Alguns
	7-15: Bastantes
	>16: Numerosos

Exame Cultural

- Após a homogeneização da urina, utiliza-se uma ansa descartável com um volume de 1µL e inocula-se o conteúdo da ansa sob a superfície da gelose do meio de CPS, fazendo uma estria de cima a baixo na zona central e esgotando o produto perpendicularmente à inoculação primária.
- As culturas vão a incubar na estufa numa temperatura compreendida entre 35°C - 37°C, sendo que, na maioria dos casos, a bacteriúria é detetada entre 18 - 24 horas de incubação.
- A contagem e valorização das colónias observadas nos meios de cultura, é realizada de acordo com o número de colónias, exame direto a fresco do sedimento urinário e com a informação clínica disponível.
- Para o cálculo da concentração bacteriana, faz –se a contagem de colónias para cada tipo, multiplicando o nº de colónias pelo fator de diluição: Ansa 1µL - 1 colónia = 10³ UFC/mL (1 µL = 0,001mL); sendo que a presença de N^o de UFC/mL superior a 10⁴ (10 colónias) é preditivo de infeção urinária. A presença de muitas células pavimentosas descamadas e diferentes morfotipos bacterianos indica contaminação extra urinária devendo-se solicitar nova amostra.

- Perante a presença de 2 ou mais colónias diferentes com interesse, procede-se à repicagem da (s) colónia (s) para os meios adequados de forma a obter-se culturas puras (Fig.12).
- Após isolamento em meios adequados, procede-se à identificação dos agentes etiológicos e TSA.

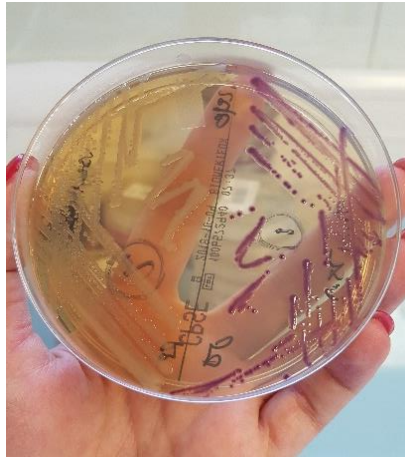


Figura 12 - Culturas puras de *Escherischia coli* e *Proteus mirabillis* após repicagem em meio CPS

Durante o estágio a maior parte das colónias observadas foram sobretudo:

- **Bactérias Gram (-)** – Bactérias do género *Enterobactereaceae* com destaque para *Escherischia coli*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp.
- **Bactérias Gram (+)** – O *Staphylococcus saprophytus* e *Enterococcus* spp.

6.4.2 Amostras de Exsudado Vaginal

A flora vaginal varia consideravelmente consoante diversos fatores, tais como pH vaginal, idade e atividade sexual. Após a puberdade, em virtude do pH e da ação da lisozima existente no muco cervical, há um predomínio de *Lactobacillus* anaérobios. Os *Lactobacillus* são bacilos finos e compridos Gram (+), produtores de ácido láctico e peróxido de hidrogénio, que mantêm o pH vaginal ácido e impedem a proliferação de bactérias patogénicas (30). Algumas infeções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita (28). Os agentes de infeção com relevância clínica neste tipo de produto são habitualmente: *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trochamatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma* spp., *Ureoplasma* spp. e *Candida* spp. (29).

6.4.2.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Vaginal

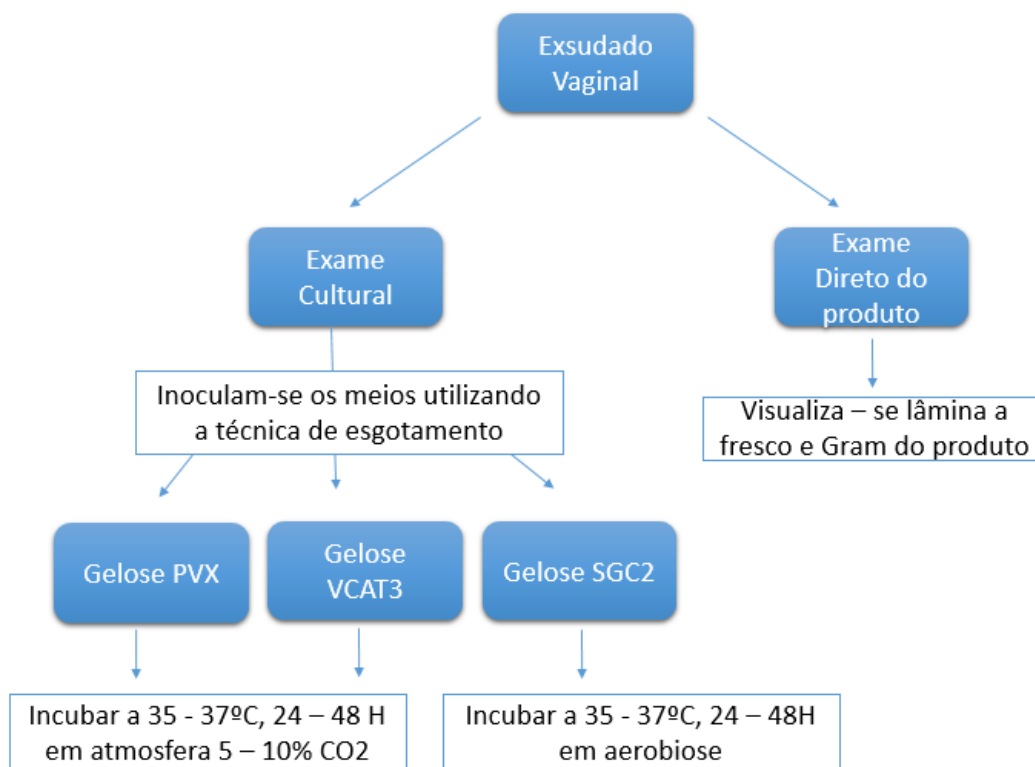


Figura 13 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Vaginal

Exame Direto

- **Lâmina a fresco:**

Numa lâmina adiciona-se uma gota de soro fisiológico e o conteúdo da zaragatoa obtida durante a colheita, procedendo-se à observação ao microscópio ótico. São avaliados qualitativamente: células, leucócitos, eritrócitos (raros, alguns ou numerosos), elementos leveduriformes e parasitas (*Trichomonas vaginalis*).

- **Lâmina corada (Gram):**

Avalia-se e descreve-se a flora vaginal existente: *Lactobacillus spp* (ausentes, raros, alguns ou numerosos), tipo de flora predominante (mista, Gram (-), Gram (+), bacilos, cocos, etc...). É de salientar que a presença de “clue cells” é sugestiva de *Gardnerella vaginalis*.

Exame Cultural

- A zaragatoa é descarregada em todos os meios e a sementeira é feita por quatro quadrantes com recurso a uma ansa, de forma a obter colónias isoladas.
- As placas de PVX e VCAT3 são incubadas a 35 - 37°C, durante 24 - 48H numa atmosfera 5 – 10% em CO₂. A gelose SG2 é incubada 24 - 48 horas, a 35 - 37°C, em aerobiose.
- Após a observação cultural e valorização dos agentes patogénicos, procede-se à sua identificação e à realização do TSA.

Durante o estágio as culturas observadas neste tipo de produto foram colónias de *Gardenerella vaginalis* e *Candida albicans*, tendo também sido observado *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco.

6.4.3 Amostras de Exsudado Uretral

Como agentes de infeções, pesquisam-se habitualmente no exsudado uretral: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. e fungos (29).

6.4.3.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Uretral

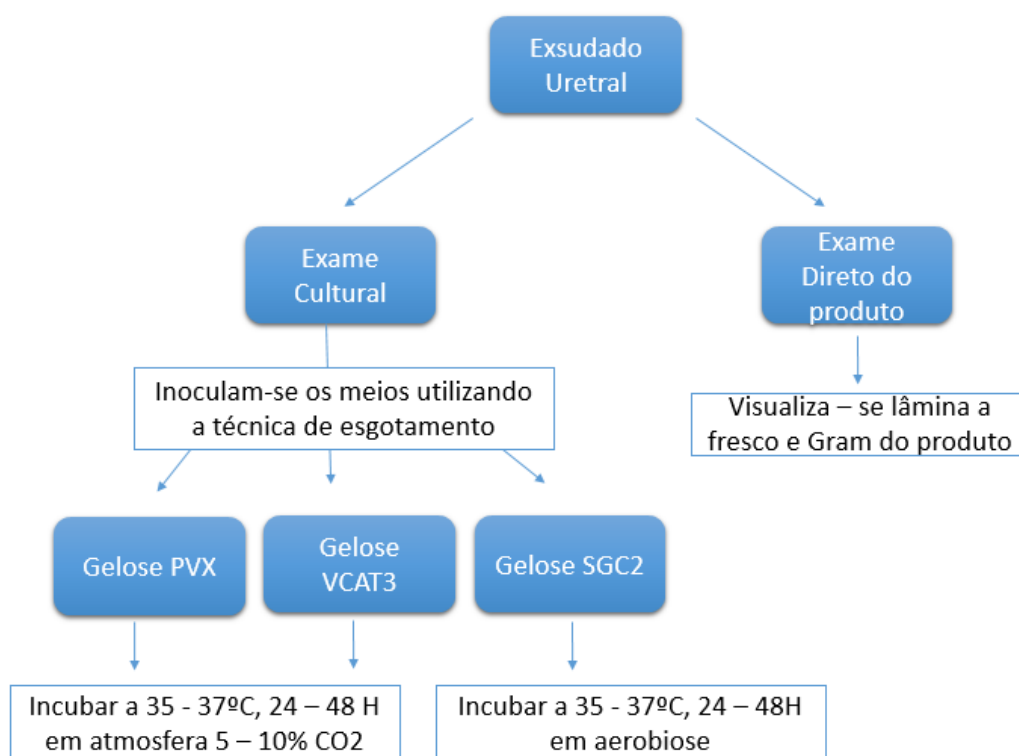


Figura 14 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Uretral

O procedimento laboratorial para o exsudado uretral é idêntico ao do exsudado vaginal. Durante o estágio tive oportunidade de observar culturas de *Neisseria gonorrhoeae* neste tipo de produto.

Quando isolada uma cultura de *Neisseria gonorrhoeae* é preenchida uma folha de notificação para a rede de Vigilância Laboratorial das infeções por *Neisseria gonorrhoeae* e enviada para o INSA de modo a ser identificada por genotipagem e a realização do TSA.

6.4.4 Pesquisa de Estreptococos do grupo B - Exsudado vaginal/ retal

O Estreptococos do grupo B (SGB) faz parte da microbiota normal do aparelho gastrointestinal, a partir do qual pode colonizar a vagina e por vezes o trato urinário. A colonização do aparelho genital pode ser intermitente, facto importante para as gestantes, pela possibilidade de transmissão ao recém nascido. Atualmente a SGB é a principal causa de sépsis neonatal. Esta infeção pode manifestar-se nas primeiras horas de vida sob a forma de pneumonia, sépsis ou meningite (29).

6.4.4.1 Procedimento laboratorial para pesquisa de Estreptococos do grupo B - Exsudado Vaginal/Retal

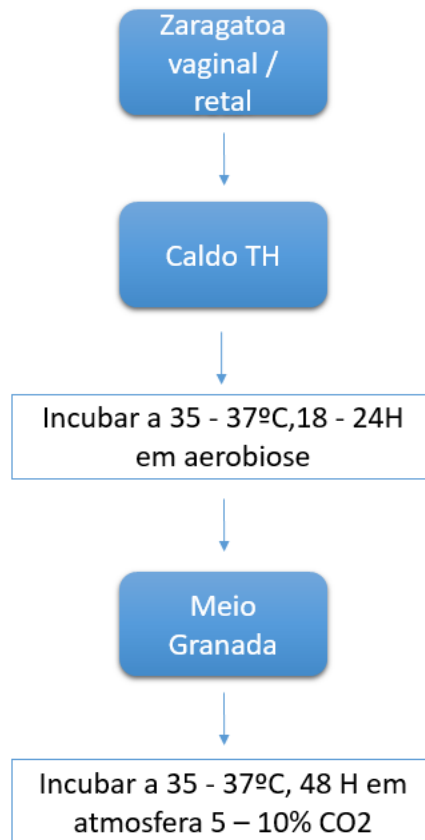


Figura 15 - Fluxograma procedimento laboratorial para pesquisa de Estreptococos do grupo B - Exsudado Vaginal/ Retal

Exame Cultural

- Inoculação do conteúdo da zaragatoa no caldo Todd Hewitt ficando a incubar 18 – 24H a uma temperatura de 35 – 37°C.
- Subcultura do caldo TH para gelose de Granada que vai a incubar a uma temperatura 35 – 37°C durante 48 H em atmosfera 5-10% CO₂.



Figura 16 - Cultura de *Streptococcus agalactiae* em meio de Granada

O meio de Granada, é um meio específico, seletivo e diferencial baseado na detecção de um pigmento. Na presença de colônias alaranjadas é um resultado positivo (Fig.16)

6.4.5 Amostras de Exsudado Nasal

A zaragatoa nasal só tem interesse para detecção de portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes á Meticilina (MRSA). O *S. aureus* tem a capacidade de adquirir determinantes de virulência e de resistência a antibióticos, sendo o gene *mecA* o mecanismo clinicamente relevante que confere resistência à Meticilina e portanto a todos os antibióticos B-Lactâmicos. O MRSA é um dos agentes mais frequentes implicados em infecções associadas aos cuidados de saúde nomeadamente bacteriemia, endocardite, pneumonia e osteomielite (29, 30).

6.4.5.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Nasal

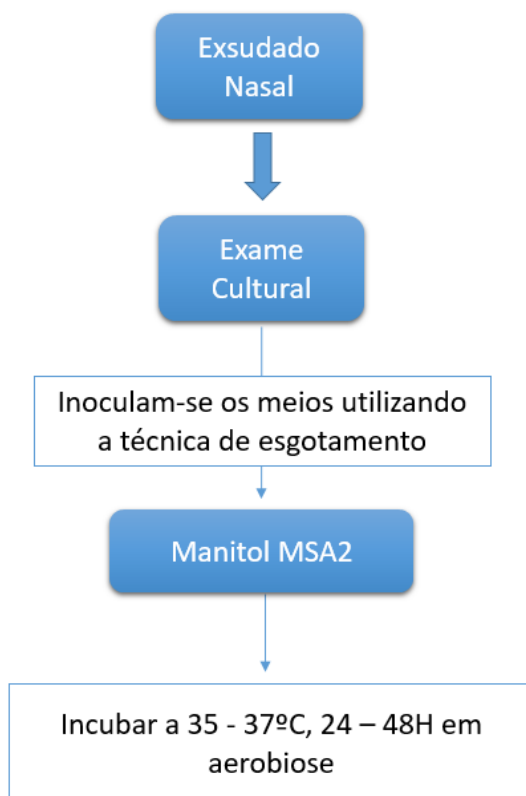


Figura 17 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Nasal

Exame Cultural

- Descarrega-se o conteúdo da zaragatoa em meio de MSA2 e faz-se a sementeira por quatro quadrantes com recurso a uma ansa, que vai a incubar a uma temperatura de 35 - 37°C, durante 48H, em aerobiose.

O meio sólido de manitol contém uma elevada concentração de cloreto de sódio, que permite distinguir as colónias de *S. aureus* da grande maioria das espécies de estafilococos coagulase negativa, através da sua cor amarela indicativa de fermentação do manitol, com consequente libertação de ácido que baixa o pH do meio e altera a sua cor (vermelho fenil) para amarelo (30) (Fig.18).



Figura 18 - Cultura *Staphylococcus aureus* em meio Gelose Manitol

Na presença de uma cultura positiva, a Cefoxitina é o antibiótico de escolha para os testes de sensibilidade à Meticilina em meio de Mueller-Hinton (MHE). A preparação do inóculo consiste na emulsão de colónias da cultura bacteriana em solução salina, e ajustar ao padrão de 0,5 McFarland (densímetro). Em seguida mergulha-se uma zaragatoa na suspensão bacteriana e semeia-se em estrias apertadas por todo o meio (MHE). Com uma pinça esterilizada aplica-se o disco de Cefoxitina e procede-se á leitura 18 horas após incubação numa temperatura entre 35 - 37°C em aerobiose (Fig.19). Uma leitura com um halo inferior a 22mm é um resultado positivo para MRSA (29).



Figura 19 - Teste sensibilidade à Meticilina em meio Gelose Mueller-Hinton E

Todos os resultados positivos são comunicados por via telefónica para o serviço respetivo, para medidas de isolamento de contacto.

6.4.6 Amostras de Exsudado Orofaríngeo

O diagnóstico laboratorial da faringite bacteriana aguda (faringe e amígdalas ruborizadas com exsudado purulento) apenas inclui a pesquisa do *Streptococcus pyogenes*. Esta deteção é importante mesmo em número reduzido de microrganismos, uma vez que é indicador da possibilidade de ressurgimento da febre reumática, e síndrome de choque tóxico (29).

6.4.6.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Orofaríngeo

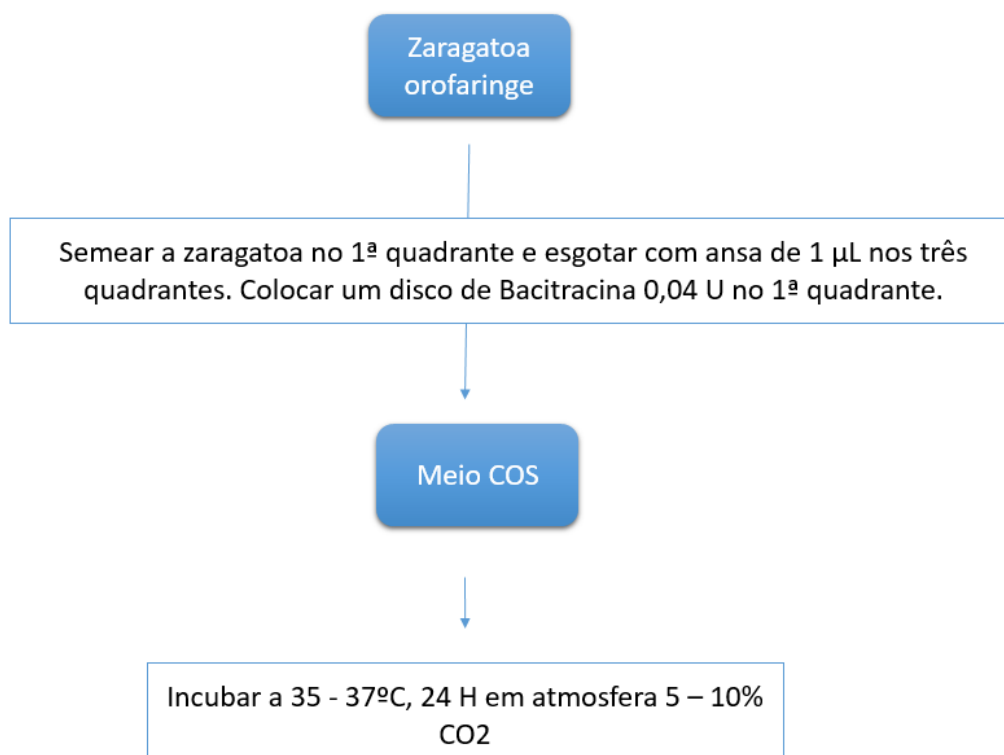


Figura 20 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Orofaríngeo

Exame Cultural

- A zaragatoa é descarregada no meio de COS e a sementeira feita por três quadrantes com recurso a uma ansa, que vai a incubar a uma temperatura de 35 - 37°C em atmosfera 5 -10% CO₂.
- Na observação do exame cultural, se se verificar a presença de colónias com β-hemólise é realizada a prova de sensibilidade à Bacitracina a partir da colónia suspeita e efetua-se a identificação e realização do TSA.

Para despiste de Streptococcus β- hemolíticos do grupo A, o Laboratório possui um teste rápido imunocromatográfico que permite a deteção qualitativa do antigénio do estreptococos do grupo A.

6.4.7 Amostras de Exsudado Auricular

Neste tipo de produto, é importante fazer a distinção entre as zaragatoas auriculares para colheita de pús com origem no ouvido médio por rutura do tímpano, e as zaragatoas para diagnóstico de infeções bacterianas da pele do canal auditivo externo. A análise de uma colheita realizada a nível do ouvido externo não fornece informação sobre o agente da otite média. Para isolar o agente da otite média, o produto é tratado como um pús (28, 29).

6.4.7.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Auricular

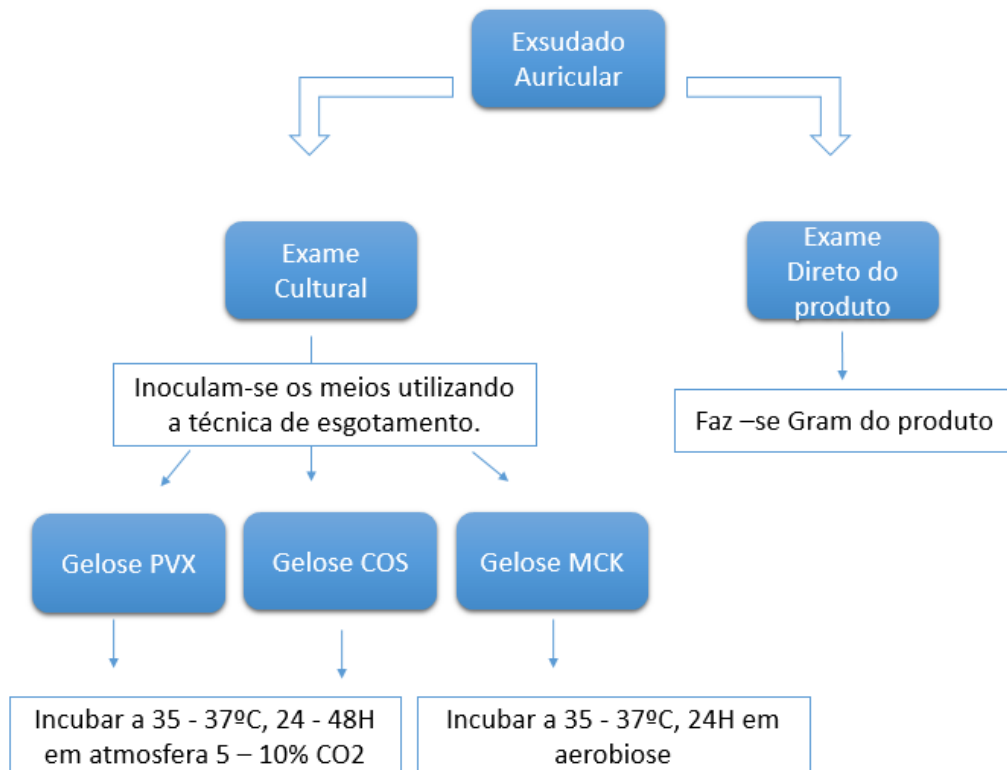


Figura 21 - Fluxograma procedimento laboratorial em mostras de Exsudado Auricular

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram

Exame Cultural

- Para exsudados auriculares colhidos em zaragatoa a sementeira é feita em meio de COS, PVX (incubados a uma temperatura de 35° - 37° C numa atmosfera de 5 - 10% de CO₂) e MCK (incubado, a 35° - 37°C em aerobiose durante 24 horas).
- Após a observação cultural e valorização dos agentes patogénicos, procede-se à sua identificação e realização de TSA.

Durante o estágio tive oportunidade de observar cultura de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig.22) neste tipo de produto.

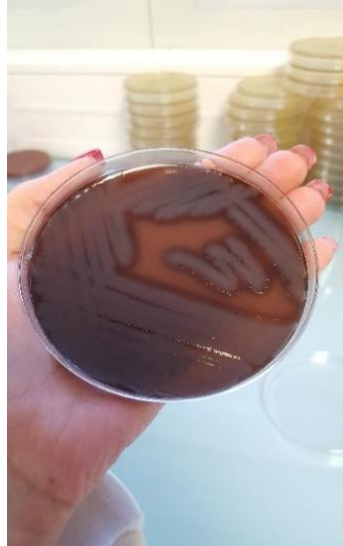


Figura 22 - Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* em meio Gelose Chocolate PolyviteX

6.4.8 Amostra de Secreções Respiratórias

O diagnóstico de infecções do aparelho respiratório inferior é muitas vezes difícil pela dificuldade em obter-se uma amostra representativa e de boa qualidade, devido à contaminação com a flora saprófita do trato respiratório superior e à diluição salivar.

A pesquisa de microrganismos patogênicos neste tipo de amostra está bem estabelecida: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Mycobacterium tuberculosis* (28, 29).

6.4.8.1 Procedimento laboratorial em amostras de Secreções Respiratórias

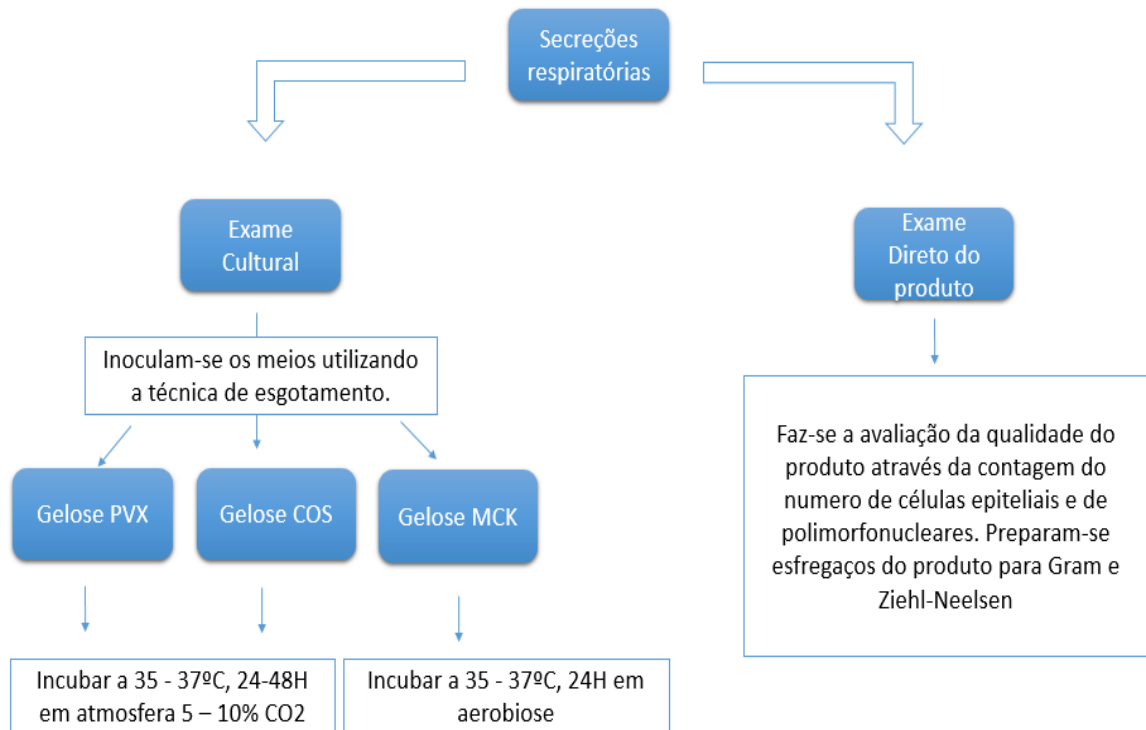


Figura 23 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Secreções Respiratórias

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram. Observação feita ao microscópio óptico em cerca de 10 campos para avaliação da qualidade da amostra. Uma amostra de boa qualidade deve conter <25 células epiteliais pavimentosas e presença de >10 PMNs/ campo na visualização ao microscópio (Amp 100x). Neste exame também se pesquisa o agente microbiano associado à resposta inflamatória (agente predominante associado aos PMNs), ou ausência de um agente predominante (Gram com flora bacteriana mista ou Gram amicrobiano).

Exame Cultural

- Sementeira realizada em meio de PVX, COS (incubação a uma temperatura 35 - 37°C durante 48H em atmosfera 5-10% CO₂) e meio de MCK (incubação durante 24H a uma temperatura 35 - 37°C em atmosfera aeróbia) com recurso a ansa esterilizada de 10 µl, esgotando o inóculo por quatro quadrantes.
- Valorização das culturas de acordo com a qualidade da amostra, população microbiana predominante e informação clínica.
- Proceder ao reisolamento, identificação e TSA da estirpe valorizada.

As colónias observadas neste tipo de produto no decorrer do estágio foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* (Fig.24).



Figura 24 - Cultura de *Klebsiella pneumoniae* em meio Gelose Mac Conkey

6.4.9 Exame cultural para *Mycobacterium tuberculosis*

Nas amostras de expetoração é muitas vezes solicitado o exame direto e cultural para a pesquisa de BK (Bacilo de Koch) para despiste de tuberculose. O Bacilo de Koch (BK) é o agente responsável pela tuberculose uma doença altamente infecciosa e potencialmente fatal e de fácil propagação devido à rápida formação de aerossóis.

6.4.9.1 Procedimento laboratorial para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*

Exame Direto

- Observação do esfregaço após coloração de Ziehl-Neelsen, para pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR)

Exame Cultural

- Homogeneização e descontaminação das amostras com o objetivo de as fluidificar e destruir a flora contaminante eventualmente existente, pelo método N-acetilcisteína-NaOH.
- Inoculação do produto em meio de Lowenstein-Jensen (incubação a uma temperatura de 35 - 37°C em aerobiose durante 45 dias com uma visualização contínua das culturas para avaliação do crescimento)

Durante o estágio observei culturas de *Mycobacterium tuberculosis* (Fig.25) em amostras de expetoração. Na presença de suspeita da bactéria em questão, esta é enviada para um laboratório de referência a fim de se proceder à sua identificação por técnica de PCR e é solicitado o teste de sensibilidade aos antituberculostáticos.



Figura 25 - Cultura de BK em meio de Lowenstein-Jensen

6.4.10 Amostras de Exsudado Ocular

As infeções oculares podem ser divididas em: infeções das estruturas externas do olho, infeções das estruturas internas do olho e infeções do sistema lacrimal. A conjuntivite bacteriana representa o tipo mais frequente de infeção ocular (28, 29).

6.4.10.1 Procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Ocular

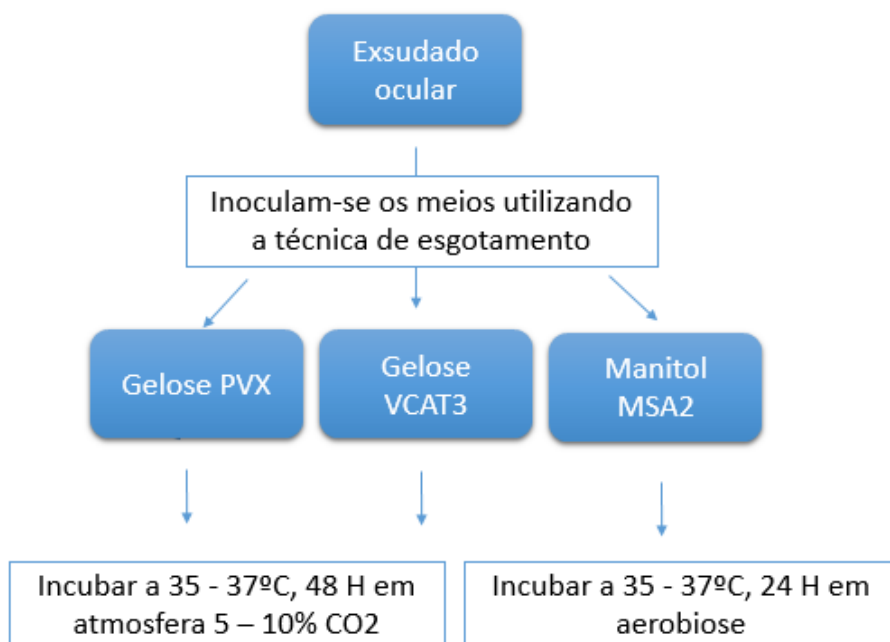


Figura 26 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Exsudado Ocular

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram

Exame Cultural

- Sementeira realizada em meio de PVX e VCAT3 (incubação a 35 - 37°C, durante 24 - 48H numa atmosfera 5 - 10% em CO₂) e MSA2 (incubação durante 24 horas, a 35 - 37°C, em aerobiose).
- Após a observação cultural e valorização dos agentes patogénicos, procede-se à sua identificação e realização de TSA.

Durante o estágio tive oportunidade de observar cultura de *haemophilus influenzae* neste tipo de produto.

Na presença de colónias de *Haemophilus* spp. procede-se à leitura dos halos de suscetibilidade de acordo com as normas EUCAST (Fig.27).

Para a execução do antibiograma com discos prepara-se uma suspensão salina com uma turvação de 0,5 McF e inocula-se a suspensão numa placa MHEF juntamente com os discos – Amox/ Ac. Clavulânico, Ampicilina, Cefotaxima, Eritromicina, Levofloxacina, Imipenemo e Sulfametoxazol/ Trimetropim, e o meio vai a incubar a uma temperatura 35 – 37°C em anaerobiose, por um período de 24h.



Figura 27 - Halos de suscetibilidade em cultura de *Haemophilus* sp no meio Gelose Mueller Hinton + 5% de sangue de cavalo

6.4.11 Amostras Purulentas

Os microrganismos residentes na pele e nas membranas mucosas bem como os do meio ambiente podem causar infeções se tiverem acesso através de lesões cutâneas ou das membranas das mucosas. Devido às múltiplas variáveis envolvidas, a metodologia para o estudo microbiológico de qualquer exsudado purulento tem de ter em consideração (29):

- Local anatómico da infeção
- Tipo de infeção (traumatismo ou cirúrgico)
- História Clínica
- Tipo de colheita: Zaragatoa ou Aspirado

6.4.11.1 Procedimento laboratorial em amostras Purulentas

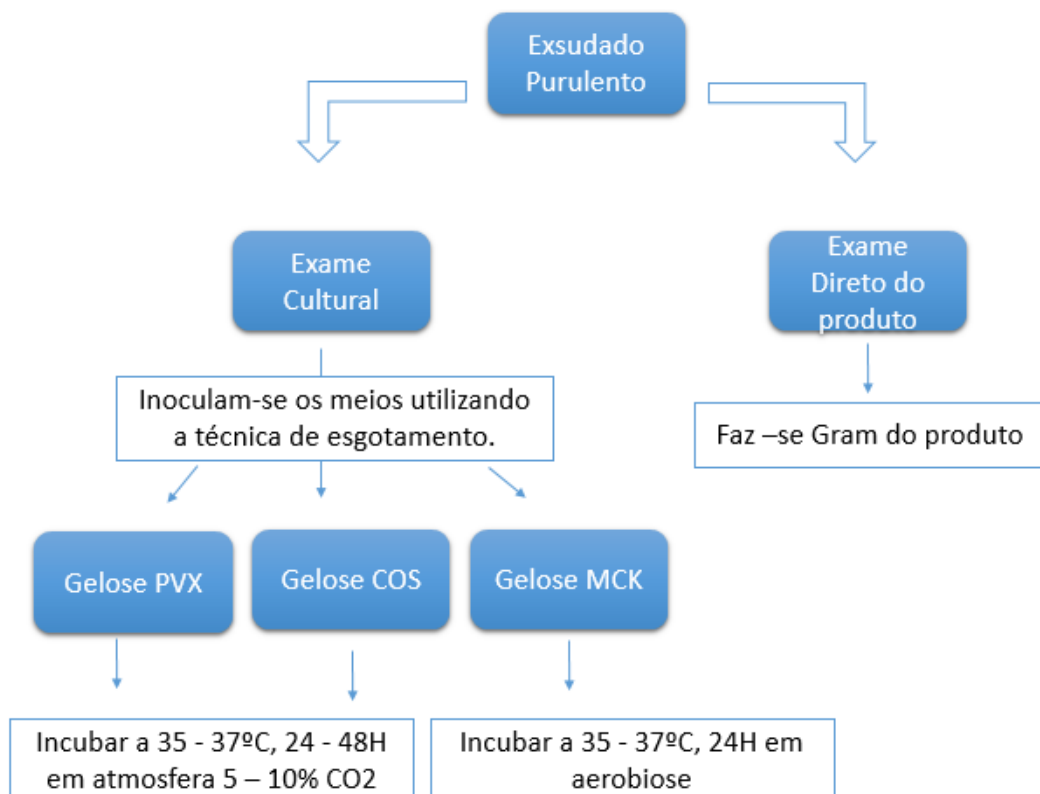


Figura 28 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras Purulentas

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram

Exame Cultural

- Exsudados purulentos colhidos em zaragatoa, é realizada a sementeira em meios de COS, PVX (incubação a uma temperatura de 35° - 37° C numa atmosfera de 5 – 10% de CO₂ durante 48H) e MCK (incubação a temperatura de 35° - 37°C em aerobiose durante 24 horas)

6.4.11.2 Procedimento laboratorial em aspirados de amostras Purulentas

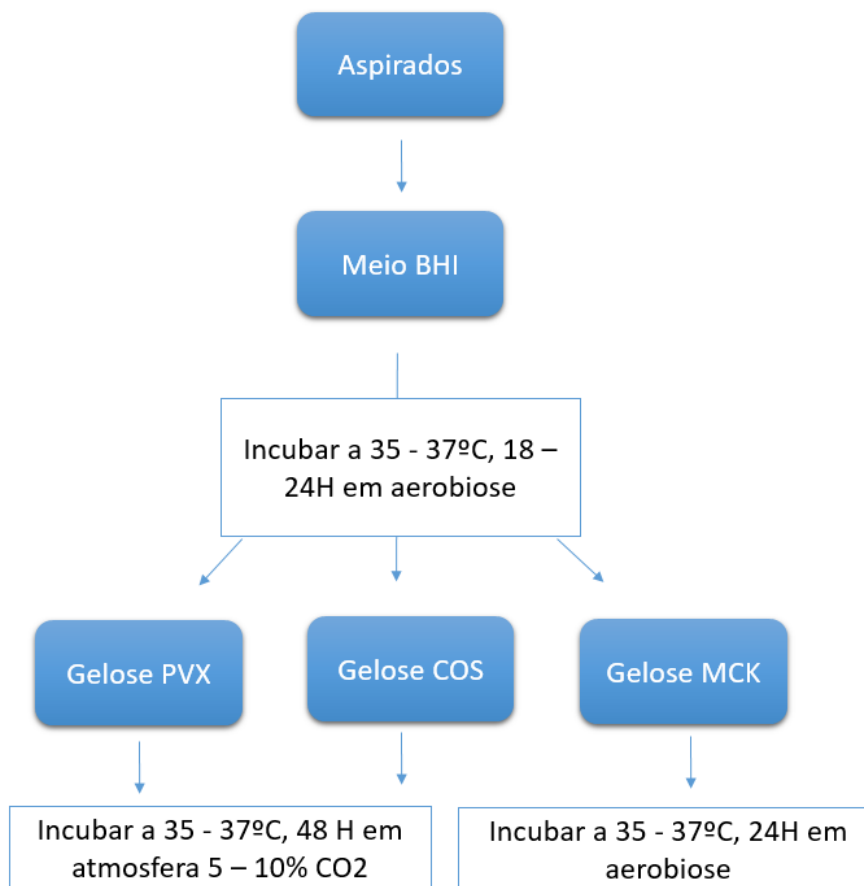


Figura 29 - Fluxograma procedimento laboratorial em aspirados de amostras Purulentas

Exame Cultural

- Inoculação de amostras de aspirados em caldo de enriquecimento (BHI) durante 18- 24H a 35 - 37°C em atmosfera adequada
- Efetuar subcultura do meio líquido BHI para os meios sólidos de COS, PVX e MCK mediante as mesmas condições
- Nos meios de cultura com crescimento faz se a correlação com o Gram, registrando as características e a semi-quantificação dos diferentes tipos de colónias
- A partir de colónias relevantes efetuam-se os testes necessários para identificação e caracterização o perfil de suscetibilidade aos antibióticos

Durante o estágio a maior parte de colónias observadas neste tipo de produto foram *Staphylococcus aureus* (Fig.30), *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii*.



Figura 30 - Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e Gelose Chocolate PolyviteX

6.4.12 Amostras de Esperma

A espermocultura é um exame laboratorial que analisa a presença de microrganismos no sêmen, sendo possível determinar a presença de agentes patogénicos capazes de causar processos inflamatórios, como é o caso de prostatite (29).

6.4.12.1 Procedimento laboratorial em amostras de Esperma

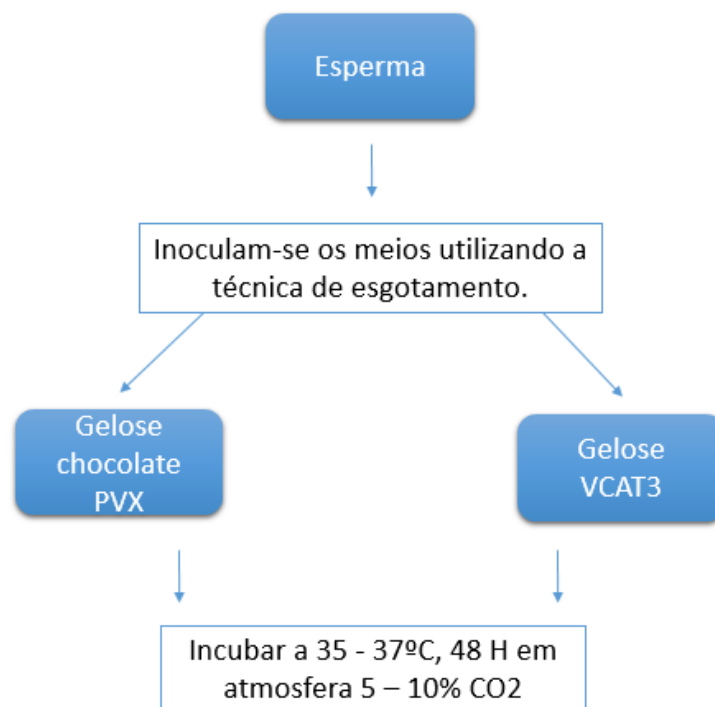


Figura 31 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Esperma

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram

Exame Cultural

- Sementeira realizada nos meios de PVX e VCAT3 (incubação a uma temperatura 35-37°C, durante 24 - 48H em atmosfera 5 – 10% CO₂)
- Observação cultural e valorização dos agentes patogénicos, identificação e realização de TSA.

Durante o estágio foi observada cultura de *Proteus mirabilis* neste tipo de produto; exame sobreponível ao exame cultural da urina.

6.4.13 Amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares

6.4.13.1 Procedimento laboratorial em amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares

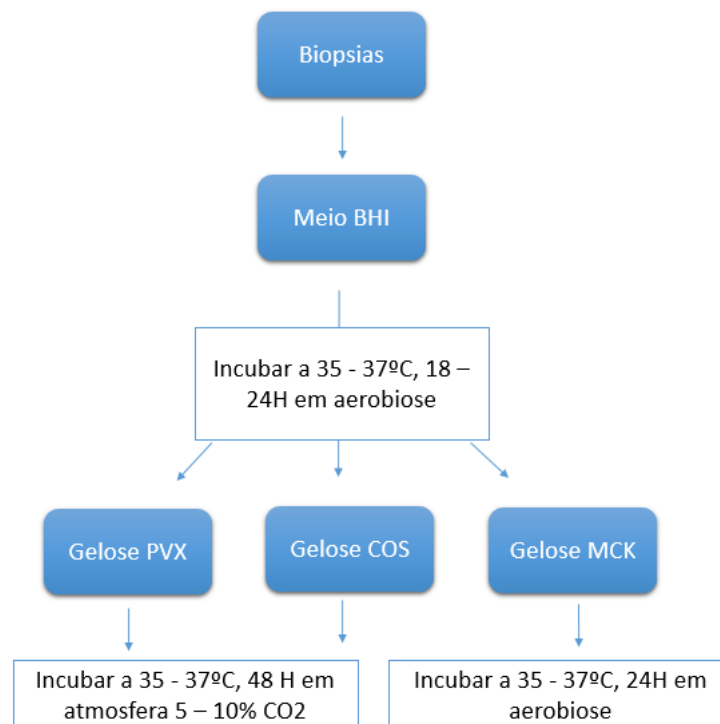


Figura 32 - Procedimento laboratorial em amostras de Biopsias e Fragmentos Tecidulares

Exame Cultural

- Inoculação de fragmentos tecidulares em caldo de enriquecimento BHI (incubação a uma temperatura 35 - 37°C em atmosfera aeróbica).
- Subcultura do meio líquido BHI para meio sólido de COS, PVX e MCK na atmosfera adequada.
- Observação cultural e valorização dos agentes patogênicos, identificação e realização de TSA

6.4.14 Amostras de Líquido Céfalo-Raquidiano

A Meningite Bacteriana é uma emergência médica pois a infecção das meninges é uma situação clínica grave e potencialmente mortal se não for tratada atempadamente. O diagnóstico laboratorial é uma urgência que requer processamento imediato do produto para determinar o agente etiológico. Este tipo de produto deve ser enviado ao Laboratório imediatamente após a colheita, e mantido à temperatura ambiente (ou na estufa a 35°C), sendo necessários 3 tubos: 2 para exame citológico e bioquímico e outro para exame microbiológico (último tubo) (28).

6.4.14.1 Procedimento laboratorial em amostras de Líquido Céfalo-Raquidiano

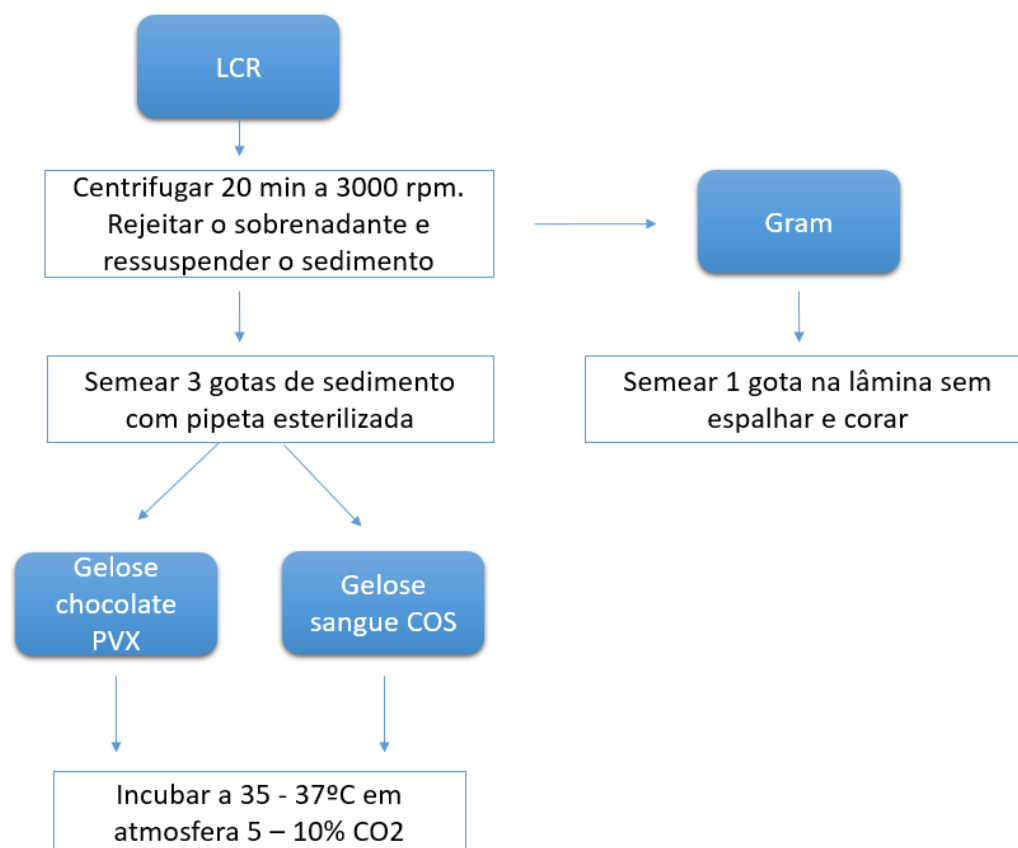


Figura 33 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Líquido Céfalo-Raquidiano

Exame Direto

- Contagem celular pela câmara de Neubauer, sendo o resultado fornecido via Apollo de modo a orientar a abordagem terapêutica ao doente
- As lâminas são feitas a partir do sedimento e coradas pelo método de Gram. Qualquer resultado positivo deve ser imediatamente comunicado ao clínico.

Exame Cultural

- Sementeira por gota realizada em meio de PVX e COS (incubação a uma temperatura 35 – 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ durante 5 dias)
- Após a observação cultural e na presença de crescimento, procede-se à identificação e realização de TSA.

Durante o estágio observei cultura de *Neisseria meningitidis*. Quando isolada uma estirpe de *Neisseria meningitidis*, é preenchido o documento “Vigilância Laboratorial da Doença Meningocócica” disponibilizado pelo INSA, e a cultura é enviada para realização do antibiograma e serotipagem.

6.4.15 Amostras de Líquidos das Cavidades Serosas e Bile

As infecções dos líquidos das cavidades orgânicas, normalmente estéreis, podem levar a uma elevada mortalidade e morbidade. Qualquer microrganismo isolado a partir de um líquido estéril tem significado clínico, e deve ser reportado (29).

6.4.15.1 Procedimento laboratorial em amostras de líquidos das Cavidades Serosas e Bile

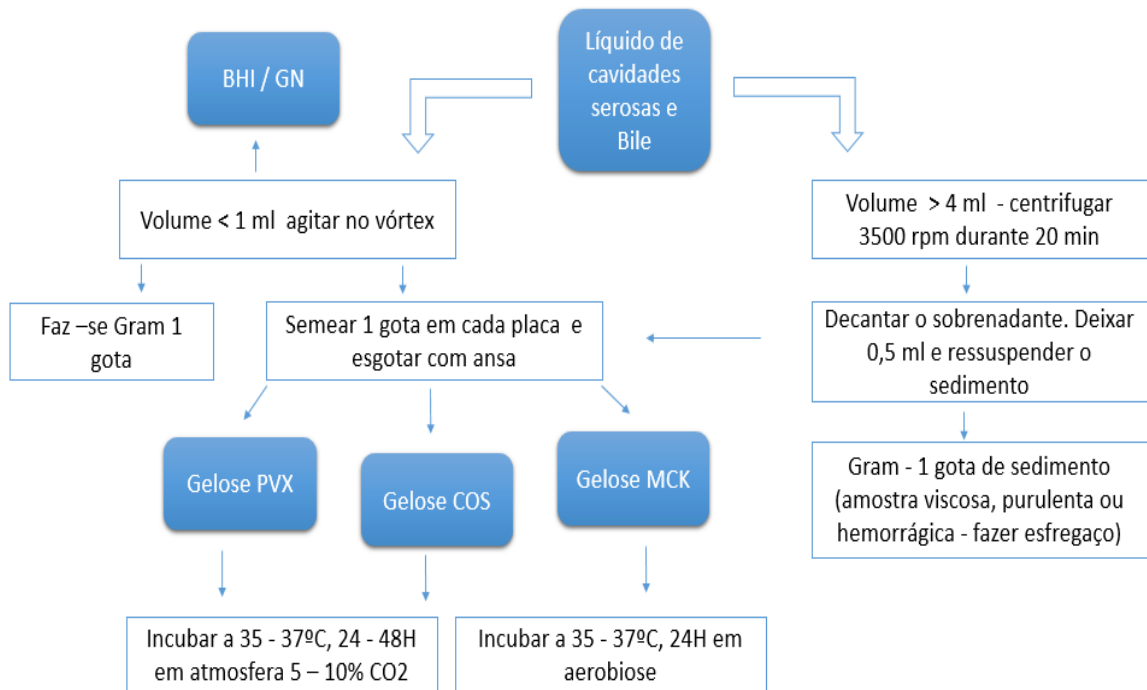


Figura 34 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Líquidos das Cavidades Serosas e Bile

Exame Direto

- Lâminas feitas a partir do sedimento e coradas pelo método de Gram

Exame Cultural

- Sementeira das amostras (diretamente ou após preparação) realizada em meios de gelose COS, PVX, MCK e caldo BHI ou GN. Os meios de COS e PVX vão a incubar numa atmosfera de 5-10% de CO₂ a 35- 37°C de temperatura, durante 48 horas. O meio seletivo MCK e os meios líquidos (BHI ou GN) vão a incubar a uma temperatura de 35º- 37°C, em aerobiose.
- Sempre que na inspeção visual se verifique turvação do caldo BHI, é efetuada subcultura para gelose de chocolate que vai a incubar em meio de anaerobiose.
- Quando o produto enviado é bile, para além dos meios referidos, esta é inoculada para meio de enriquecimento GN e a partir do caldo após 6 H de incubação é efetuada a subcultura para meio de HEKT.
- Nos meios de cultura sólidos com crescimento faz-se uma correlação com a observação do Gram, registando as características e a semi quantificação dos diferentes tipos de colónia.
- A partir das colónias relevantes, procede-se à identificação e caracterização do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

6.4.16 Amostras de Fezes

As infeções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com grande morbidade em determinados grupos etários (crianças e velhos). Quando é solicitado um exame bacteriológico de fezes, o laboratório pesquisa agentes patogénicos mais frequentes: *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp.

6.4.16.1 Procedimento laboratorial em amostras de Fezes

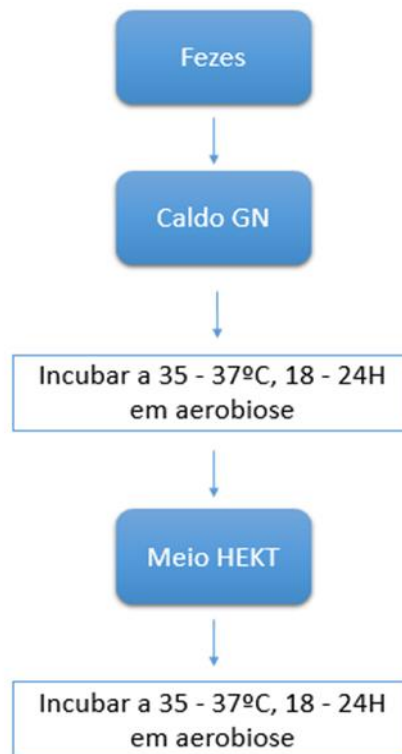


Figura 35 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Fezes

Exame Cultural

- Inoculação da amostra em Caldo de GN (incubação em atmosfera de aerobiose a 35 - 37°C de temperatura).
- Subcultura do meio líquido para meio sólido Hektoen (HEK) por quatro quadrantes com recurso a uma ansa (incubação em atmosfera de aerobiose, a 35 - 37° de temperatura durante 24 horas)
- Sementeira realizada em meio de Campyloset em condições de microaerofilia, durante 72 horas, a 42°C de temperatura para pesquisa de *Campylobacter* spp.
- Observação do exame cultural e valorização das colónias, procedendo-se ao reisolamento para posterior identificação e TSA dos agentes patogénicos.

Durante o estágio foram observadas culturas de *Salmonella* e *Campylobacter jejunii*. Quando isolada e identificada uma colônia de *Salmonella*, deve informar-se o clínico, e é preenchido o documento “unidade de referência e vigilância epidemiológica de infecções Gastrointestinais”, sendo enviada a estipe para o INSA para ser efetuada a serotipagem e o antibiograma da estirpe enviada.

6.4.16.2 Pesquisa de Sangue Oculto

Teste para detecção qualitativa de hemoglobina humana nas fezes, baseado no método imunocromatográfico, no qual apenas é reconhecida hemoglobina humana através de reações de anticorpos específicas (31).

6.4.16.3 Exame Parasitológico

Observação do produto após concentração por centrifugação - sedimentação em formalina-éter-acetato (Método de Ritchie), para pesquisa de ovos de helmintes e quistos protozoários provenientes de amostras fecais (com Lugol) (32).

6.4.16.4 Pesquisa de Toxina A e B de *Clostridium difficile*

Teste rápido imunocromatográfico para detecção de toxinas A e B de *C. difficile* (33).

6.4.17 Amostras de Sangue

As hemoculturas são produtos requisitados maioritariamente pelo serviço de urgência. Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção (28). As amostras de sangue chegam ao sector inoculadas em frascos com meio de cultura apropriados (hemoculturas), e são introduzidos no equipamento BACTEC 9050.

Este equipamento deteta o crescimento microbiano, através de medições de intensidade de fluorescência, que ocorre em consequência da produção de CO₂, em resposta à metabolização dos substratos presentes no meio.

6.4.17.1 Procedimento laboratorial em amostras de Sangue

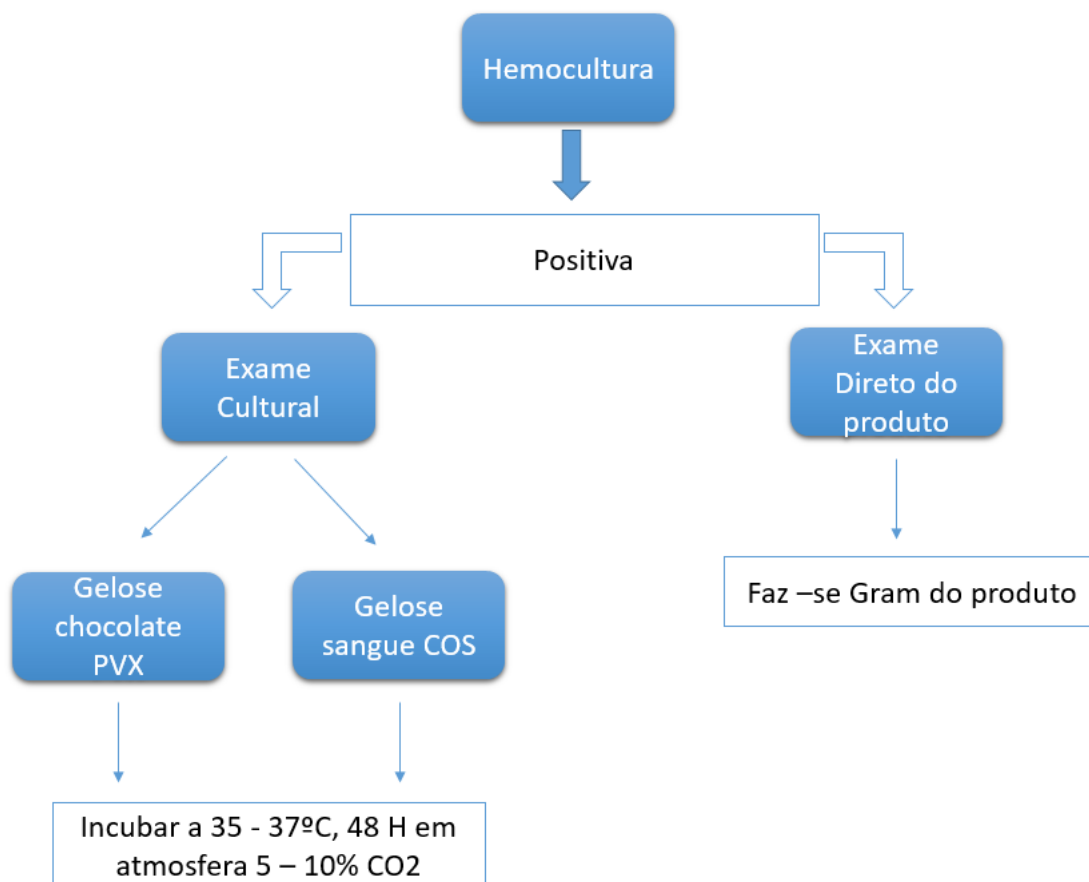


Figura 36 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Sangue

Exame Direto

- Esfregaço corado pelo Gram: observação do agente, suas características morfológicas, disposição e coloração torna possível dar informações preliminares aos clínicos.

Exame Cultural

- Subcultura para o meio sólido de gelose de sangue (COS) e gelose de chocolate (PVX) que vão a incubar em atmosfera de 5 – 10% de CO₂ a 35 - 37°C de temperatura até 48H
- A valorização dos resultados é feita de acordo com o diagnóstico clínico do doente, idade, estado imunitário e tipo de agente isolado.
- Isolamento e identificação do microrganismo e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos.
- Se no final de sete dias as hemoculturas não positivarem, estas são consideradas como negativas, sendo rejeitadas.

Durante o estágio foram observadas culturas provenientes de hemoculturas positivas de *Pseudomonas* e *Citrobacter* spp.

6.4.18 Amostras de Cateter Venoso Central

Segundo as Guidelines da Sociedade Americana de Doenças infecciosas, a ponta do cateter só deve ser cultivado para avaliar a possibilidade da responsabilidade do referido dispositivo como origem de um quadro de bacteriemia. Devem ser efetuadas duas hemoculturas, uma retirada periféricamente, e outra do cateter, acompanhando o segmento interno do cateter central. A bacteriemia/ fungemia relacionada com o cateter define-se quando há isolamento do mesmo agente (espécie e antibiograma iguais), isolados de uma hemocultura periférica, de outra hemocultura colhida do CVC e de uma cultura semiquantitativa da ponta do cateter, com quadro clínico de sépsis e sem outro foco aparente de infecção (34).

6.4.18.1 Procedimento laboratorial amostras de Cateter Venoso Central

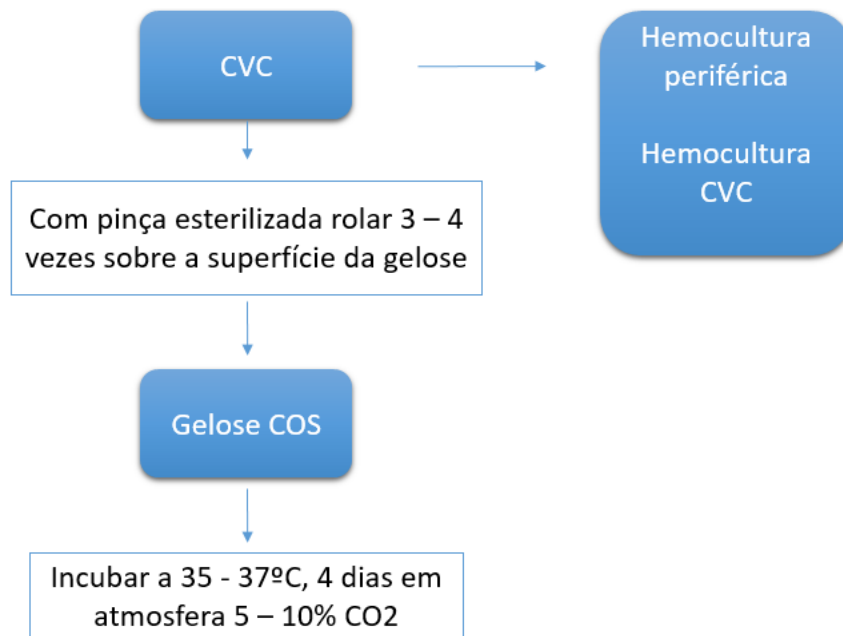


Figura 37 - Fluxograma procedimento laboratorial em amostras de Cateter Venoso Central

Exame Cultural

- Com o auxílio de uma pinça esterilizada faz-se rodar a ponta do catéter na superfície de gelose de COS e vai a incubar a uma temperatura 35 – 37°C numa atmosfera de 5 -10% CO₂.
- O tempo de incubação prologa-se até 4 dias (devido ao crescimento de leveduras).
- Na presença de um desenvolvimento superior a 15 colónias procede-se á valorização e identificação, correlacionando os isolamentos da cultura do catéter, com o resultado da hemocultura concomitante.

6.4.19 Amostras para exame Micológico

As infecções fúngicas podem ser classificadas como infecções cutâneas, subcutâneas, sistêmicas ou oportunistas.

6.4.19.1 Procedimento laboratorial de amostras para exame Micológico

Exame Cultural

- Sementeira realizada em meio de SGC2 numa temperatura compreendida entre 25 - 30°C e com cerca de 40 - 50% de humidade.
- Tempo de incubação de 30 dias para produtos como pele, unhas, cabelos

Exame Direto

- Visualização de lâmina com uma gota de lactofenol

6.5 Resistência aos antibióticos

A resistência aos antibióticos constitui um grave problema de saúde pública à escala mundial que se traduz num aumento de morbilidade e mortalidade.

A resistência múltipla em determinadas estipes atinge proporções que poderão ter como consequência não haver opções terapêuticas para tratar infeções bacterianas.

As ESBLs (Beta-Lactamases de espectro alargado) aparecem por mutação dos genes Beta - Lactamases comuns mediadas por plasmídios tais como TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Estas ESBLs conferem resistência às Penicilinas, Cefalosporinas e Aztreonam em isolados clínicos de *E.Coli*, *K. Pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Proteus Mirabilis*, e em outros géneros da família das Entobacteriaceas e que são suscetíveis aos referidos antimicrobianos.

A preparação do inóculo consiste na emulsão de algumas colónias da cultura bacteriana em solução salina, e ajustar ao padrão de 0,5 McFarland (densímetro). Em seguida

mergulha-se uma zaragatoa na suspensão bacteriana e semeia-se em estrias apertadas por todo o meio de Mueller-Hinton (MHE). Com uma pinça esterilizada aplicam-se os discos de Cefotaxime, Ceftazidima e Aztreonamo próximos dos discos de Amoxicilina/Ácido clavulânico, ficando a placa a incubar a uma temperatura de 35-37°C durante 18 horas.

Nas estirpes produtoras de ESBLs a prova de sinergismo é positiva, estando as zonas de inibição à volta de quaisquer Cefalosporinas e Aztreonamo aumentadas na direção do disco de Amoxicilina/Ácido clavulânico (Fig.20).



Figura 38 - Prova de sinergismo em meio Gelose Mueller-Hinton E

Para todas as estirpes produtoras de ESBLs a interpretação da prova deve ser reportada como resistente a todas as Penicilinas, Cefalosporinas e Aztreonamo (29).

A resistência aos Carbapenemos dos bacilos gram negativos como *Pseudomonas aeruginosas* e *Enterobacteriaceae*, deve-se a vários mecanismos combinados (produção metalo- β -lactamase denominadas por Carbapenemases em conjunto com bombas de efluxo) que hidrolisam os Carbapenemos. Têm sido isoladas estirpes principalmente de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) de infeções associadas a cuidados de saúde. Estas infeções são de elevada mortalidade, pois as opções terapêuticas são limitadas e há o perigo de transmissão de resistência por elementos genéticos móveis (29, 30).

Klebsiella, produtora de KPC, forma colónias azuis esverdeadas a azul acinzentado. A partir de cultura fresca, procede-se à identificação e TSA através do sistema automático.

Após a identificação do género e espécie bacteriana e o alerta para resistência dos Carbapenemos, efetua-se o teste confirmatório RAPIDEC CARBA NP (Fig.21) que se baseia na deteção de hidrólise dos Carbapenemos por bactérias produtoras de carbapenemases.

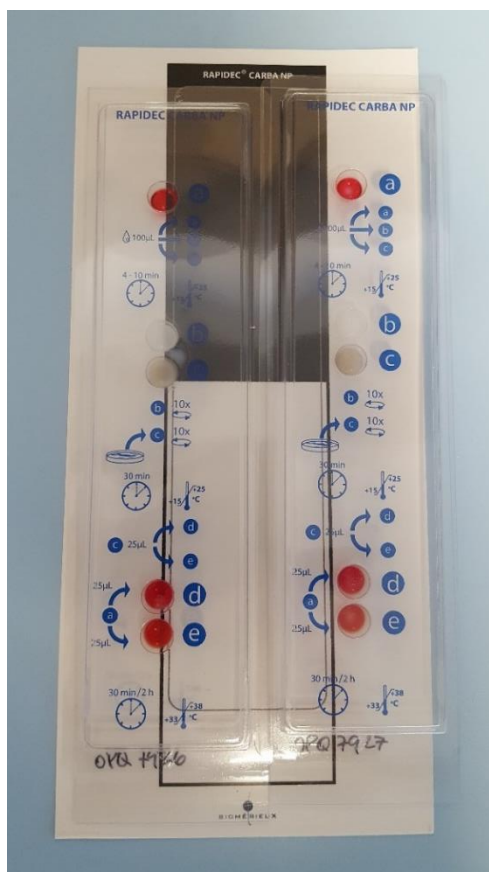


Figura 39 - Teste RAPIDEC CARBA NP

Envia-se o resultado do rastreio KPC positivo ao clínico, com a recomendação de medidas de isolamento de contacto, e comunica-se à comissão e controlo de infeção (CCI). O isolado é conservado e enviado em cultura para o INSA, juntamente com a identificação e o TSA.

6.6 Atividades desenvolvidas na área de Microbiologia Clínica

O estágio permitiu realizar e executar:

- Diferentes técnicas manuais e automatizadas;
- Observação microscópica de preparações a fresco, e coloração de Gram;
- Inoculação em meios e técnicas de sementeira, apropriados à realização de culturas dos diversos produtos biológicos, bem como às condições de incubação;
- Observação macroscópica das culturas, com a valorização ou não dos agentes isolados, e seleção de colónias para subcultura;
- Isolar e identificar microrganismos e determinar o perfil de sensibilidade aos antibióticos.

7 Eliminação de resíduos

O trabalho laboratorial implica a produção de um volume de resíduos, que além de ser muito considerável, também são perigosos em termos de saúde pública.

Todos os trabalhadores são responsáveis pela manutenção da higiene e da segurança no local de trabalho, o que implica conhecer e executar os procedimentos presentes no “Manual de Qualidade”, que tem indicações claras sobre as regras a seguir para a eliminação de resíduos.

A classificação dos resíduos encontra-se na tabela XXI, de acordo com o Despacho nº242/96 de 5 de Julho (35).

Tabela XXI: Classes de resíduos, segundo o Despacho nº242/96

Classes de resíduos	Descrição
Grupo I - Resíduos equiparados a urbanos	Todos os resíduos provenientes de refeitório, salas de reunião, salas de receção, salas de convívio e instalações sanitárias. Não têm exigências especiais, são resíduos provenientes de serviços gerais, são colocados em sacos pretos e têm como destino os contentores de lixo urbano
Grupo II - Resíduos hospitalares não Perigosos	Material não contaminado e sem vestígios de sangue ou reagentes proveniente das salas de colheita, tais como, invólucros e embalagens vazias de produtos utilizados são eliminados para sacos pretos e colocados em contentores de lixo comum.
Grupo III - Resíduos com risco biológico	Resíduos contaminados ou em que há suspeita de contaminação suscetíveis de inceneração ou outro pré tratamento eficaz provenientes das salas de colheita e das salas de trabalho, nomeadamente, algodão com vestígios de sangue, seringas, pensos, luvas, meios de cultura, tubos de

sangue ou soros, frascos de recolha de urina, e outros excedentes de amostras biológicas, são colocados em sacos brancos, dentro de um contentor de resíduos do grupo III, selados e recolhidos por uma empresa contratada e licenciada para o efeito

Grupo IV - Resíduos com elevado risco Biológico

Resíduos constituídos por materiais cortantes ou perfurantes provenientes das salas de colheitas e salas de trabalho, nomeadamente agulhas, seringas, lâncetas, lâminas de bisturi, são colocados diretamente em saco vermelhos ou em contentores corto-perfurantes posteriormente recolhidos por empresa certificada na gestão de resíduos. Os produtos líquidos contaminados e produtos de reação resultantes da atividade laboratorial são recolhidos para contentores identificados “resíduos especiais – Risco biológico” e a sua eliminação é realizada por uma empresa externa.

8. Conclusão

Embora desempenhe a atividade profissional na área das Análises Clínicas desde o término do mestrado em Ciências Farmacêuticas em 2011, este estágio profissional de estudos, conducente ao grau de Mestre em Análises Clínicas, permitiu a consolidação e aprofundamento de conhecimentos nas diversas técnicas laboratoriais; a possibilidade de aplicar os conhecimentos teóricos ao trabalho efetuado; a aquisição de metodologia nas técnicas realizadas nas diversas valências do laboratório, sempre seguindo os princípios das boas práticas laboratoriais; além de proporcionar uma enorme aprendizagem sobre a rotina hospitalar e a importância do trabalho de equipa.

Consciente do muito que há para aprender nesta área de conhecimento, sempre em mudança, só posso dizer que a realização deste estágio e a formação adquirida com o mestrado em análises clínicas, foi sem dúvida uma experiência enriquecedora e positiva, mas apenas o início de um ciclo no desenvolvimento da minha carreira profissional.

A todos, que colaboraram e me apoiaram neste caminho, “Bem Hajam”.

Anexo 1

Tubos De Colheita

EDTA



- Hemoglobina
- Plaquetas
- Fórmula leucocitária
- Reticulócitos
- Velocidade de Sedimentação (3ml)
- Coombs direta
- Coombs indireta
- Grupo Sanguíneo
- HLA B27 (se pedir hemograma – 2 tubos)
- Renina (2 tubos)
- Chumbo (2 tubos)
- Hemoglobina glicosilada
- Ciclosporina (2 tubos)
- Subpopulações Linfocitárias - CD4/CD8 (3 tubos)
- Pesquisa de parasitas no sangue
- Vitamina C (2 tubos)
- Vitamina B1 Eb2
- Vitamina B6 (2 tubos)
- Magnésio eritrocitário
- ACTH (2 tubos)

Fluoreto de sódio



- O' Sullivan
- Glicose 2h
- P.T.G.O

Heparina Lítio



- Pró-BNP

Heparina Sódio



- Alumínio

Bioquímica



- Glicose
- Creatinina
- Ureia
- Bilirrubinas
- Gama GT
- Ionogramas
- LDH
- Transaminases (GOT/AST,GPT/ALT)
- Eletroforese
- Cálcio
- CK
- Magnésio
- Serologia (TPHA,VDRL....)
- Ferro Sérico
- Fósforo
- Homocisteína
- RA teste
- Waller-Rose
- Proteína C reativa
- Hormonas
- Marcadores tumorais
- Marcadores víricos
- Hidantoína (Fenitoína)
- Carbamazepina
- Fenobarbital
- Ácido Valproico
- Digoxina
- Zinco
- Cobre
- Lítio – 12h sem tomar medicação

Citrato de sódio



- Tempo de Protrombina
- Taxa Protrombina
- I.N.R.
- Tempo Cefalino-Caulino
- Tempo Trombina
- Fibrinogénio
- Anti-trombina III
- Tromboteste
- Proteína S da coagulação
- Proteína C da coagulação
- D-Dimeros

10.Referências bibliográficas

1. Manual do colaborador Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.
2. Manual de colheitas Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.
3. Instrução de trabalho Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa - Critérios de rejeição de amostras biológicas.
4. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical chemistry. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008. .
5. Oliveira C. e Mendes M. Gestão da fase Analítica do Laboratório - como assegurar a qualidade na prática. Controlab, 2010.
6. Manual de utilizador Dimension EXL.
7. MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011.
8. Bulas dos parâmetros realizados no equipamento Dimension EXL.
9. ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador, Revisão A, Bayer HealthCare, 2006. .
10. Bulas dos parâmetros realizados no equipamento Advia Centaur Xp.
11. Bulas dos parâmetros realizados no equipamento LIAISON XL.
12. Manual de equipamento VIDAS.
13. Manual do equipamento Aution Max-4280.
14. Sysmex XE Series [Acedido a: 25 de Junho de 2018] Disponível na Internet:[https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx.43\(3\):203-22](https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx.43(3):203-22).
15. Sysmex Europe. [Acedido a: 25 de Junho de 2018] Disponível na Internet: [https://www.sysmex-europe.com/.43\(3\):203-22](https://www.sysmex-europe.com/.43(3):203-22).
16. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 063/2011 de 30/12/2011 – Prescrição e determinação do hemograma. Direção-Geral da Saúde 2013. [Acedido a: 13 de Julho de 2018] Disponível na Internet: [https://www.dgs.pt/normas-clinicas/normas-clinicas.aspx.43\(3\):203-22](https://www.dgs.pt/normas-clinicas/normas-clinicas.aspx.43(3):203-22).
17. Manual do operador Ves-Matic 30/30 Plus.
18. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº 033/2011 - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. Lisboa: DGS, 2011. [Acedido a: 10 de abril de 2018] Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/>.
19. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº 002/2011 - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, Lisboa: DGS, 2011. [Acedido a: 10 de abril de 2018] Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/>.
20. Manual do operador Sysmex CA-500 series.
21. Bula Syphilis RPR Test.
22. Bula Syphilis TPHA liquid Hemagglutination Test.
23. Bula IM Test.
24. Bula Brucelloslide Test.
25. Bula AVITEX ROSE WAALER.
26. Bula MICROPATH Antigens/ Febril Antigen Kit.
27. Bulas meios de cultura bioMerieux.
28. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infeção. 2004.

29. Procedimentos operativos de Microbiologia Clínica do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.
30. Helena Barroso AM-S, Nuno Taveira. Microbiologia Médica, Volume 1. Edições Lidel. 2014.
31. Bula FOBplus – bioNexia.
32. Bula Kit IBERKIT Easy-Copros.
33. Bula Techlab C.Diff check complete.
34. the Healthcare Infection Control Practices Advisory C, Masur H, O'Grady NP, Raad II, Randolph AG, Rupp ME, et al. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(9):e162-e93.
35. Ministério da Saúde. Diário da República. Despacho nº 242/96, publicado a 13 de agosto. [Acedido a: 3 de Maio de 2018].