

MESTRADO
ANÁLISES CLÍNICAS

Blood biomarkers for stroke prognosis: mortality, recurrence and functional dependency

Biomarcadores sanguíneos para o prognóstico de AVC: mortalidade, recorrência e dependência funcional

Raquel Sofia Inácio Pinto

M
2024





Blood biomarkers for stroke prognosis: mortality, recurrence and functional dependency

RAQUEL SOFIA INÁCIO PINTO

Monography of the 2nd cycle of studies leading to the Master's Degree in Clinical
Analysis

Work carried out under the supervision of Professor Georgina Correia da Silva

September 2024

ACCORDING TO LEGISLATION, THE REPRODUCTION OF ANY PART OF THIS
MONOGRAPHY IS NOT AUTHORIZED

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO
DE QUALQUER PARTE DESTA MONOGRAFIA

ABSTRACT

Stroke is a leading cause of death and serious long-term disability worldwide. A comprehensive understanding of the molecular mechanisms driving stroke pathophysiology is essential for the development of effective and specific diagnostic and prognostic tools. Key mechanisms include energy failure, ion homeostasis imbalance, intracellular calcium overload, neuronal excitotoxicity, free radical-mediated lipid oxidation inflammatory cell infiltration, and glial cell activation. These processes contribute to neuronal death via apoptosis or necrosis, resulting in neurological deficits. This monography reviews blood-based biochemical markers for stroke prognosis, which have been extensively studied in clinical trials over the years, and categorizes them into markers of metabolic change, vascular and cardiac injury, inflammation, and neuronal damage. It also discusses how these biomarkers are linked to stroke outcomes such as mortality, recurrence, and functional dependence, among others and their potential application in the clinical practice to decrease stroke burden.

Key words: stroke, prognosis, pathophysiology, blood biochemical markers.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade a longo prazo. Compreender os mecanismos moleculares que impulsionam a patofisiologia do AVC é essencial para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e de prognóstico eficazes e específicas. Os principais mecanismos incluem depleção de energia, desequilíbrio da homeostase iônica, sobrecarga de cálcio intracelular, excitotoxicidade neuronal, oxidação de lípidos mediada por radicais livres, infiltração de células inflamatórias e ativação de células da glia. Estes processos, em última instância, contribuem para a morte neuronal por apoptose ou necrose, resultando em déficits neurológicos. Esta monografia revisa vários marcadores bioquímicos sanguíneos para o prognóstico de AVC, amplamente estudados em ensaios clínicos, e categoriza-os em marcadores de alterações metabólicas, dano vascular ou cardíaco, inflamação e dano neuronal. Para além disso, é discutido como esses biomarcadores estão associados ao prognóstico de AVC, nomeadamente considerando a mortalidade, a recorrência e a dependência funcional, bem como a sua potencial aplicação na prática clínica para reduzir o impacto do AVC

Palavras-chave: AVC, prognóstico, patofisiologia, marcadores bioquímicos sanguíneos.

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT	iii
RESUMO	iv
TABLE OF CONTENTS	v
FIGURE INDEX.....	vii
TABLE INDEX	viii
ABBREVIATIONS.....	ix
1. INTRODUCTION.....	1
2. STROKE PATHOPHYSIOLOGY	4
3. BLOOD BIOMARKERS FOR STROKE	9
3.1. METABOLISM-RELATED MARKERS	12
3.1.1. Albumin.....	12
3.1.2. Cortisol.....	13
3.1.3. Calcium.....	14
3.1.4. Vitamin D	15
3.1.5. Glucose.....	16
3.1.6. Lipid profile.....	17
3.1.7. Triglyceride-Glucose index	19
3.1.8. Lipoprotein(a).....	20
3.1.9. Homocysteine	21
3.1.10. Vitamin B and folic acid	2
3.2. KIDNEY FUNCTION-MARKERS	22
3.2.1. Uric acid.....	23
3.3. LIVER FUNCTION-MARKERS	24
3.3.1. Bilirubin	26
3.4. VASCULAR AND CARDIAC-INJURY MARKERS.....	27

3.4.1. Troponin	27
3.4.2. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-brain natriuretic peptide	28
3.4.3. D-Dimer	29
3.5. INFLAMMATION-RELATED MARKERS	30
3.5.1. C-reactive protein	30
3.5.2. Interleukin-6	32
3.5.3. Ferritin.....	33
3.6. NEURONAL-INJURY MARKERS	34
3.6.1. Neuron-specific enolase	34
3.6.2. S100 calcium-binding protein B.....	35
3.6.3. Brain-derived neurotrophic factor	36
4. CONCLUSION	37
REFERENCES.....	39

FIGURE INDEX

Figure 1 - Pathophysiology of ischemic and hemorrhagic stroke	4
Figure 2 – Metabolic alterations and their consequences in ischemic stroke	6
Figure 3 – Lipid metabolism dysfunction in stroke pathophysiology	7
Figure 4 – Inflammatory cascade in stroke pathophysiology	8

TABLE INDEX

Table 1 - Summary of blood biomarker candidates for the evaluation of post-stroke clinical outcomes	7
--	----------

ABBREVIATIONS

25(OH)D - 25-hydroxy vitamin D	NIHSS - National Institutes of Health Stroke Scale
ACTH – Adrenocorticotrophic hormone	NO – Nitric oxide
ADL - Activities of Daily Living	NSE - Neuron-specific enolase
ALIAS - Albumin In Acute Ischemic Stroke	NT-pro-BNP - Inactive N-terminal fragment of BNP
ALP - Alkaline phosphatase	oxLDL - Oxidized low-density lipoprotein
ALT - Alanine aminotransferase	PSA - Post-stroke anxiety
AST - Aspartate aminotransferase	PSD - Post-stroke depression
BBB - Blood-brain barrier	ROS – Reactive oxygen species
BDNF - Brain-derived neurotrophic factor	SAH – Subarachnoid hemorrhage
BI - Barthel Index	sdLDL-c - Small-dense LDL-c
BNP - B-type natriuretic peptide	SSGM - Gadjah Mada Stroke Scale
CRP - C-reactive protein	TG - Triglycerides
CT - Computer tomography	TIA's - Transient ischemic attacks
DALYS – Disability-Adjusted Life Years	TOAST - Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
DAMPs – Damage-associated molecular patterns	tPA – Tissue plasminogen activator
DM- Diabetes mellitus	TyG - Triglyceride glucose index
FDA – Food and Drug Administration	
GFR - Glomerular filtration rate	
GGT - Gamma glutamyl transferase	
Hcy - Homocysteine	
HDL-c - High-density lipoprotein cholesterol	
HPA - Hypothalamic–pituitary–adrenal	
HS - Hemorrhagic stroke	
HT - Hemorrhagic transformation	
IADL - Instrumental Activities of Daily Living	
ICH – Intracerebral hemorrhage	
IS - Ischemic stroke	
IVT - Intravenous thrombolysis	
LDL-c - Low-density lipoprotein cholesterol	
Lp(a) - Lipoprotein(a)	
MMSE - Mini Mental State Examination	
MoCA - Montreal Cognitive Assessment	
MRI - Magnetic resonance imaging	
mRS - Modified Rankin Scale	

1. INTRODUCTION

Stroke is the leading cause of disability worldwide, the second most common cause of dementia, and the third leading cause of death^{1,2}. In 2019, the global prevalence of stroke reached 80.1 million cases, accounting for 5.5 million deaths³. In Portugal, the prevalence of stroke from 1990 to 2017 was 76.3 thousand⁴, with 14.1 thousand deaths in 2019¹ - the highest mortality rate due to stroke in Western Europe. Given these statistics, there is an urgent need for earlier diagnosis, better control of risk factors, and improve outcomes.

Stroke occurs when blood supply to the brain is interrupted, either due to a burst blood vessel (hemorrhagic stroke) or a blockage caused by a clot (ischemic stroke). This disruption deprives brain tissue of oxygen and nutrients, leading to damage. The severity and consequences depend on which part of the brain is affected, the extent of the injury, and the susceptibility of the cell population⁵.

Hemorrhagic stroke (HS) accounts for only 10-15% of all strokes. Despite its lower incidence, it is the most dangerous, with a 1-month mortality rate of 40% and less than 20% of patients regaining functional independence. The leading causes of bleeding include hypertension, the use of anticoagulants and thrombolytic agents, cerebral aneurysms and head injury. HS can be categorized into two main types: intracerebral hemorrhage (ICH) and subarachnoid hemorrhage (SAH). The latter, involves blood accumulation between the brain and the surrounding membrane (subarachnoid space), while the former is a sudden bleeding into the brain parenchyma. ICH is one of the most lethal stroke subtypes, associated with high morbidity and mortality. The volume of hematoma, its expansion, and perihematoma edema are predictors of poor outcomes following ICH, as they lead to secondary brain damage. Currently, the therapeutic strategies for this condition focus on preventing hematoma growth and perihematoma edema, though more effective treatments are still needed⁶.

Ischemic stroke (IS), by contrast, accounts for more than 80% of all stroke events¹. Most strokes of ischemic origin are caused by embolisms and by atherosclerosis. It can be classified into several subtypes, depending on the criteria, with the main ones being large vessel disease, cardioembolic stroke, and small vessel disease or stroke of unknown cause, according to the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification⁷. Currently, intravenous thrombolysis (IVT) and mechanical thrombectomy are the approved therapies for IS⁸⁻¹⁰. These therapies enable reperfusion of the affected area, potentially salvaging the “ischemic penumbra” that is the area surrounding the ischemic event. However, these treatments must be administered within 4-5 hours of stroke onset, and they carry the risk of complications such as symptomatic hemorrhagic transformation (HT), a potentially fatal problem that limits their clinical application¹¹.

Transient ischemic attacks (TIAs) account for 11% of all ischemic stroke presentations. TIAs are defined by transient symptoms of focal ischemia (lasting less than 24 hours) without evidence of infarction on imaging. Up to 20% of patients with IS have had a prior TIA, making TIAs strong predictors of cerebral infarction. Timely management of TIAs has been shown to reduce risk of recurrent stroke by up to 80%¹².

The diagnosis and determination of stroke etiology are typically achieved through neuroimaging techniques like brain computer tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI). However, these methods have limitations: CT is commonly available but not very sensitive and often fails to detect early ischemic lesions, while MRI, though more sensitive, cannot be performed on patients with pacemakers or any metal implants or fragments in the body or in those who are anxious¹³. Moreover, MRI is less accessible, more time-consuming, and more expensive⁷.

Following a stroke diagnosis, the next critical steps involve predicting prognosis, selecting treatment strategies, planning discharge, and developing a relapse prevention strategy⁷. Patient characteristics such as age and comorbidities, stroke type, severity and location, clinical findings and related complications can influence the prognosis. Whether reperfusion therapies (fibrinolysis and/or thrombectomy) are conducted and the quality of care, including early start of physical rehabilitation also influence the outcomes. These, particularly dependency, are still assessed using qualitative scales, including the modified Rankin Scale (mRS), Barthel Index (BI), National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), Activities of Daily Living (ADL), Instrumental Activities of Daily Living (IADL), and the Gadjah Mada Stroke Scale (SSGM). These tools, which primarily assess functional activities related to awareness, wakefulness, and muscle strength, are widely used during hospitalization and follow-up. Additionally, specific tools like the Mini Mental State Examination (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) are applied to assess cognitive outcomes^{7,14}.

Despite advances in stroke prevention and treatment, it remains associated with high risks of early mortality, disability and poor functional outcomes¹². Stroke survivors often suffer from irreversible sequelae that significantly impair their daily activities^{15,16}. The consequences of stroke include neurological deterioration, fatigue, and neuropsychiatric symptoms, such as post-stroke depression (PSD) and anxiety¹².

In-hospital mortality rates for IS have been estimated to be between 11 and 15 %¹⁷. Beyond its lethality, stroke is also the leading cause of disability, with approximately half of stroke survivors disabled months after the event, and around 20% requiring institutionalization. Stroke is the third most common cause of disability worldwide, accounting for 1.6% of disability-adjusted life years (DALYs) for IS and 2.5% for HS¹⁷. However, several post-stroke complications can further worsen the outcome and increase

neurological damage, including brain edema or seizures, systemic infections, and cardiac events. Early detection and treatment or prophylaxis in high-risk patients can potentially improve stroke outcomes¹⁷.

As previously mentioned, a common complication of IS, with or without thrombolysis, is HT which is defined as bleeding within ischemic brain tissue and occurs in approximately 8% to 22% of IS cases. HT is associated with poorer clinical outcomes, including worse cognitive impairment and neurologic deterioration¹⁸. While HT and stroke recurrence contribute to high initial mortality rates, delayed neurologic deterioration due to stroke complications remains a significant contributor to patient disability¹⁹.

Mental disorders, such as anxiety and depression, are a particularly common and important complication. Studies have shown that approximately a quarter of stroke patients experience post-stroke anxiety (PSA)²⁰ and a third experience PSD²¹. Additionally, post-stroke fatigue affects between 23% to 85% of patients worldwide^{15,16}. Depression and anxiety are linked to poorer functional outcomes, higher disability and mortality rates, reduced quality of life, and increased risk of stroke recurrence¹⁴. Moreover, stroke survivors are at risk for recurrent stroke, which is often more severe and disabling²². The likelihood of recurrence ranges from 5% to 13% within five years^{23,24}, and it is estimated that 25% of all strokes are recurrent²⁵.

The ability to accurately predict short- and long-term outcomes is crucial for patients, caregivers, and healthcare providers. Reliable prognosis can help plan rehabilitation, facilitate recovery, and streamline discharge planning^{12,26}. Outcome prediction models that include demographic and clinical parameters (such as age, gender, blood pressure, cholesterol levels, diabetes, smoking habits, or pre-existing conditions) or image variables (such as infarct size) have been studied for their utility as predictors^{26,27}. Adding new variables to these models could improve risk stratification²⁴. Many clinical studies have proposed the inclusion of novel blood biomarkers to enhance stroke diagnosis, improve outcome predictions, and identify better drug candidates and targeted treatments^{13,28,29}.

Biomarkers are measurable substances that can serve as indicators for diagnosis, treatment response, and outcome prediction. Molecular biomarkers, detectable in blood, urine, saliva or other biological fluids, may represent measurable indicators of a disease's physiological state^{17,26}. Blood stroke biomarkers can be either brain-specific, released from damaged tissue, or systemic indicators, such as those resulting from the inflammatory response at either local or peripheral level^{17,30}. While many proteins serve as markers of brain tissue damage, inflammation and coagulation/thrombosis, their utility may be hindered by a lack of specificity as other pathological processes can also damage the brain. A useful

biomarker in stroke management should be specific, rise within hours of tissue insult, reflect the extent of brain damage and serve as a prognostic indicator.

A rapid diagnosis of stroke remains a challenge. The differential diagnosis between IS and HS is vital since thrombolytic therapy can lead to increased intracranial bleeding and further aggravation of HS. Moreover, there are clinical conditions that imitate the signs and symptoms. It is therefore crucial the discovery of biomarkers that aim to distinguish the stroke type and that discern stroke from its mimics, while also having the potential to be applied to prognosis and monitoring. Unfortunately, blood biomarkers use has been limited due to the disease complexity/heterogeneity and the impact of the blood-brain barrier (BBB) on diffusion of these markers.

While most stroke biomarker studies focus on diagnosis, few concentrate on prognostic prediction beyond mortality³⁰. Therefore, the aim of this monograph is to explore the current literature on existing blood biochemical biomarkers for stroke prognosis and discuss their potential application in clinical settings to improve patient outcomes.

2. STROKE PATHOPHYSIOLOGY

IS and HS result in local hypoxia that triggers a series of immune-inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress pathways. The cascade of events following stroke onset includes membrane ion pump failure, calcium and glutamate-mediated excitotoxicity, increased production of reactive oxygen species (ROS), infiltration of circulating immune cells, activation of microglia and astrocytes, upregulation of proinflammatory cytokines and thrombotic/fibrinolytic molecules and microvascular dysfunction (Figure 1).

In the acute IS, the interruption of cerebral blood flow cuts off oxygen and glucose supply to affected brain areas. Intracerebral events following focal ischemia, trigger excitotoxicity, inflammation, oxidative stress, BBB disruption and eventually cell death. Without oxygen, normal oxidative phosphorylation is inhibited, and ATP production and glucose metabolism are altered. The resulting ATP depletion and failure of aerobic glycolysis leads to irreversible tissue damage and extensive cell necrosis within the infarct core. The surrounding area, the “ischemic penumbra”, experiences a significant drop in blood flow, falling below the functional threshold. Although neurons in this region are functionally impaired, they remain structurally intact. A shift to anaerobic metabolism allows these cells to survive longer despite their functional impairment. However, if the blood flow is not restored promptly, neuronal apoptosis is triggered, enlarging the lesion⁷.

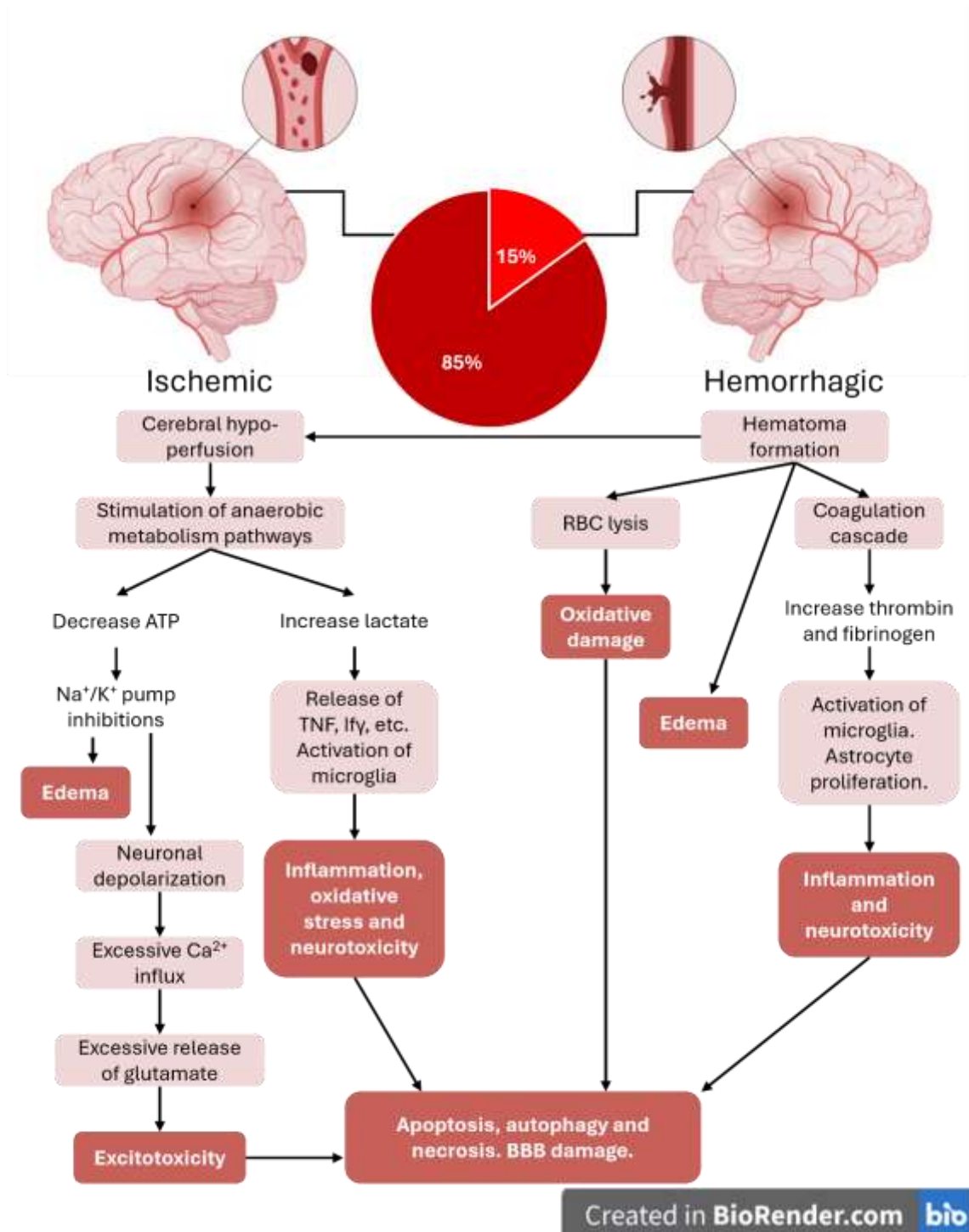


Figure 1 – Pathophysiology of ischemic and hemorrhagic stroke. Both ischemic stroke (IS) and hemorrhagic stroke (HS) involve cerebral hypoperfusion, leading to oxygen deprivation, which shifts metabolism to anaerobic pathways and results in lactic acidosis. This triggers astrocyte proliferation, increases inflammatory cytokines, and activates microglia, promoting neuroinflammation. Additionally, ATP depletion leads to malfunction of various ionic pumps, causing neuronal depolarization, excitotoxicity, and edema, eventually culminating in cellular apoptosis and necrosis. In HS, red blood cell (RBC) lysis exacerbates oxidative damage, while the activation of the coagulation cascade increases thrombin and fibrinogen in the brain, further stimulating astrocyte proliferation and microglia activation, thus perpetuating neuroinflammation and cell death.

The early phase of stroke is marked by both metabolic and systemic inflammatory responses¹⁴. The restriction of glucose and oxygen impairs energy-dependent neuronal processes (Figure 2). ATP depletion disrupts ion channels, leading to loss of membrane potential and cell depolarization. This initiates the glutamate excitotoxicity, where excessive extracellular glutamate causes overactivation of cells and an extreme influx of calcium ions into neurons. The high intracellular calcium concentration activates a wide arrange of calcium-dependent proteolytic enzymes, which degrade cytoskeletal and extracellular matrix proteins, generating superoxide, nitric oxide (NO), and arachidonic acid metabolites. These free radicals increase oxidative stress, causing lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, and apoptosis, thereby exacerbating cellular damage. The BBB becomes vulnerable and permissive to the passage of molecules arising from cell death, which are thus released into systemic circulation^{31,32}.

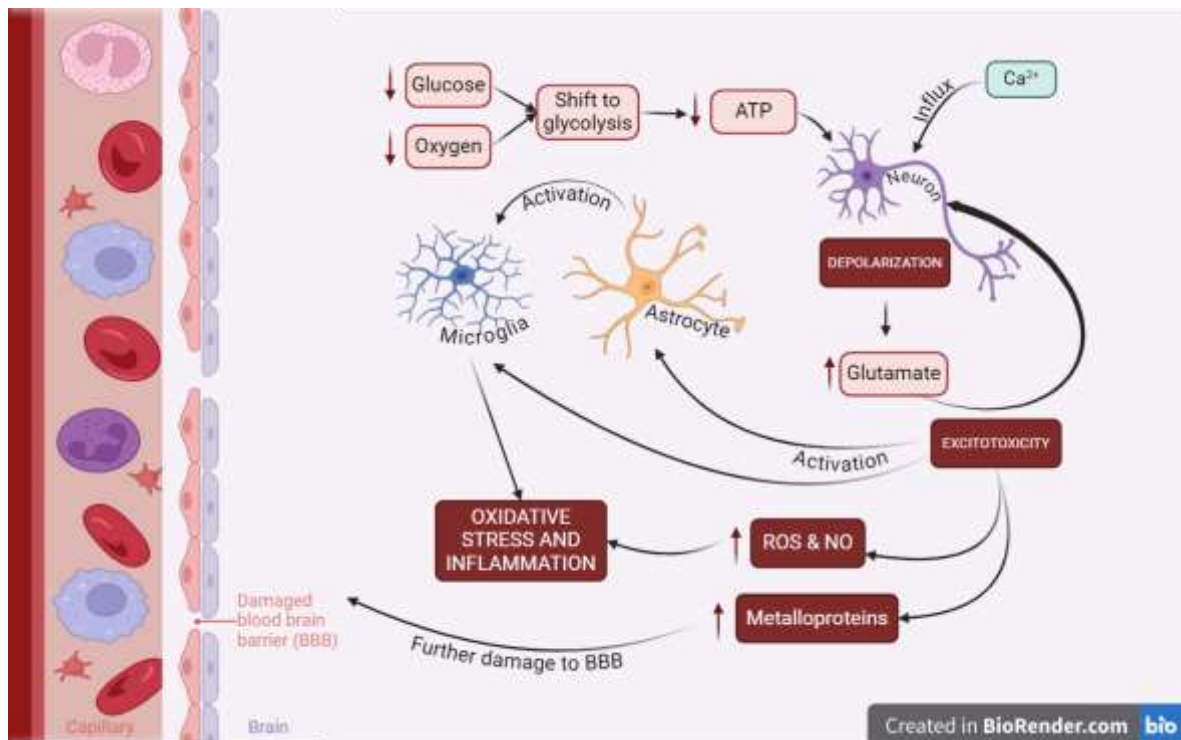


Figure 2 - Metabolic alterations and their consequences in ischemic stroke. Briefly, the obstruction of cerebral blood flow during ischemia results in a marked decrease in glucose and oxygen availability to brain cells, disrupting normal metabolic processes and forcing the cells to switch to anaerobic glycolysis. This shift leads to rapid ATP depletion, severely compromising ion pumps, leading to neuronal depolarization, excessive glutamate release and harmful calcium influx. Activated glial cells, oxidative stress and pro-inflammatory cytokines contribute to further neuronal damage and blood brain barrier disruption.

Emerging evidence indicates that dysregulated lipid metabolism plays a crucial role in stroke pathogenesis and progression. Under normal conditions, lipids are essential for maintaining the structural integrity of neuronal membranes, influencing membrane fluidity,

permeability, and the functionality of receptor proteins. However, in pathophysiological states like ischemia, the excess of free radicals and oxidative stress accelerates lipid peroxidation, which further damages cellular membranes and organelles (Figure 3)³³.

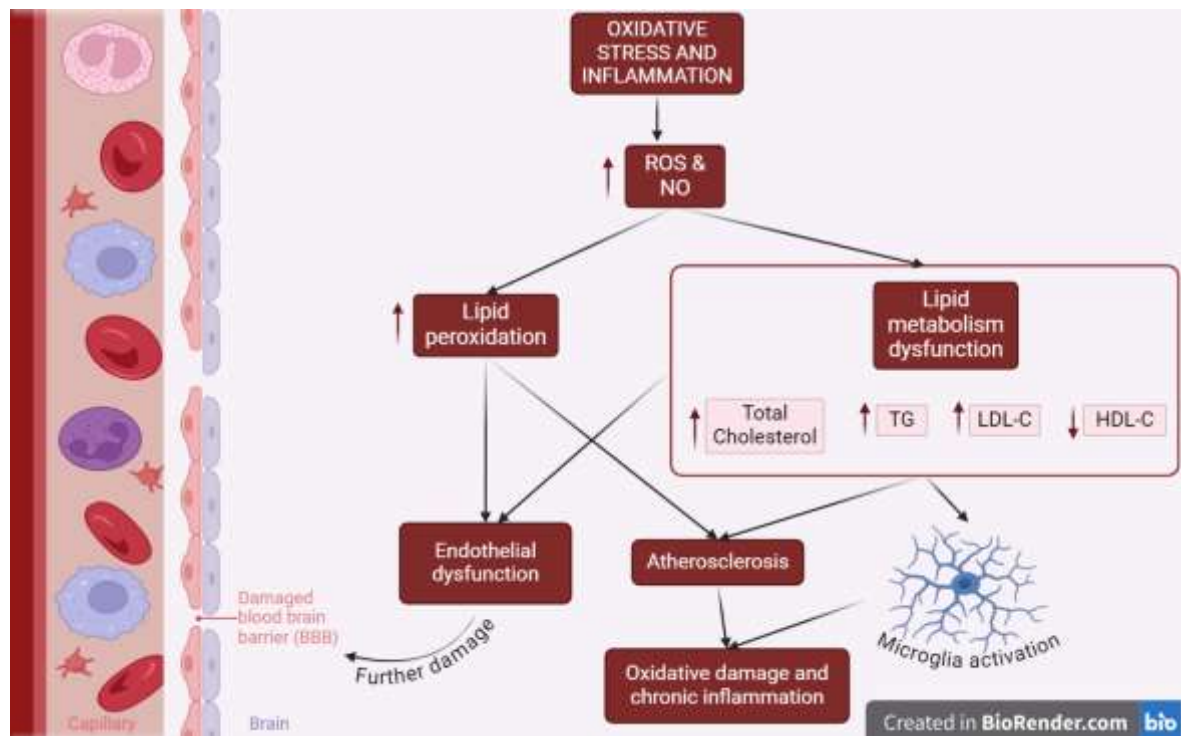


Figure 3 – Lipid metabolism dysfunction in stroke pathophysiology. Oxidative stress and inflammation lead to increased reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production, causing lipid peroxidation and disrupting lipid metabolism. This dysfunction results in elevated total cholesterol, triglycerides (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), with reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). The cascade contributes to endothelial dysfunction and chronic inflammation, ultimately exacerbating blood-brain barrier (BBB) damage and activating microglia, furthering brain injury.

The subsequent phase of the response is characterized by inflammation in the ischemic brain tissue, beginning within hours of stroke onset (Figure 4). Dying cells in both the ischemic core and penumbra release damage-associated molecular patterns (DAMPs), activating local microglia and recruiting peripheral leukocytes. This leads to a substantial release of proinflammatory cytokines. Brain-derived DAMPs enter the circulation and activate systemic immunity, mobilizing innate immune cells from lymphoid organs and the gut³⁴. Increased BBB permeability further facilitates leukocyte infiltration into the brain^{17,35}. While the primary role of resident and infiltrating immune cells is to clear debris from the infarcted area, prolonged inflammation can have harmful effects³⁶. Neutrophils produce excessive cytokines such as interleukin-6 (IL-6), as well as free radicals like ROS and NO, metalloproteases, which can worsen brain injury and contribute to secondary complications such as edema or HT due to further BBB disruption¹⁷.

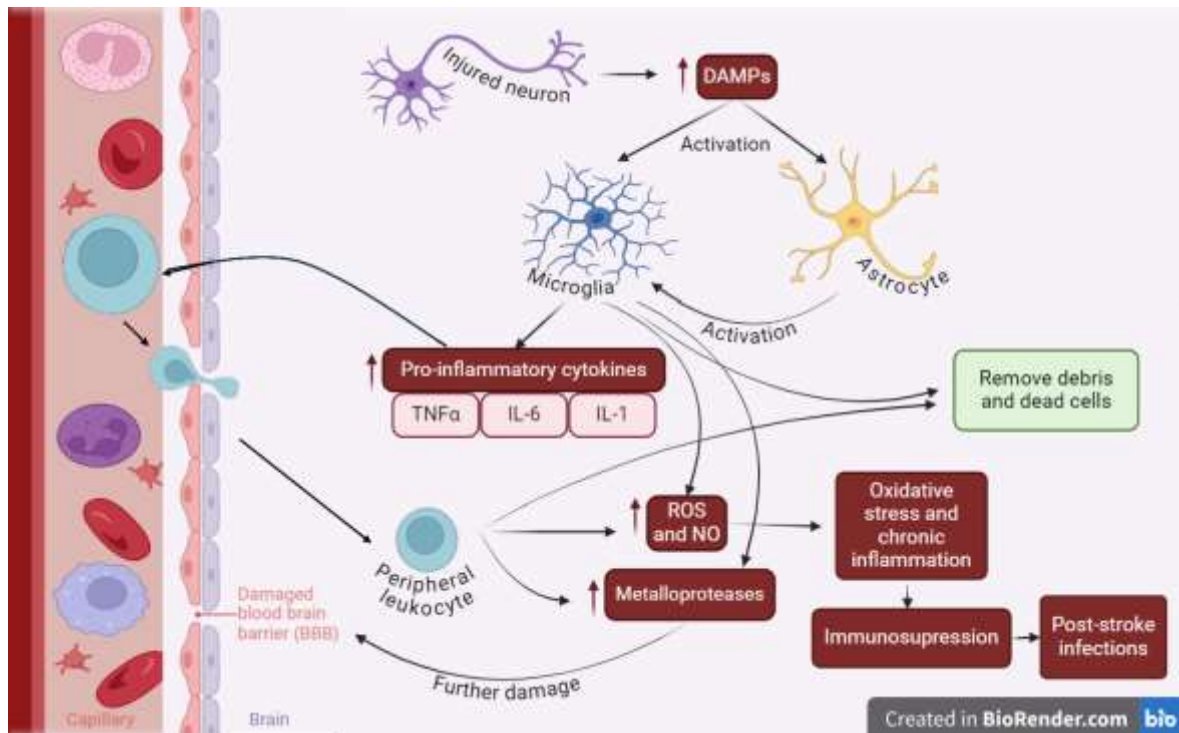


Figure 4 – Inflammatory cascade in stroke pathophysiology. Neuronal injury leads to the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), activating microglia and astrocytes. This triggers the release of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6 and IL-1) and recruits peripheral leukocytes across the damaged blood-brain barrier (BBB). The inflammatory cells release reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), increasing metalloproteinase activity and causing further BBB damage and inflammation. This cycle can support debris clearance and recovery or lead to immunosuppression and post-stroke infections and sequelae.

The consequences of stroke affect several other organs besides the central nervous system and induce several alterations in the periphery mediated by the autonomic nervous system, the hypothalamic-pituitary (HTA) axis and the immune system³⁴. The release of norepinephrine, acetylcholine, and glucocorticoids from the activation of the autonomic nervous system and the HTA axis causes changes in the peripheral inflammatory state, which can cause both immunodepression – which increases the susceptibility to post-stroke infections like pneumonia - and increased peripheral inflammation - which in turn may cause harmful autoimmune responses³⁴. Finally, long-term systemic inflammation is associated with significant sequelae, such as post-stroke dementia and depression – conditions which are linked with elevated levels of CRP, TNF α and IL-6 in the blood³⁴.

There is a well-established link between the severity of inflammation, the extent of ischemia, and the degree of neurological deficit^{37,38}. Therefore, inflammatory markers may be correlated with stroke outcomes, highlighting their potential utility for stroke prognosis and treatment optimization¹⁷. The complex interplay of glucotoxicity, lipotoxicity, and inflammation could contribute to a detrimental physio-pathological vicious cycle.

The pathophysiology of HS is less understood, but it is believed that early brain injury involves inflammation, BBB disruption, and increased intracranial pressure, leading to global ischemic injury and activating similar cell damage mechanisms as those in IS, contributing to neurologic decline^{19,39}. The expanding hematoma exerts a space-occupying effect, obstructing surrounding small blood vessels and causing ischemic damage. Secondly, the direct toxicity induced by hematoma components and metabolic products, and the inflammation reaction exacerbate the neurologic deficits. Hemolysis leads to release of hemoglobin, causing oxidative stress and aggravating edema and neurologic damage. After the hematoma has formed, the coagulation cascade is activated to stop the bleeding. However, thrombin and fibrinogen also activate microglia, induce astrocyte proliferation and disrupt the BBB, which can further contribute to brain damage^{40,41}.

3. BLOOD BIOMARKERS FOR STROKE

Several cell populations and bioactive substances are intricately linked to different phases of the disease process following stroke. Based on stroke pathophysiology, blood biomarkers can be associated with the disease burden and clinical outcomes through various mechanisms, including astrocyte activation, excitotoxicity, endothelial dysfunction, neuroplasticity or neurotrophic mechanisms, inflammation, fibrinolysis, metabolic changes, and oxidative stress. Many molecules routinely screened in the clinical chemistry laboratories have been correlated with key stroke outcome parameters, such as patient dependency, neurological deficits, mortality, recurrence, and stroke volume, as summarized in **Table 1**.

Table 1 - Summary of blood biomarker candidates for the evaluation of post-stroke clinical outcomes.

Blood Biomarker	Patient dependency and neurologic deficit	Mortality	Stroke recurrence	Larger lesion volume	Hemorrhagic transformation	Stroke-associated infections	Post-stroke depression or anxiety
↓ Albumin	● [42-49,52] ● [45,168]	● [42,44-47,49] ● [46]	● [48,50] ● [48]				
↑ Cortisol	● [54,55,58] ● [54,58]	● [54,55,58] ● [54,55,58]		● [56]			
↓ Calcium	● [31,59-61] ● [39,59]	● [31,61] ● [39,59]		● [31] ● [39,59]	● [64]	● [65]	
↓ Vitamin D	● [29,66-72]	● [29,66-72]	● [29,67,71,74]	● [29,66-69]		● [5]	● [20]
↑ Glucose	● [83-89] ● [88]	● [82-86,90,91] ● [88]		● [85]	● [91,92]	● [83]	
↑ Total cholesterol	● [100-102]	● [102]		● [100-102]	● [100]		
↑ LDL-c	● [105]	● [105]					
↑ sdLDL-c	● [107]						
↑ oxLDL-c	● [108]	● [108]					
↑ LDL-c/HDL-c ratio	● [111]						● [112]
↑ LDL-c/TG ratio	● [107]	● [107]	● [107]				
↓ Total cholesterol/HDL-c ratio	● [27,28,112]	● [27,28,112]					
↓ TG/HDL-c ratio	● [28,112]	● [28,112]			● [113,114]		
↑ TyG	● [119-121,123]	● [110,117,120,122,123]	● [22,104,123]				
↑ Lp(a)	● [37,1124,125]	● [37]	● [124,125]	● [17,124]			
↑ Homocystein	● [128,133,134] ● [134]	● [128,135] ● [135]	● [136]		● [11]		● [16,137,138] ● [137]
↓ Vitamin B12 and folic acid	● [133,139-141] ● [139]	● [133,139-141] ● [139]	● [133,139-141] ● [139]				
↓ GFR	● [143,145] ● [145]	● [143,145] ● [145]					
↑ Urinary albumin/creatinine ratio	● [142-144] ● [142-144]	● [142-144] ● [142-144]					

Table 1 (Continued) - Summary of blood biomarker candidates for the evaluation of post-stroke clinical outcomes.

Blood Biomarker	Patient dependency and neurologic deficit	Mortality	Stroke recurrence	Larger lesion volume	Hemorrhagic transformation	Stroke-associated infections	Post-stroke depression or anxiety
↑ Serum creatinine	● [143,145] ● [143,145]	● [143,145] ● [143,145]					
↑ Cystatin C	● [144] ● [144]	● [144] ● [144]					
↑ Albuminuria	● [142] ● [142]	● [142] ● [142]					
↓ Uric acid	● [22,146,148-151]	● [87,129-131]	● [23]	● [22]			● [15,150]
↑ AST	● [161] ● [163]	● [163]					
↑ ALP	● [163]	● [163]					
↑ AST/ALT	● [157,162]	● [157,162]			● [8]		
↑ AST/ALP	● [157,162]	● [157,162]					
↑ GGT		● [158,160] ● [158,160]	● [158,159]				
↑ Bilirubin	● [164-167] ● [168]			● [164-166]			
↑ Troponin	● [172,175,176]	● [170-172,174-178]					
↑ BNP	● [27,180-185]	● [27,180-185]		● [27,180-185]			
↑ D-dimer	● [188,189,192,193] ● [190]	● [190] ● [190]		● [36,191] ● [190]	● [192]		
↑ C-reactive protein	● [7,38,137,195-201]	● [177,197,200,201]	● [195]	● [195,196]	● [198]		● [137,138]
↑ Interleukin-6	● [7,38,197,204-206]	● [206]	● [204]	● [205]			
↑ Ferritin	● [35,27,208,209] ● [207-211]			● [37] ● [207-210]	● [208]		
↑ Neuron-specific enolase	● [13,38,165,212,215,216] ● [13,212]			● [165,213,215] ● [212]	● [214]		
↑ S100 calcium binding protein B	● [19,32,38,218]	● [219]		● [19,197]	● [217]		
↓ Brain-derived neurotrophic factor	● [222-224]			● [222]			● [219]

● IS ● HS

3.1. METABOLISM-RELATED MARKERS

3.1.1. Albumin

Albumin is a multifunction plasma protein synthesized primarily in the liver⁴². It plays a crucial role in the maintenance of the osmotic pressure of plasma, transportation of molecules like hormones, cholesterol, calcium, iron, bilirubin, free fatty acids; antioxidant and anti-inflammatory activities, and vascular permeability regulation with a key role in preventing fluid leakage from the vasculature into tissues^{42,43}.

Serum albumin levels have been linked to stroke outcomes. Lower serum albumin has paradoxically been associated with both better outcomes⁴⁴ and lower mortality^{44,45} in IS patients in some studies. It has also been described as a predictor of lower mortality after HS⁴⁶. However, the great majority of the reports indicated that hypoalbuminemia at admission is associated with poorer outcomes, increased mortality, and a higher risk of stroke recurrence in both IS and HS patients^{14,44,47–50}. Specifically, patients with hypoalbuminemia have been reported to have a threefold increased risk of recurrence within one year after IS⁴². Additionally, for every 10 g/L decrease in serum albumin levels, the risk of poor functional outcome and mortality increases by 17% and 86%, respectively⁴⁹.

Some studies suggest that although serum albumin levels fluctuate during the first days after acute stroke, these changes may not be clinically significant and could be attributed to malnutrition^{14,49}. Indeed, stroke patients have been shown to have significantly lower serum albumin levels compared to healthy controls, with the lowest levels observed at admission, followed by slight increases at day 7, and at 3- and 6-months post-stroke³⁷. However, since malnutrition itself confounds stroke mortality, it is important to measure other nutritional markers in addition to albumin to accurately interpret these findings^{37,47,51}. Unfortunately, most studies only assess the Body Mass Index which is insufficient to fully account for the nutritional status of patients. Patients with lower albumin levels are likely to have poor nutritional and immune status, which may negatively impact outcomes and mortality, suggesting a potential bias in these associations⁴⁶.

In experimental animal models of IS, bolus injections of albumin have been shown to have neuroprotective effects by significantly improving neurologic function, protecting BBB integrity, and reducing neuronal apoptosis and oxidative stress⁴⁴. This finding prompted the initiation of the ALIAS [Albumin In Acute Ischemic Stroke] trial in humans. However, the trial was prematurely terminated after interim analysis revealed no significant difference between the albumin and control groups^{46,52,53}.

Reduced albumin is a marker of malnutrition and chronic systemic inflammation, as it is a negative acute-phase protein^{37,42,51}. Conversely, elevated albumin levels appear to be neuroprotective, due to the regulation of the hemodynamics of brain circulation and

antioxidant and anti-inflammatory actions. Several mechanisms have been proposed, including hemodilution (albumin reduces hematocrit and influences erythrocyte aggregation), antioxidant properties (as albumin is the primary oxygen radical-trapping molecule), maintenance of endothelial permeability and transport capacity, inhibition of endothelial cell apoptosis, reduction of cerebral edema, and regulation of astrocyte metabolism^{42–44,46,48,50,51}.

Overall, serum albumin levels in stroke patients may serve as a valuable biomarker for predicting initial neurologic severity as well as short- and long-term outcomes after stroke.

3.1.2. Cortisol

The activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis during acute, severe illness typically results in elevated cortisol levels, which have several physiological benefits. These include the mobilization of glucose from the liver and the enhancement of cardiovascular output. Moreover, the severity of the illness correlates with higher cortisol concentrations^{54–56}. Prolonged exposure to elevated cortisol levels is neurotoxic, as evidenced by brain atrophy and cognitive impairments frequently observed in conditions like Cushing’s disease, where sustained high cortisol is caused an adenoma that secretes adrenocorticotrophic hormone. In addition, exposure to cortisol excess in this condition results in increased cardiovascular morbidity and mortality^{54,57}.

In stroke patients, higher serum cortisol levels have been associated with both short- and long-term dependency, as well as with delirium, depression, and increased mortality in cases of both IS and HS^{54,55,58}. Cortisol levels remain high for at least 7 days following stroke and typically return to normal within 3 months⁵⁴. Additionally, higher hair cortisol levels – indicative of long-term cortisol exposure – have been significantly associated with larger lesion volumes and poorer cognitive outcomes following IS⁵⁶. Since hair cortisol concentration reflects integrated cortisol levels over time, elevated hair cortisol likely indicates increased cortisol release in the months leading up to the stroke⁵⁶.

Acute stroke functions as a significant stressor, thereby stimulating the HPA axis, resulting in increased glucocorticoid levels. The elevated cortisol levels observed in patients with poorer functional outcomes or higher mortality reflect a greater degree of physiological stress^{55,58}. Prolonged activation of the HPA axis may also be specific to stroke due to factors such as cytokine release following neuronal injury and damage to the frontal or medial lobes, which can disrupt areas that normally inhibit the HPA axis⁵⁴. The question of whether increased cortisol levels are merely a result of stroke severity or an independent factor contributing to worse outcome remains controversial. Some studies suggest that elevated

cortisol directly exacerbates ischemic damage, particularly in the hippocampus. Additionally, increased cortisol levels are associated with adverse cardiac events (e.g., arrhythmias or myofibrillar degeneration) and reduced resistance to infections in stroke patients, which may contribute to higher mortality rates^{55,57,58}.

Regardless of these complexities, serum cortisol levels appear to be a promising biomarker for predicting both short- and long-term dependency and cognitive status in stroke patients.

3.1.3. Calcium

Calcium is a crucial structural component of bone and plays a vital role in various cellular processes, including coagulation, intracellular signaling, muscle contraction, and nervous system activity³¹. Calcium levels are particularly significant in the molecular pathways involved in ischemic neuronal death and damage, as discussed in the pathophysiology section⁵⁹.

Hypocalcemia at admission has been linked to increased bleeding, larger hematoma volumes, worse prognosis, and higher mortality rates in patients with ICH^{39,59}. Interestingly, low calcium levels have also been associated with reduced risk of hemorrhage expansion. This counterintuitive result may be explained by the role of calcium in the coagulation cascade; lower calcium levels might impair hemostasis, reducing the likelihood of further bleeding⁵⁹.

In IS patients, lower serum calcium levels at admission have been correlated with higher NIHSS and BI scores, larger infarct volumes, and increased mortality^{31,59–63}. Among the different subtypes of IS, the most significant correlation between low calcium levels and prognosis was observed in lacunar and unilateral strokes⁶³. Additionally, a study by Guo et al. (2015) demonstrated that lower admission serum calcium levels were independently associated with HT after intravenous treatment of IS⁶⁴.

Chen et al. (2022) found that serum calcium levels below 2.25 mmol/L were related with an increased incidence of stroke-associated infections, such as pneumonia and urinary tract infection. These infections are among the most common complications following stroke, and their diagnosis can be challenging due to overlapping symptoms with stroke itself⁶⁵.

The variation in serum calcium levels with stroke severity suggests that calcium could serve as a potential laboratory predictor of mortality and outcomes after stroke.

3.1.4. Vitamin D

Vitamin D is primarily known for its role in regulating calcium metabolism, but it also functions as a neurosteroid hormone in the central nervous system, playing a crucial role in neurodevelopment. Vitamin D receptors are widely distributed throughout the brain, where they contribute to neuroprotection, neurotrophic signaling, and the modulation of inflammation. Vitamin D has been associated with IS through several mechanisms, including the regulation of glucose metabolism, downregulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, and improving neurotrophic factors^{20,63}.

Vitamin D deficiency, defined as levels below 20 ng/mL, has been significantly associated with worse outcomes in IS patients. Specifically, lower levels 25-hydroxy vitamin D (25(OH)D) were linked to higher NIHSS scores at admission, greater infarct volume, poorer functional outcomes at 3 months (measured by the mRS), and increased mortality^{29,63,66–72}. This association was most pronounced in patients whose 25(OH)D levels were assessed within 2 weeks of their stroke⁷³. Furthermore, lower serum 25(OH)D levels were associated with an elevated risk of stroke recurrence^{29,67,71,74}, higher incidence of pneumonia and other infections⁵, and increased likelihood of post-stroke depression and anxiety, following IS²⁰.

Vitamin D may exert neuroprotective effects after ischemia through several potential mechanisms, including the inhibition of nitric oxide synthase, anti-inflammatory actions, regulation of neuronal calcium levels, upregulation of neurotrophic signaling pathways, and enhanced nerve conduction^{20,63,69,70}. Additionally, vitamin D may help prevent vascular injury by lowering blood pressure, regulating blood glucose, inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone system, reducing platelet aggregation, and preventing atherogenesis^{63,71,75,76}. It also increases neurotrophic factors, such as nerve growth factor, neurotrophins, and glial cell line-derived neurotrophic factor, further supporting its role in neuroprotection⁷⁶.

The benefits of vitamin D supplementation in stroke patients have been demonstrated in studies. Gupta et al. (2016) found that calcium and vitamin D supplementation improved survival probability and disability outcomes at 6 months post IS, with a 74% reduction in the risk of death in the supplemented group⁶³. Similarly, Koh et al. (2020) observed significant improvements in IS outcomes after 3 months in patients who received vitamin D supplementation⁷¹.

It is important to note that there are significant seasonal variances in 25(OH)D levels⁶³, and many studies did not account for factors such as sun exposure and diet, which could influence vitamin D levels^{68,74}. Therefore, further research is needed to better understand the role of vitamin D as a marker for stroke vulnerability and its potential for supplementation in improving prognosis and outcomes in patients.

3.1.5. Glucose

Diabetes mellitus (DM) is one of the major risk factors for stroke, and hyperglycemia in stroke patients with DM is related with a higher risk of in-hospital death⁷⁷. Evidence from MRI studies showed that admission hyperglycemia was associated with expanded infarction core and reduced penumbra salvage^{78,79}. Thus the control of hyperglycemia in IS patients is part of the treatment strategy recommended by guidelines^{9,80,81}.

Stress-induced cortisol release has been shown to cause persistent hyperglycemia in stroke patients, affecting approximately 40% of individuals⁸². Elevated blood glucose levels at admission are associated with several adverse outcomes, including poorer functional outcome^{83–89}, increased mortality^{82–86,90,91}, larger infarct volumes⁸⁵, and a higher risk of secondary HT in IS patients^{91,92}. Hyperglycemia is also linked to a higher incidence of pneumonia and other infections⁸³, and increased fatigue¹⁶. In cases of ICH, hyperglycemia independently predicted early neurological deterioration and mortality⁸⁸. These associations are particularly significant in patients without pre-diagnosed diabetes, but not in those with diabetes⁸⁸.

Transient hyperglycemia, often induced by stress, may exacerbate brain tissue damage, leading to worse prognosis¹⁶. It has been shown to induce neuronal apoptosis in rat models of stroke and is considered both pro-inflammatory and toxic⁸⁸. Transient stress hyperglycemia appears to increase the production of reactive oxygen and nitrogen species, disrupt the BBB, and enhance cerebral swelling, contributing to complications such as reperfusion injury, edema, and HT^{82–85,88,90}. These findings suggest that managing blood glucose upon admission, could potentially improve outcome for stroke patients without diabetes^{82,92}. However, despite numerous studies, efforts to lower glucose concentrations in acute IS patients have not consistently demonstrated clinical benefits^{83,84}. While moderate glucose reduction in IS patients not treated with mechanical thrombectomy prevents lactic acidosis, it does not necessarily translate into better clinical outcome^{83,84}.

Limitations of research include a lack of longitudinal glucose monitoring, unclear use of glucose-lowering medications, the food consumed over the previous hours and diet during hospitalization, and variability in the type of glucose sample measured (venous vs. capillary) and fasting blood glucose or random on admission^{83,84}. Additionally, many studies have not analyzed subgroups based on diabetes status, which could confound results⁹¹.

Acute stress hyperglycemia is common in patients presenting to the emergency room. It is not only associated with the severity of stroke but also with poor outcomes, especially in patients without DM though, curiously, this may not be observed in patients with a history of diabetes^{93–96}. Indeed, several studies have shown that hyperglycemia has an even stronger predictive value in nondiabetic patients⁸⁸.

The studies considering elevated glucose levels and the association with stroke outcomes show conflicting conclusions probably resulting from several bias as above mentioned. There is no unified definition of stress hyperglycemia, and some studies used fasting glucose or random blood glucose at admission without considering the usual levels before stroke onset. Because hyperglycemia is common among patients with DM, absolute hyperglycemia cannot reflect the changes without consideration of the background glucose level. Therefore, the stress hyperglycemia ratio (method for determining blood glucose stress, that also considers glycated hemoglobin A1c), could have a better prediction of the poor outcome⁹⁷.

There are multiple molecular mechanisms related with stress hyperglycemia that might lead to poor outcomes after stroke. These probably affect nerve repair, impair collateral circulation, increase vascular permeability and platelet cohesion and the production of thrombin-antithrombin complexes to stimulate coagulation. Moreover, elevated blood glucose aggravates inflammation and oxidative stress response and promotes the release of circulating free fatty acids, which also aggravates hyperglycemia. The activation of protein kinase C and NADPH oxidase increases ROS levels and reduces nitric oxide synthase, thereby leading to decreased reperfusion and neuron damage⁹⁸. In addition, high blood glucose is associated with BBB breakdown, brain edema, and increased apoptosis⁹⁹.

Nevertheless, blood glucose remains a promising candidate for straightforward laboratory marker that could aid in predicting stroke prognosis.

3.1.6. Lipid profile

Dyslipidemia, characterized by low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and high levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and triglycerides (TG), is a significant risk factor for both cardiovascular and cerebrovascular diseases²⁸. However, the impact of serum lipid levels on stroke outcomes remains inconsistent^{89,100}.

The serum lipid profile is altered in both IS and HS patients, when compared to non-pathological controls¹⁰⁰. While some studies have found that higher total cholesterol levels are inversely related to stroke infarct volume, mortality, and risk of HT in IS patients^{84,100–102}, others have reported no significant associations^{103,104}. Similarly, LDL-c levels have been linked to long-term mortality and poor outcome after IS¹⁰⁵, though they are not consistently considered an independent prognostic factor^{106,107}. Some authors suggests that while LDL-c might be a reliable prognostic marker, its subclasses could be even more reliable as stroke biomarkers. For instance, Xu et al. (2024) found that small-dense LDL-c (sdLDL-c) was significantly associated with poor functional outcome in IS patients¹⁰⁷. Deng et al. (2017)

also linked high levels of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL-c) to increased risk of death and poor functional outcome within one year of stroke¹⁰⁸. Overall, elevated levels of serum total cholesterol^{84,100,109}, TG^{84,94}, LDL-c^{100,105}, and low serum levels of HDL-c^{100,106} are frequently associated with poor prognosis after IS, but whether these changes are predictive or merely coincidental is still debated.

To address these inconsistencies, researchers have explored the prognostic value of atherogenic ratios, which combine multiple lipid parameters¹¹⁰. The LDL-c/HDL-c ratio has been found to rise in IS patients with poor short-term (3-month) outcomes¹¹¹ and PSD¹¹². Similarly, the LDL-c/TG ratio is associated with stroke recurrence, mortality and poor functional outcome in IS patients¹⁰⁷. Lower total cholesterol/HDL-c ratios have been linked to increased risk of poor outcomes and death^{27,28,112}, while low TG/HDL-c ratios correlate with stroke mortality and adverse outcome after IS^{28,112}. These ratios, being cost-effective and reproducible, could be integrated into routine clinical management if their prognostic value is further confirmed^{27,108}. Additionally, combining multiple lipid parameters may offer a more comprehensive view than assessing individual lipid levels alone¹⁰⁸.

In HS patients, serum total cholesterol and serum TG levels were found to be significantly reduced^{100,109}, whereas low LDL-c levels and TG/HDL-c ratio were associated with increased HT after IS^{113,114}. This might be because adequate lipid levels are crucial for maintaining the integrity of small cerebral vessels, with excessively low lipid levels compromising vessel integrity and leading to blood extravasation^{112,113,115}.

Among IS subtypes, atherothrombotic stroke is more strongly associated with total cholesterol¹⁰², LDL-c, sdLDL-c and oxLDL^{30,104}, and TG, compared to lacunar or embolic stroke¹¹⁶. Hypertriglyceridemia and LDL particle accumulation in the sub endothelium are key contributors to atherosclerosis^{104,107,110}. Elevated LDL-c levels can also increase BBB permeability, leading to inflammation and microglia activation^{107,116}. Conversely, HDL-c may offer neuroprotection through its antioxidant, anti-inflammatory and antithrombotic effects^{106,112}.

The paradoxical relationship between TG levels and stroke outcomes may be due to their role as indicators of nutritional status. Low TG levels might signify nutritional deficiency, which can negatively impact stroke prognosis. Additionally, decreased TG levels may exacerbate inflammatory responses and lipotoxicity, worsening clinical outcomes^{107,108}.

Given their roles in endothelial dysfunction, oxidative stress, and atherosclerosis, lipid parameters such as total cholesterol, LDL-c, HDL-c and TG are crucial in both the pathogenesis and prognosis of stroke¹¹⁶. Statin therapy, particularly with high-potency statins, has shown promise in improving functional outcomes, survival and reducing recurrence in IS by modulating inflammation, enhancing endothelial function, and lowering

lipid levels^{101,107,115}. However, further well-designed clinical trials are needed to confirm these benefits and explore novel treatments¹⁰⁶.

In summary, while various lipid parameters and ratios show promise as markers for stroke risk assessment, further research is necessary to determine if better lipid management can improve clinical prognosis after stroke.

3.1.7. Triglyceride-glucose index

Studies have consistently shown that TG and diabetes are major risk factors for cardiovascular and cerebrovascular diseases¹¹⁷. The triglyceride glucose index (TyG), which is calculated using fasting blood glucose and TG levels ($\text{Ln} [\text{TG (mg/dL)} \times \text{fasting glucose (mg/dL)/2}]$), has been proposed as a reliable marker of insulin resistance^{110,117–121}. The TyG index may offer a more accurate reflection of disease progression than individual measures of glucose or TG alone. This index offers a comprehensive way to assess both lipid metabolism and glucose status, making it particularly useful in evaluating metabolic health¹¹⁷.

The TyG index has been significantly associated with an increased risk of 12-month stroke recurrence^{22,104}, all-cause mortality^{110,117,120,122}, and neurological deterioration^{119–121} during hospitalization in patients with IS. These associations suggest that the TyG index holds considerable short-term prognostic value in IS patients. A meta-analysis by Nayak et al. (2024) further correlated elevated TyG index with IS recurrence, poor outcome and mortality¹²³. However, its utility in predicting prognosis and mortality in HS remains unproven¹¹⁰.

Insulin resistance, is a metabolic alteration where normal insulin levels produce a suboptimal physiological response, is closely linked with obesity and serves as an independent risk factor for mortality and major disability after stroke. This connection is thought to be due to mechanisms such as enhanced local inflammatory and prothrombotic responses, as well as accelerated atherosclerosis^{22,110,117,118,120}. Numerous studies have shown that the TyG index is closely and independently associated with adverse cardiovascular events, including cerebrovascular disease, peripheral arterial disease, and coronary heart failure. Consequently, the TyG index is emerging as a robust marker for various cardiovascular and cerebrovascular conditions, as well as other metabolic-related diseases.^{110,117,121}

Given its potential, the TyG index could become a valuable decision-making tool for clinicians, serving as an independent risk factor in critically ill IS patients. By providing a more comprehensive assessment of metabolic health, the TyG index may improve risk stratification and inform treatment strategies after stroke.

3.1.8. Lipoprotein(a)

Lipoprotein(a) (Lp(a)) is a pro-atherogenic, pro-thrombotic and anti-fibrinolytic molecule that plays a significant role in vascular diseases such as coronary artery disease and stroke^{17,37,124}. Structurally, Lp(a) is composed of apolipoprotein B-100 and apolipoprotein(a), and its similarities to low-density lipoprotein (LDL) and plasminogen contribute to its atherogenic and thrombogenic properties^{17,124}.

Multiple studies have shown that elevated Lp(a) levels are positively correlated with a higher risk of poor outcomes^{37,124,125}, larger infarct volumes^{124,125}, increase mortality³⁷, and a greater likelihood of stroke recurrence^{17,124} following IS. Specifically, serum Lp(a) levels ≥ 300 mg/L have been associated with a 2.87-fold increase in stroke recurrence¹²⁴ and a 3.12-fold increase in the likelihood of unfavorable outcome¹²⁵. Additionally, elevated Lp(a) have been independently associated with large artery atherosclerotic stroke, particularly among younger patients (<60 years)¹⁷.

The precise role of elevated Lp(a) in stroke remains uncertain – whether it is merely a marker for stroke severity or an independent contributor to poor prognosis is still debated¹²⁵. The association of Lp(a) levels at IS onset with C-reactive protein (CRP) levels, stroke size, and severity suggests it could be a marker of initial insult's severity rather than a direct participant in pathological mechanisms. However, there are other plausible pathways through which elevated Lp(a) might influence stroke outcomes. First, Lp(a) contributes to atherosclerosis by promoting plaque formation. Second, due to structural homology between apolipoprotein(a) and plasminogen, Lp(a) may exert a thrombogenic effect by interfering with intrinsic fibrinolysis. Lp(a) concentrations above 30 mg/dL are an independent risk factor for venous thrombosis, potentially acting through two primary mechanisms: (i) promoting atherogenesis via an inflammatory response to oxidized Lp(a) and plaque deposition by foam cells, and (ii) causing hypofibrinolysis by inhibiting plasminogen activation. Additionally, Lp(a)'s role in endothelial dysfunction and its proinflammatory properties may further explain its impact on stroke outcomes^{17,124,125}.

There is evidence to suggest that Lp(a) may act as an acute phase reactant, which could potentially alter its levels during the acute phase of stroke. However, Lp(a) levels increase relatively slowly compared to other acute phase proteins, reaching peak concentrations only after several days¹⁷. This slow increase might help distinguish between acute, stroke-related elevations or chronically altered levels. Despite these findings, Lp(a) appears to be an independent prognostic marker for stroke outcomes¹²⁵. Nonetheless, further controlled studies are needed to confirm Lp(a)'s prognostic value and to determine whether lowering Lp(a) levels could reduce post-stroke risks.

3.1.9. Homocysteine

Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing amino acid^{126–130}, and growing evidence suggest that elevated serum Hcy levels are linked to an increased risk of vascular diseases^{128,131}. Under pathological conditions, Hcy can accumulate in blood vessels, leading to direct or indirect damage to vascular endothelial cells, increased oxidative stress, and vascular inflammation. This can contribute to the development of cerebral small-vessel arteriosclerosis, large-vessel atherosclerosis, and thrombosis, ultimately resulting in infarction^{11,16,126–129,132}.

Hyperhomocysteinemia has been identified as a risk factor for early post-stroke neurological deterioration^{128,133,134}, long-term mortality^{128,135}, poor functional outcomes^{127,136}, stroke recurrence¹³⁶, as well as post-stroke fatigue¹⁶ and depression^{137,138}. In patients with both IS and cerebral hemorrhage, the highest Hcy levels were associated with a 1.76-fold increased risk of stroke recurrence and 1.83-fold increased risk of all-cause mortality. This risk was particularly significant in patients with large-artery atherosclerosis ischemia^{126,130–132}. Additionally, high Hcy levels have been linked to an increased risk of HT within 24-hours following IVT in IS¹¹.

Some studies have noted that the relationship between Hcy levels and stroke prognosis is more pronounced in women than in men^{126,136}. Interestingly, Hcy concentrations are generally higher in men than in women, likely due to differences in estradiol levels and the homocysteine metabolism pathway¹²⁶.

Elevated Hcy levels are indicative of severe neuropathy and an increased volume of hemorrhage, as high plasma Hcy can compromise vascular wall integrity and cerebrovascular permeability. This may result in endothelial dysfunction, damage to the elastic structure, and further injury to the basal layer of cerebral arterioles and micro-vessels^{11,126,129}. Moreover, elevated Hcy levels also promote the oxidation of LDL, with the primary mechanism of Hcy's adverse effects on vascular endothelial function being linked to oxidative stress and the depletion of NO¹²⁹.

It is important to refer that many of these studies did not account for dietary intake B vitamins, which are a major determinant of homocysteine status¹²⁶. Further research across diverse social and cultural contexts is necessary to replicate these findings¹²⁶. Although B vitamin therapy has been shown to lower Hcy levels and reduce the risk of stroke and myocardial infarction in recent trials and meta-analyses¹³², its role in stroke treatment has not been extensively studied. Nevertheless, Hcy levels could prove to be an important marker for stroke prognosis and outcome prediction, especially in cases of large-artery atherosclerosis.

3.1.10. Vitamin B12 and folic acid

Vitamin B12 and folic acid are crucial in the metabolism of Hcy, playing a key role in maintaining its plasma levels balanced¹³⁹. Vitamin B12 and folic acid are essential for the remethylation of Hcy into methionine^{139–141}, a process vital for the methylation of phospholipids, amines, neurotransmitters, DNA, RNA, and myelin basic proteins. Deficiency in vitamin B12 or folic acid can lead to impaired methylation reactions, nuclear damage and increased Hcy levels in circulation^{139,141}.

In patients with IS and HS, low levels of vitamin B12 and folic acid levels have been associated with more severe clinical pictures, including poorer prognosis, higher mortality, and an increased likelihood of stroke recurrence^{133,139–141}. Additionally, literature suggests that insufficient levels of these vitamins after stroke may elevate the risk of post-stroke brain atrophy¹³⁹.

The impact of low vitamin B12 and folic acid levels on stroke prognosis is not only due to their role in increasing Hcy levels but also to their effect on disrupting the BBB^{139,140}. Several studies have demonstrated that daily supplementation with vitamin B and folic acid provides significant protective benefits for individuals with a recent stroke or TIA. These benefits include improved cognitive and motor function, as well as a reduced risk of developing major depression^{129,139,140}. This protective effect is likely due to the reduction of endothelial damage caused by stroke when these vitamins are supplemented¹³⁹.

These findings underscore the importance of screening for vitamin B12 and folic acid levels in the stroke population for effective risk stratification. Furthermore, future research should explore the potential to reduce adverse stroke outcomes in high-risk groups through targeted supplementation aimed at lowering Hcy levels.

3.2. KIDNEY FUNCTION MARKERS

Kidney dysfunction, characterized by a reduced glomerular filtration rate (GFR) and albuminuria, is a well-established risk factor for cardiovascular events, including stroke^{142,143}. Patients with chronic kidney disease (CKD) and end-stage renal failure are particularly vulnerable due to advanced atherosclerosis of the cerebral vasculature, which significantly increases their risk for IS. In fact, several studies have reported a higher prevalence of renal dysfunction among these patients^{143–145}.

The outcomes following acute stroke are influenced not only by the severity of neurological deficits but also by the presence of comorbidities. Renal impairment has emerged as a major predictor of adverse outcomes after acute stroke, with reduced GFR independently linked to unfavorable long-term outcomes such as mortality and functional dependence¹⁴⁵.

Patients with impaired renal function tend to experience worse outcomes following both HS¹⁴⁵ and IS^{143,145}. Specifically, reduced GFR¹⁴³, elevated urinary albumin/creatinine ratio^{142,144}, increased serum creatinine¹⁴³ and cystatin C¹⁴⁴, and albuminuria¹⁴² have all been independently associated with poor short- and long-term outcomes, including higher mortality and greater functional dependence. Notably, Yahalom et al. (2009) found that patients with HS exhibited more severe renal function decline compared to those with IS, with the former having the highest serum creatinine values¹⁴³.

Other markers that progressively increase with declining renal function include proteinuria, fibrinogen, homocystinuria, and elevated uric acid levels¹⁴³. The hemodynamic similarities between the vascular beds of the brain and kidneys have been highlighted in many studies, underscoring the potential link between cerebral infarction and kidney impairment¹⁴².

In light of this association, clinical trials that assess renal function after acute stroke could be crucial for risk stratification and better management of stroke patients.

3.2.1. Uric Acid

Uric acid is the end-product of purine metabolism and has dual biological roles, exhibiting both antioxidant and pro-inflammatory properties^{146,147}. On one hand, uric acid has been associated with protective effects due to its antioxidant capacity, while on the other, it may contribute to inflammation and related pathologies^{15,130}.

In patients with IS, uric acid levels at admission are inversely associated with neurological impairment⁴², poor functional outcomes^{22,146,148–151}, final infarct size²², mortality^{87,129–131}, and the incidence of post-stroke depression²¹. Specifically, it has been estimated that for each 1 mg/dL increase in serum uric acid, there is a 12% increase in the odds of a favorable clinical outcome¹⁴⁸. However, contrasting evidence exists. For instance, Zhu et al. (2022) found that higher uric acid levels were linked to an increased risk of stroke recurrence²³, while Ren et al. (2022)¹⁵ and Wang et al. (2014)¹⁵⁰ associated elevated uric acid with post-stroke fatigue. Moreover, uric acid levels did not correlate with outcomes patients with cerebral hemorrhage¹⁴⁹.

A kinetics study revealed that serum uric acid concentration significantly decreased during the first 7 days after IS, followed by a return to baseline levels after one month¹⁵². This early decline was more pronounced in patients with severer strokes, larger infarct volumes, and unfavorable evolution¹⁵². Additionally, Lee et al. (2014) found that male patients with higher uric acid levels were more likely to achieve excellent functional outcomes, a relationship not observed in female patients¹⁵³. Gender differences in uric acid

concentrations and the predominance of male participants in stroke studies may partly explain these findings¹⁵¹.

The role of uric acid in IS outcomes appears to be complex, with evidence suggesting both protective and harmful effects⁵¹. Hyperuricemia may increase the risk of stroke recurrence and fatigue through mechanisms such as insulin resistance, hypertension, impaired arteriolar autoregulation, and cardiomyocyte apoptosis^{151,152}. Conversely, its neuroprotective effects are thought to stem from its antioxidant and anti-inflammatory properties, which counteract the damaging effects of ROS^{151,152}. However, serum uric acid levels can be influenced by factors such as hydration status, renal function, purine metabolism, dietary intake, and uric acid oxidation, which have not been thoroughly investigated in many studies¹⁵². Given these complexities, further research is needed to clarify the potential role of uric acid as a prognostic biomarker for IS and to better understand its protective and detrimental effects.

3.3. LIVER FUNCTION MARKERS

Stroke not only affects the brain but also has significant implications for peripheral organs through neuroendocrine regulation. The liver is involved in the detoxification and antioxidant status and is a key metabolic organ. Emerging research highlights a bidirectional communication between the brain and liver. Stroke can induce functional and metabolic changes in the liver, elevating liver enzymes, or blood glucose levels, which in turn can either protect or exacerbate brain damage and influence stroke severity and outcome¹⁵⁴. The liver contributes not only to post-stroke immunosuppression but also to stress-induced hyperglycemia, as it plays a regulatory role in glucose homeostasis and lipid metabolism¹⁵⁵. The liver contributes to stress hyperglycemia after IS by increasing hepatic gluconeogenesis and decreasing hepatic insulin sensitivity in response to activation of the autonomic nervous system and the HPA axis. These changes in the glucose metabolism are detrimental to the brain particularly in patients without diabetes, as mentioned before¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT) are key liver enzymes whose levels in blood rise in cases of hepatobiliary damage^{18,157–159} and are commonly used as clinical markers for liver disease and hepatobiliary dysfunction^{18,157–160}.

Elevated serum AST has been associated with poor functional outcome at 1-year follow-up after non-cardioembolic IS¹⁶¹. Additionally, a higher De Ritis ratio (AST/ALT) at admission has been linked to poorer 3-month outcomes and mortality following IS^{157,162}. Specifically, a ratio greater than 1.53 at admission was associated with a 1.89-fold increase

in the likelihood of poor outcome¹⁶². It has also been identified as an independent predictor for HT after IS⁸. Similarly, elevated AST/ALP ratios have been correlated with worse outcome and higher mortality after IS^{157,162}. In contrast, the ALT/ALP ratio has not been significantly associated with either mortality or functional impairment¹⁵⁷.

High GGT levels have been correlated with 1-year mortality in both IS and HS^{158,160}. Elevated GGT has also been positively associated with an increased risk of stroke recurrence^{158,159}. Interestingly, GGT levels in embolic strokes were significantly higher compared to atherosclerotic/lacunar strokes¹⁵⁸.

In the context of the HS, elevated AST and ALP have been further associated with poor outcome and mortality at 90-days. Severe liver disease has been reported to exacerbate the prognosis of HS, potentially due to decreased levels of clotting factors and platelets¹⁶³.

The elevation of AST and ALT after stroke may be linked to their role on glutamate metabolism. AST and ALT convert glutamate into alpha-ketoglutarate, L-aspartate, and L-alanine, thus influencing glutamate levels in the blood. Therefore, higher AST and ALT levels result in lower glutamate levels in the blood and vice versa. As mentioned before, excessive glutamate secretion by neurons can lead to cell death and is associated with larger stroke volume, more severe stroke, and poorer functional outcomes^{157,161,163}. High blood glutamate levels after stroke may increase AST and ALT levels as a compensatory mechanism¹⁵⁷. Considering an elevated AST/ALT ratio is associated with poor IS outcomes, and that ALT is primarily concentrated in liver tissue while AST is distributed across various organs including the brain, it can be speculated that AST elevation may be more closely linked to patient clinical deterioration^{157,161}. Nevertheless, the subsequent increase in AST and ALT may be insufficient to counterbalance the adverse effects of glutamate¹⁵⁷.

ALP may play a crucial role in maintaining the permeability and integrity of the BBB and in the transport of proteins across it. Elevated ALP levels could disrupt this transport, leading to BBB breakdown and neuronal death^{157,163}. Additionally, higher ALP levels have been associated with neuroinflammation and increased vascular calcification, further contributing to poor prognosis in stroke patients^{18,157,161,163}.

Recently, GGT has been implicated in oxidative and inflammatory processes, as well as atherosclerotic pathogenesis^{158,159}. Increased GGT activity in the blood reflects heightened oxidative stress and a pro-inflammatory state¹⁵⁹. GGT is released by atherosclerotic plaques in damaged cerebral endothelial cells, which may explain its predictive value in fatal cerebrovascular events¹⁵⁸. Another possible explanation for increased GGT levels after stroke is related to the presence of the GGT4 isoenzyme in

thrombocytes. Enhanced thrombocyte activity and continuous thrombocyte breakdown during stroke pathophysiology may lead to elevated serum GGT activity¹⁵⁸.

Given the potential interdependence between liver function and stroke, it is valuable to explore whether these serum indicators of liver function can predict outcome after IS¹⁸. These markers could be integrated into a cluster of prognostic parameters for evaluating stroke patients. For example, elevated AST/ALT ratios have been linked with increased risk of HT, suggesting that therapies with potential bleeding risks (such as anticoagulants) should be used cautiously in patients with higher ratios. Additionally, hospital stays may need to be extended to prevent readmission.

3.3.1. Bilirubin

Bilirubin, the end-product of heme catabolic pathway, has traditionally been regarded as a potentially toxic substance as elevated levels of the unconjugated form (indirect bilirubin) cause irreversible damage to the brain and nervous system. However, there is compelling evidence that bilirubin also possesses anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties¹⁶⁴.

Hyperbilirubinemia – including elevated levels of total, direct, and indirect bilirubin – has been associated with larger cerebral infarctions, more pronounced brain edema, and greater stroke severity in patients with IS^{164–166}. Notably, Peng et al. (2021) identified direct bilirubin as having a stronger association and greater predictive value for poor outcomes (defined as 3-month mortality and major disability) than total or indirect bilirubin in IS patients¹⁶⁷.

Conversely, Tan et al. (2016) found no significant association between total bilirubin levels and outcomes in HS^{163,164}. However, Fu et al. (2021) reported that higher direct bilirubin levels were linked to greater stroke severity and worse outcomes at discharge among HS patients¹⁶⁸. Due to its small size, hydrophobicity, and amphipathic nature, free bilirubin can cross the intact BBB and penetrate neuronal membranes. There is strong evidence that free bilirubin concentration, rather than total or unconjugated bilirubin, determines bilirubin distribution in the brain¹⁶⁸.

Bilirubin exhibits both neuroprotective and neurotoxic properties¹⁶⁶. Within the normal range, bilirubin functions as an important endogenous anti-inflammatory and antioxidant molecule^{164,166,169}. As an antioxidant, bilirubin reduces ROS when it is oxidized to biliverdin. If biliverdin reductase levels are sufficient, biliverdin is reduced back to bilirubin, creating a bilirubin-biliverdin redox cycle that effectively reduces oxidative stress, inflammation, and cytotoxicity even at low physiologic concentrations^{165,168}. However, during a stroke, the accompanying high levels of oxidative stress can elevate bilirubin

levels^{164,167,168}. When it reaches pathological concentrations, unconjugated bilirubin may become cytotoxic, leading to neurocyte apoptosis¹⁶⁵.

Moreover, elevated direct bilirubin levels may indicate hepatocyte injury¹⁵⁴. Therefore, the positive association of direct bilirubin levels and poor outcomes might reflect the relationship between hepatic dysfunction and adverse clinical outcomes in stroke patients¹⁶³.

Future studies are necessary to elucidate whether hyperbilirubinemia following brain ischemia acts merely as a marker of initial oxidative stress and cell injury or if it contributes to neurotoxicity, exacerbating brain edema and reperfusion injuries. This understanding could pave the way for exploring bilirubin as a potential target in stroke treatment research¹⁴³.

3.4. VASCULAR AND CARDIAC-INJURY MARKERS

3.4.1. Troponin

Cardiac complications account for 20% of deaths following IS, second only to neurological deaths directly related to the initial stroke event^{170–172}. Recognizing this strong association, the American Heart Association (AHA) has issued guidelines recommending urgent noninvasive cardiac testing for all patients admitted with acute IS¹⁷³.

Cardiac troponin-T (cTnT) and cardiac troponin-I (cTnI) are key biochemical markers of cardiac injury and myocardial necrosis^{170,171,174}. Elevated serum levels of cTnT or cTnI are common during the acute phase of ischemic stroke, underscoring a close relationship between stroke and cardiac damage^{170,171}. Elevated cTnT and cTnI levels at admission were strong predictors of poor outcomes both during the acute phase and long-term follow-up after IS^{172,175,176}, even in the absence of acute coronary syndrome^{171,177}. Troponin elevation was also associated with increased mortality across all subtypes of IS^{170–172,174,176,178,179}. Particularly, patients with abnormal TnI levels were more likely to have suffered from large artery atherosclerosis or cardioembolic events¹⁷². However, the benefits of acute anticoagulation with heparinoids in IS, with or without concurrent cardioembolism or myocardial infarction, remains controversial¹⁷⁵. Acute anticoagulation is not recommended for preventing progression or reducing the risk of early recurrent stroke due to concerns about the increased risk of HT¹⁷⁵.

The etiology of troponin elevation in acute stroke is not fully understood. It is often linked to chronic conditions such as congestive heart failure or impaired renal function^{170,172}. While silent myocardial infarction may contribute to poor prognosis in these patients, studies that excluded those with acute coronary syndrome still found a statistically significant association between troponin elevation and increased all-cause mortality risk¹⁷¹. The same

continued to be observed when adjusting for renal dysfunction¹⁷⁰. These findings suggest that troponin elevation may serve as a potent marker of progressive systemic illness or overall clinical frailty, rather than being solely indicative of coronary plaque rupture and thrombosis¹⁷⁰.

Although the possibility exists that a minority of patients may have experienced simultaneous acute coronary syndrome and IS, with the coronary event precipitating stroke, prior studies suggest that this is a rare occurrence¹⁷⁹. Cardiac vulnerability to cerebrogenic stress may explain the observed troponin elevation; activation of the sympathoadrenal system could significantly contribute to myocardial damage in acute IS patients^{170,172,176–178}.

These findings should be validated in prospective studies, ideally including serial measurements of high-sensitivity cTn and objective assessments of cardiac function via echocardiography or other imaging modalities. Further research is needed to determine whether cTn elevation in IS is related to unrecognized coronary heart disease or congestive heart failure before considering changes in treatment protocols. Nevertheless, and given the frequency of abnormal troponin level in acute IS patients, routine cTn assessment may help identify patients at higher risk of post-stroke mortality or functional decline¹⁷⁰.

3.4.2. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-brain natriuretic peptide

Brain natriuretic peptide (BNP), also known as B-type natriuretic peptide (BNP) is a cardiac neurohormone synthesized and released from the ventricular myocardium in response to increased wall tension due to volume or pressure overload¹⁸⁰. Initially produced as an inactive prohormone (pro-BNP), it is then cleaved into the bioactive hormone BNP and the inactive N-terminal fragment - N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP)¹⁸¹. BNP exerts several systemic effects, including vasodilatation, increased urinary volume and sodium excretion, and inhibition of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system^{180–182}. Additionally, BNP has been detected in the hypothalamus and cerebral cortex, where it is implicated in neuroprotection following brain injury¹⁸¹.

Elevated BNP levels after IS were independently associated with larger infarct size, poorer outcome, higher mortality, and greater disability at discharge^{27,180,181,183–185}. It is noteworthy that patients with high BNP levels often have a cardioembolic stroke origin. Those presenting with BNP levels exceeding 500 pg/mL within the first 24 hours of stroke onset face a 3-fold increased risk of mortality^{180,182,184}. Similarly, elevated NT-pro-BNP was independently associated with increased risk of adverse clinical outcomes among IS patients¹⁸⁶. Additionally, NT-pro-BNP levels above 800 pg/mL in the early hours following a TIA predict the occurrence of future strokes, both ischemic and hemorrhagic¹⁷¹. Thus, early

measurement of NT-pro-BNP can serve as a simple yet powerful tool for predicting prognosis after TIA¹⁷¹.

The elevation of BNP in stroke patients can be attributed to several factors: (1) Atrial fibrillation, a high-risk factor for acute cerebral infarction, is prevalent in cardioembolic patients, with most emboli originating from persistent or paroxysmal atrial fibrillation; (2) Many cardioembolic stroke patients have pre-existing congestive heart failure before the acute stroke onset; (3) Stroke triggers an increase in ventricular wall stress due to interplay between the nervous and endocrine system, further exacerbating the risk of congestive heart failure. Consequently, blood BNP levels are more markedly elevated in cardioembolic stroke patients^{183,187}. Nevertheless, the severity of brain damage itself may also contribute to BNP elevation, partly through the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system¹⁸².

In summary, BNP testing can be crucial to identify patients who may require more aggressive treatment or intensive rehabilitation, thereby playing a significant role in risk stratification during admission and in acute stroke phase¹⁸¹. Neurologists should recognize the importance of elevated BNP as it often indicates a cardioembolic stroke origin, suggesting the need to consider mechanical thrombectomy in addition to IVT. Furthermore, BNP levels could support the early implementation of antithrombotic therapy, improving the patient's cardiac condition and, as a result, their rehabilitation potential¹⁸¹.

3.4.3. D-Dimer

D-dimer, a fibrin degradation product, serves as a biomarker for coagulation and reflects increased thrombosis^{188–190}. As such, plasma D-dimer is considered a key indicator of hemostatic abnormalities and thrombosis^{31,191,192}. While widely used to exclude deep vein thrombosis and pulmonary embolism, its role as a diagnostic tool for cardiovascular, cerebrovascular, and aortic diseases is still under exploration and has not yet gained widespread consensus¹⁸⁸.

Patients presenting with elevated D-dimer levels at admission were more likely to experience adverse outcomes following IS, both at discharge and during 3-, 6- and 12-month follow-up^{188,189,192,193}. High plasma D-dimer levels were significantly associated with larger infarct volumes^{36,191}, early neurological deterioration¹⁸⁸, and HT after IVT¹⁹². A systematic review by Zhang et al. (2021) supports the predictive value of D-dimers for both short- and long-term stroke prognosis, linking higher levels to poorer functional outcomes and increased mortality¹⁹⁰. Interestingly, while the association between plasma D-dimer levels and functional outcomes is stronger for IS compared to HS, its predictive power for mortality is similar across both stroke types¹⁹⁰.

D-dimer levels were also notably higher in cardiogenic strokes, which involve fibrin-rich clots, compared to strokes caused by other mechanisms^{188,194}. In contrast, D-dimer elevation was relatively insignificant in strokes caused by large artery disease, which forms a platelet-rich thrombi, or small vessel occlusion due to lipohyalinosis¹⁸⁸. The highest D-dimer levels were observed in cardioembolic infarction, followed by atherothrombotic and then lacunar infarction¹⁹⁴.

Several mechanisms may explain the link between elevated D-dimer levels and poor stroke outcomes. One possibility is that D-dimer play a critical role in coagulation activity, thrombin generation, and fibrin formation, with high levels potentially contributing to stroke progression and severity^{188,189}. Additionally, D-dimer is a common risk factor for venous thromboembolism after stroke, suggesting a prothrombotic state that increases susceptibility to major thrombotic events. Another explanation is that D-dimer may mediate inflammatory responses, as studies have shown it upregulates the interleukin-6 pathway, which is associated with recurrent vascular diseases¹⁸⁹. Recurrent vascular events can lead to further functional disability^{188,189,191–193}, and elevated plasma D-dimer may predict poor outcomes by exacerbating cerebral tissue damage, disturbing recanalization, and increasing reperfusion injury¹⁹¹.

D-dimers are a promising biomarker candidate due to its prolonged stability, long half-life, cost-effectiveness, and high sensitivity (> 97%)¹⁹⁰. However, its routine use in clinical practice is complicated by its non-specificity, as D-dimer levels can also be elevated in response to inflammatory states, infections, cancer, and venous thromboembolism¹⁷⁰. Despite these limitations, measuring initial D-dimer levels as a screening tool in stroke patients could provide valuable prognostic information and help predict early complications and outcomes.

3.5. INFLAMMATION RELATED MARKERS

After the stroke episode, brain injury results in apoptosis and necrosis, which drive neuroinflammation. This inflammatory response is characterized by the recruitment of several cell types with the activation of resident glial cells and then with the infiltration of leukocytes, monocytes and other immune cells in the brain, thus releasing inflammatory cytokines and other factors. A network of immune cascades occurs almost simultaneously to induce beneficial and detrimental effects in the early stages of stroke that continue in the later phases.

3.5.1. C-reactive protein

C-reactive protein (CRP) is an acute-phase reactant and a key component of the innate immune response. It is primarily produced in the liver under the stimulation of

interleukin-6 (IL-6), although small amounts can also be synthesized by peripheral lymphocytes and monocytes. CRP binds to the surface of dead or dying cells and certain bacteria, activating the complement system promoting phagocytosis by macrophages^{7,195,196}.

Multiple studies have demonstrated that CRP concentrations are predictive of several adverse outcomes in IS patients, including future cardiovascular events, infarct volume, HT, mortality, recurrent stroke, poor functional outcomes, and post-stroke depression^{7,38,119,137,195–199}. In a multivariate logistic regression analysis, CRP concentrations greater than 10 mg/L were independently associated with 1- year mortality¹⁷⁷. Additionally, the international, multicenter prospective biomarker study “Levels of Inflammatory Markers in the Treatment of Stroke” (LIMITS), found that patients with high-sensitivity CRP (hsCRP) levels above 4.86 mg/L had a twofold increased risk of recurrent IS or major vascular events¹⁹⁵. These findings were further supported by a meta-analysis conducted by Yu et al. (2019), Vangilder et al. (2014) and Hu et al. (2020), which showed that IS patients with the highest CRP levels had nearly twice the risk of poor functional outcomes and mortality^{197,200,201}. However, this association was not observed after IVT, suggesting that the treatment may alter CRP levels and subsequently affect its prognostic value²⁰⁰.

The association between elevated CRP and post-stroke mortality and outcome may partly reflect inflammation-induced endothelial cell dysfunction and platelet activation^{180,182}. Nevertheless, CRP elevation in the acute phase of stroke may also indicate a systemic inflammatory response, the severity of the stroke, or concurrent infections at the time of sampling, highlighting the low specificity of CRP^{7,195,196}. The role of CRP in acute stroke is still not completely understood, as it exhibits both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects¹⁹⁷. Elevated serum CRP levels are considered a marker for atherothrombotic disease and may reflect the degree of inflammatory activity within atherosclerotic plaques. Moreover, CRP also acts as a chemoattractant for monocytes, upregulates adhesion molecules, modulates NO bioavailability, and induces several inflammatory genes via NF- κ B activation^{136,196}. Despite its nonspecific nature, some studies have suggested that CRP elevations in stroke may reflect different phenomena depending on the timing, with early elevations more closely associated with stroke severity and later elevations linked to post-stroke infections^{7,195,196}.

Current literature indicates that CRP expression is influenced by multiple factors, such as genetic polymorphisms, genomic backgrounds, and gender that could explain some controversial results in different studies. However, few works have comprehensively analyzed data based on all these factors. Future research should focus on integrating these

variables into analysis¹⁹⁶. Notwithstanding, CRP holds promise as a prognostic marker for improving the prediction of post-stroke death and disability, making it a potential tool for risk stratification in future clinical trials^{195,202}.

3.5.2. Interleukin-6

Cytokines are a family of pleiotropic polypeptides that play a crucial role in regulating cell activation, proliferation, and differentiation. IL6 stimulates hepatocytes to synthesize acute phase proteins, primarily fibrinogen and CRP. Various other molecules, such as IL-1, IL-4, TNF- α and prostaglandins can trigger and modulate the production of IL-6. In a healthy brain, cytokines are barely detectable, as their receptors are expressed at very low levels. However, following an ischemic insult, cytokines levels are rapidly and extensively upregulated, mediating both proinflammatory and anti-inflammatory responses. Among these, IL-6 is the predominant proinflammatory cytokine involved in stroke. Various cell types, including microglial cells, leukocytes, astrocytes and endothelial cells, can produce IL-6 in response to brain injury^{203,204}.

Numerous studies have demonstrated strong associations between elevated IL-6 levels and various outcomes. High IL-6 levels have been linked to both short-term neurological outcomes and long-term functional recovery, independent of post-stroke infections^{7,205}. Increased IL-6 blood levels in IS patients are associated with larger infarct size and acute phase response intensity, greater neurological deficits at admission, early neurological deterioration, recurrent stroke, and an increased risk of death or poor functional outcomes^{38,197,204,206}. Specifically, plasma IL-6 levels at admission have been identified as an independent prognostic factor for early clinical worsening within the first 48 hours, as measured by the NIHSS, and as a predictor of poor functional status at 30 days, as assessed by the mRS²⁰⁴. Additionally, a study by Hotter et al. (2019) found a direct correlation between IL-6 levels and final infarct size, as determined by MRI²⁰⁵. Furthermore, IL-6 has been recognized as a strong predictor of all-cause mortality within 90 days following IS²⁰⁶. A meta-analysis further confirmed the prognostic value of IL-6 for functional outcomes and mortality in IS patients²⁰³. IL-6 expression is also significantly elevated in patients with symptomatic atherosclerosis in the coronary and/or carotid/cerebral arteries³⁸. Moreover, the correlation between IL-6 and recurrent stroke is particularly pronounced in patients with large-artery atherosclerosis and small-vessel occlusion, underscoring the link between IL-6 and atherosclerosis progression²⁰⁴.

The biological role of IL-6 in stroke remains a subject of ongoing research. While IL-6 is expressed by astrocytes and microglia, its precise impact - whether neurotoxic or neuroprotective- remains debated²⁰⁵. Studies in IL-6 knock-out mice have shown similar

stroke volumes and levels of disability after 24 hours compared to those with normal IL-6 levels, suggesting that IL-6 elevation may serve as a general marker of disease severity rather than directly influencing disease-specific pathways leading to poor prognosis²⁰³. Nevertheless, IL-6 has a variety of functions, including propagating downstream inflammatory responses that contribute to cerebral damage, BBB disruption, increased coagulation, and the promotion of lymphocyte proliferation and differentiation^{38,204}. IL-6 has also been implicated in progression of atherosclerosis and plaque instability, which may explain its predictive value for recurrent stroke²⁰⁴.

Overall, IL-6 appears to be an inflammatory marker of cerebral damage, independent of systemic infections, that could be valuable for risk stratification in stroke patients. Its role in stroke highlights the potential for targeting inflammation in future clinical trials.

3.5.3. Ferritin

Serum ferritin is both an acute-phase reactant and a marker for intracellular iron stores^{35,207,208}. Research indicates that iron plays a critical role in neurotoxicity and edema formation following stroke²⁰⁸. Increased plasma levels of ferritin suggest the presence of an immune-inflammatory or acute phase response. However, as an acute-phase reactant, ferritin also helps protect cells against oxidative stress mediated by free radicals²⁰⁸. Elevated serum iron, as measured by serum ferritin, has been linked to increased atherogenesis³⁷. In brain tissue, most non-heme iron exists in the form of ferritin, predominantly localized in astrocytes and microglia²⁰⁹.

Serum ferritin has shown a significant positive correlation with the severity of IS, with higher levels associated with worse functional outcomes³⁷. Patients with elevated serum ferritin at admission tended to experience more severe deterioration compared to those with lower levels^{35,208,209}. Moreover, higher ferritin levels have been linked to an increased risk of HT²⁰⁸.

In cases of ICH, elevated ferritin levels were similarly associated with poorer functional outcomes, larger edema, and greater hematoma volumes^{207–210}. A meta-analysis by Zhang et al. (2019) further confirmed that serum ferritin levels at admission could predict the short-term prognosis of patients with ICH²¹¹.

During the acute phase of stroke, superoxide radicals increase cytosolic iron levels by releasing it from ferritin. This free iron can initiate and propagate lipid peroxidation, disrupt membrane fluidity, and inactivate membrane-bound enzyme complexes, thereby aggravating edema, membrane disruption and cell death^{210,211}. Higher serum ferritin levels indicate larger body iron stores, which, when released during brain ischemia, intensify tissue

injury. Reperfusion further aggravates this injury due to additional iron release and increased oxidative stress. Another proposed mechanism suggests that brain cells with higher iron stores release more glutamate when injured during ischemia, which in turn increases cytotoxicity^{35,208,209,211}. Previous studies have also suggested that iron overload may contribute to vascular disease by promoting thrombosis after arterial injury³⁵.

These findings suggest that serum ferritin at admission could serve as a potential predictor of stroke prognosis and highlight the need for further research into the therapeutic role of iron chelation in improving stroke outcomes^{208,210}.

The predictive value of CRP and other acute-phase reactants in stroke outcomes remains unclear. Their concentrations might reflect the severity of the stroke and the burden of atherosclerotic lesions^{199,200}. Besides, inflammation exacerbates the response to tissue injury, playing a crucial role in determining the severity of the disease³⁷. While some medications used in stroke patients (aspirin, statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors) may reduce IL-6 and CRP levels, it is still uncertain whether attenuating the inflammatory response benefits stroke patients¹⁹⁷. The CONVINCe (Colchicine for Prevention of Vascular Inflammation in Non-cardio Embolic Stroke) study investigates the effect of low-dose colchicine on reducing recurrent stroke rates and may provide further insights²⁰⁴.

These findings have important implications for patients care. Beyond pharmacologic interventions, lifestyle modifications such as diet, exercise and smoking cessation can reduce vascular inflammation. Therefore, lifestyle changes should be emphasized, and monitoring inflammation marker levels could serve as motivational tool for making healthier choices.

3.6. NEURONAL-INJURY MARKERS

3.6.1. Neuron-specific enolase

Neuron-specific enolase (NSE) is an intracellular glycolytic enzyme predominantly found in neurons, cells with neuroendocrine differentiation, as well as in erythrocytes^{165,212}. NSE is released into the bloodstream following neuronal damage and has been extensively studied as a biomarker for brain injury, including cerebral infarction^{213,214}. Under normal physiological conditions, blood levels of NSE are negligible²¹⁵. However, elevated NSE concentrations occur after hypoxia, hemorrhage, or central nervous system injury³⁸. These conditions are characterized by the disruption of the BBB and subsequent damage of neuronal cells, leading to a leakage of NSE. This enzyme can be detected in cerebrospinal fluid, blood samples and saliva.

Several studies have demonstrated a positive correlation between the presence of NSE in the serum of IS patients at admission and a worse neurological status on the first day^{13,38,165,215}, larger cerebral infarctions^{165,213,215}, evident brain edemas²¹⁵, and greater disability at 3-month^{13,165,213,214}. IS patients with NSE concentrations exceeding 13 ng/mL were more likely to experience poor functional outcome²¹⁴. The role of NSE in predicting long-term outcomes in patients undergoing reperfusion therapies has been evaluated in several studies. Freitas et al. (2024) investigated the association between serum NSE levels at admission and 48 hours after reperfusion therapies, and the functional outcomes in IS patients. The NSE levels at 48 hours post-reperfusion therapies were associated with functional outcomes, serving as a potential tool for patient long-term prognosis²¹⁶.

Similarly, in HS, higher serum NSE levels were associated with greater neurological and functional disability¹³. A systematic review by Najmi et al. (2019) further confirmed this relationship between NSE levels and NIHSS scores, infarct volume, and poor functional outcomes in both IS and HS patients²¹². While NSE levels are higher in HS compared to IS, the difference is not substantial enough for reliable differentiation between the two stroke types¹³. Nonetheless, NSE concentration in the serum is directly proportional to stroke severity¹³, with patients experiencing reperfusion injury, HT, ischemia-induced damage, or BBB disruption showing more severe neurological deficits and higher NSE levels in the bloodstream²¹⁴.

Cerebral injuries, secondary edema, and increased intracranial pressure lead to neuronal necrosis, myelin disintegration, and BBB breakdown, resulting in the release of NSE, as already referred^{13,214}. Nevertheless, NSE serum levels can be detected before irreversible neuronal damage occurs¹³. Thus, measuring NSE serum levels during the acute phase of stroke could provide valuable insights for assessing the neurological deficit in cerebral infarction patients^{13,165}.

3.6.2. S100 calcium-binding protein B

S100 calcium-binding protein B (S100B) is a calcium-binding protein primarily expressed in astroglial cells and is widely studied as a biomarker for brain injury and BBB disruption⁹. Following acute brain injury, astrocytes release S100B, which can be detected in serum if the BBB is compromised¹⁹. Biologically, S100B plays a crucial role in stimulating the proliferation and maturation of neurons, as well as promoting the development of astrocytes and oligodendrocytes²¹⁷.

Elevated serum S100B level within the first 72 hours after the onset of IS have been strongly associated with larger lesion volumes^{19,197}, greater neurological disfunction at admission^{19,33,218}, in-hospital mortality²¹⁹, and worse long-term outcome at one year^{19,38,218}.

Notably, serum S100B levels exceeding 0.7 µg/L in patients with minor strokes (NIHSS ≤ 5) are highly indicative of HT following IS²¹⁷. Furthermore, on the second day after mechanical thrombectomy, serum S100B concentrations provided a reliable assessment of ischemic tissue injury, as evidenced by elevated S100B levels in parallel with the development of a significant infarct core²²⁰.

S100B levels were significantly higher in patients with poor stroke outcomes, peaking on days 3 and 4 post-stroke^{221,222}. Consequently, patients who arrive at the hospital sooner after stroke onset typically have lower S100B levels at admission²¹⁹. Despite this, the initial S100B measurement at admission reflects astroglial necrosis and serves as an estimate of infarct size, while peak S100B levels on the third day likely correlate with edema formation^{221,222}. Pathologically elevated levels of S100B in the extracellular space promote neuroinflammation, exacerbating brain tissue damage and edema¹⁹⁷.

Like NSE, S100B is released not from the infarct core but from the penumbra in response to adenosine and glutamate excitotoxicity²¹⁸. Besides, both NSE and S100B are restricted to the brain tissue and have short half-life, making them promising biomarkers for monitoring the progression of ischemic stroke in real-time^{213,218}.

3.6.3. Brain-derived neurotrophic factor

Neurotrophins are an important class of signaling molecules in the brain, responsible for axon targeting, neuron growth, and synapse maturation. Among them, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a key role in neuronal survival, synaptic plasticity, learning, and memory^{219,222}. Extensive evidence has linked BDNF levels to various neurological disorders; for instance, low concentrations of BDNF has been reported in neurodegenerative and neuropsychiatric conditions such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression, autism spectrum disorders, and post-traumatic stress disorder²¹⁹.

In IS, several studies have indicated that lower blood concentrations of BDNF during the acute phase of stroke were associated with larger infarcts²²², worse neurological deficits at admission²²², PSD²¹⁹, and poor long-term functional outcomes (ranging from 3 months to 7-years)^{223,224}.

Given its role in synaptic plasticity, BDNF is recognized as a neuroprotective protein^{26,222,225}. These findings support the hypothesis that reduced BDNF levels are linked to the neuronal loss seen in various neuropsychiatric disorders and cognitive deficits²¹⁹. It appears that BDNF may play a critical role in brain injury recovery, and its decreased concentration during stroke may impede this reparative process²²⁴. Moreover, several in vivo studies have demonstrated that inflammation significantly affects BDNF expression in the brain, with

administration of pro-inflammatory cytokines decreasing BDNF gene expression²²². This could explain the decreased BDNF levels observed in IS patients upon hospital admission, as elevated inflammatory markers are also present and correlated with stroke prognosis. However, no research has definitively determined whether these changes in BDNF and inflammatory markers are interrelated or independent prognostic factors, highlighting an area for future research.

The studies mentioned above had limitations, including a lack of consideration for participants' exercise and physical activity habits, which are known to increase BDNF levels²²². Additionally, they did not account for genetic variations in the BDNF gene. Recent data suggests that the BDNF Val66Met polymorphism impairs stroke-induced BDNF release, leading to greater motor deficits and gait impairment in acute ischemia, though no significant differences in infarct size have been reported²²².

Due to its neuroprotective role, BDNF has been extensively studied as a potential therapeutic target after stroke²²⁵. For instance, Zhang et al. (2017) found that daily treatment with 80 mg atorvastatin (a statin) increased BDNF levels and improved functional recovery after atherothrombotic stroke²²⁶. This suggests that, in addition to lowering cholesterol level, statins might also provide neuroprotective benefits after IS, as atorvastatin-treated patients were observed to present higher serum BDNF levels, potentially contributing to patients' better functional recovery²²⁶.

In summary, serum BDNF levels have been proposed as a prognostic laboratory parameter that could be easily integrated into clinical practice for assessing stroke outcomes. However, further research is needed to clarify its relationship with inflammatory molecules and cholesterol, as well as to explore its potential therapeutic applications.

4. CONCLUSION

Despite recent advancements in diagnostic methods, there remains a significant gap in the ability to continuously, non-invasively, and affordably monitor changes in brain tissue following a stroke. Long-term functional outcome scales, such as the BI and mRS, are commonly used to measure the degree of physical dependence. However, these scales are often criticized for their reliability due to significant inter-rater variability and the lateralization bias - lesions to the left hemisphere give rise to greater motor disabilities and thus greater values on the scales than lesions on the right hemisphere. Additionally, there is no standardized definition of "good" versus "unfavorable" outcome, with some studies defining poor outcomes as mRS > 2 and others as mRS > 3. A more critical limitation is that post-stroke disability encompasses more than just physical dependence; cognitive impairment

and comorbid depression, which significantly affect quality of life, are not captured by these scales.

The development of more accurate outcome prediction tools for the acute setting may benefit from incorporating both physical and mental well-being parameters, as well as blood biomarkers. While individual blood parameters have been associated with stroke characteristics and functional outcome, no single biomarker has yet provided clinically relevant information beyond existing stroke severity scores. However, multimarker approaches, which combine panels of biomarkers with clinical variables, may offer a more comprehensive assessment. Despite this potential, there is a lack of studies investigating large panels of multiparameter biomarkers for diagnosis and prognosis. Nevertheless, certain biomarkers such as serum albumin, cortisol, homocysteine, troponin, D-dimers, CRP, IL-6, and BDNF, have shown individual correlations with stroke subtype, stroke severity, and outcomes, including dependency and mortality. Many of these molecules could be valuable tools in clinical practice for predicting stroke outcomes. However, variability in study designs, population sizes, follow-up durations, no defined cutoff as well as the use of different assay kits, techniques, and standard ranges contributes to discrepant results. Moreover, most studies have measured these biomarkers at only a single time-point, whereas dynamic, longitudinal measurements may provide better insight into outcome prediction and underlying injury mechanisms. Additionally, the heterogeneity in pathogenesis across different subtypes suggests that different biomarkers may be relevant to each subtype, yet most research has only distinguished between IS and HS. Furthermore, most of these studies have been observational, making it challenging to establish cause-and-effect relationships.

Future research on biomarkers for predicting stroke outcomes should prioritize the following key areas: (1) identifying the most suitable candidates for a comprehensive panel of prognostic biomarkers tailored to different stroke subtypes; (2) determining the optimal timing for biomarker measurements; (3) standardizing reference values and laboratory assay kits; (4) conducting large, prospective, multicenter international studies; and (5) assessing the added predictive value of these biomarkers over existing clinical information, utilizing multivariate and more rigorous statistical analysis. By addressing these points, a clinically useful biomarker panel could be developed to assess patient's risk of dependency, mortality, or recurrence, thereby improving patient care through the implementation of personalized therapies.

In conclusion, several molecules routinely screened in clinical chemistry laboratories show promise as prognostic biomarkers for stroke, having strong associations with stroke severity, recurrence, infarct volume, functional outcomes and mortality. It is likely that a

combination of serum biomarkers, alongside physical examinations and imaging studies, will provide the greatest accuracy in predicting stroke outcomes. Further research is needed before these biomarkers can be fully integrated into clinical practice, but they hold potential for improving post-stroke prognosis and support better clinical guidelines.

REFERENCES

1. Feigin, V. L. et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 20, 1–26 (2021).
2. S, S. S. & Basavaiah, R. A STUDY ON THE ROLE OF SERUM CALCIUM ALBUMIN AND URIC ACID AS PREDICTOR OF NEUROLOGICAL SEVERITY AND SHORT-TERM OUTCOME IN ACUTE ISCHAEMIC STROKE. *Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare* 4, 3915–3920 (2017).
3. Feigin, V. L. et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol* 19, 255–265 (2020).
4. Wafa, H. A. et al. Burden of Stroke in Europe: Thirty-Year Projections of Incidence, Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years. *Stroke* 51, 2418–2427 (2020).
5. Feigin, V. L. et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke* 17, 18–29 (2022).
6. Chen, S., Zeng, L. & Hu, Z. Progressing haemorrhagic stroke: categories, causes, mechanisms and managements. *J Neurol* 261, 2061–2078 (2014).
7. Bustamante, A., Simats, A., Vilar-Bergua, A., García-Berrocso, T. & Montaner, J. Blood/Brain Biomarkers of Inflammation After Stroke and Their Association With Outcome: From C-Reactive Protein to Damage-Associated Molecular Patterns. *Neurotherapeutics* 13, 671–684 (2016).
8. Berge, E. et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J* 6, I–LXII (2021).
9. ESO Guideline Directory - European Stroke Organisation. <https://eso-stroke.org/guidelines/eso-guideline-directory/>.
10. Turc, G. et al. European Stroke Organisation – European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy expedited recommendation on indication for intravenous thrombolysis before mechanical thrombectomy in patients with acute ischaemic stroke and anterior circulation large vessel occlusion. *Eur Stroke J* 7, I–XXVI (2022).
11. Yao, E. S. et al. Elevated Homocysteine Level Related to Poor Outcome After Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Med Sci Monit* 22, 3268 (2016).

12. Wang, Z. et al. Serum Uric Acid Levels and Outcomes After Acute Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 53, 1753–1759 (2016).
13. Pandey, A., Shrivastava, A. K. & Saxena, K. Neuron specific enolase and c-reactive protein levels in stroke and its subtypes: correlation with degree of disability. *Neurochem Res* 39, 1426–1432 (2014).
14. Bielewicz, J. E. et al. Clinical and biochemical predictors of late-outcome in patients after ischemic stroke. *Ann Agric Environ Med* 27, 290–294 (2020).
15. Ren, W. et al. Serum Uric Acid Levels at Admission Could Predict the Chronic Post-stroke Fatigue. *Front Nutr* 9, (2022).
16. Zhang, H., Liu, G., Zhang, L. & Wei, W. Personalized Biomarkers and Neuropsychological Status Can Predict Post-Stroke Fatigue. *Brain Sci* 13, (2023).
17. Arnold, M. et al. Lipoprotein(a) is associated with large artery atherosclerosis stroke aetiology and stroke recurrence among patients below the age of 60 years: results from the BIOSIGNAL study. *Eur Heart J* 42, 2186–2196 (2021).
18. Wang, Y. et al. AST to ALT ratio and risk of hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke. *Neurol Res* 42, 980–986 (2020).
19. Lai, P. M. R. & Du, R. Association between S100B Levels and Long-Term Outcome after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Pooled Analysis. *PLoS One* 11, (2016).
20. Wu, C. et al. Association Between Serum Levels of Vitamin D and the Risk of Post-Stroke Anxiety. *Medicine* 95, e3566 (2016).
21. Gu, Y. et al. Low Serum Levels of Uric Acid are Associated with Development of Poststroke Depression. *Medicine (United States)* 94, e1897 (2015).
22. Bai, H. et al. Increased serum uric acid level is associated with better outcome after endovascular treatment for acute ischemic stroke—a prospective cohort study. *Ann Transl Med* 10, 1111–1111 (2022).
23. Zhu, H. Y. et al. Elevated Serum Uric Acid Increases the Risk of Ischemic Stroke Recurrence and Its Inflammatory Mechanism in Older Adults. *Front Aging Neurosci* 14, (2022).
24. Li, G. et al. Relationship between Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Risk of Recurrent Stroke. *Nutrients* 14, (2022).
25. Wang, F. et al. Triglyceride-glucose index and stroke recurrence in elderly patients with ischemic stroke. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13, 1005614 (2022).
26. Prodjohardjono, A., Sutarni, S. & Setyopranoto, I. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level may predict the functional outcome of acute ischemic stroke patients. *Biomed Pharmacol J* 13, 1963–1973 (2020).

27. Chen, L., Xu, J., Sun, H., Wu, H. & Zhang, J. The total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol as a predictor of poor outcomes in a Chinese population with acute ischaemic stroke. *J Clin Lab Anal* 31, (2017).
28. Han, Y. et al. Association between triglyceride-to-high density lipoprotein cholesterol ratio and three-month outcome in patients with acute ischemic stroke: a second analysis based on a prospective cohort study. *BMC Neurol* 22, 1–13 (2022).
29. Ji, W., Zhou, H., Wang, S., Cheng, L. & Fang, Y. Low Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D Are Associated with Stroke Recurrence and Poor Functional Outcomes in Patients with Ischemic Stroke. *J Nutr Health Aging* 21, 892–896 (2017).
30. Sayan, S. & Kotan, D. Levels of brain natriuretic peptide as a marker for the diagnosis and prognosis of acute ischemic stroke. *Arch Med Sci Atheroscler Dis* 1, e16 (2016).
31. Ovbiagele, B. et al. Serum calcium as prognosticator in ischemic stroke. *Stroke* 39, 2231–2236 (2008).
32. Deb, P., Sharma, S. & Hassan, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 17, 197–218 (2010).
33. Bernoud-Hubac, N., Lo Van, A., Lazar, A. N. & Lagarde, M. Ischemic Brain Injury: Involvement of Lipids in the Pathophysiology of Stroke and Therapeutic Strategies. *Antioxidants* 2024, Vol. 13, Page 634 13, 634 (2024).
34. Iadecola, C., Buckwalter, M. S. & Anrather, J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J Clin Invest* 130, 2777 (2020).
35. Garg, R. et al. Role of serum ferritin as a prognostic marker in acute ischemic stroke: A preliminary observation. *Ann Afr Med* 19, 95–102 (2020).
36. Wang, J., Ning, R. & Wang, Y. Plasma D-dimer Level, the Promising Prognostic Biomarker for the Acute Cerebral Infarction Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25, 2011–2015 (2016).
37. Chakraborty, B. et al. Lipoprotein(a), ferritin, and albumin in acute phase reaction predicts severity and mortality of acute ischemic stroke in North Indian Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22, (2013).
38. Lasek-Bal, A. et al. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J Physiol Pharmacol* 70, (2019).
39. Morotti, A. et al. Association Between Serum Calcium Level and Extent of Bleeding in Patients With Intracerebral Hemorrhage. *JAMA Neurol* 73, 1285 (2016).

40. Shah, H., Paul, G. & Yadav, A. K. Surface-Tailored Nanoplatfor for the Diagnosis and Management of Stroke: Current Strategies and Future Outlook. *Mol Neurobiol* 61, 1383–1403 (2024).
41. Zhou, Z. M., Gu, L. L., Zhou, Z. Y. & Liang, Q. Le. Recent Advance of S100B Proteins in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage and Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Front Biosci (Landmark Ed)* 29, (2024).
42. Alvarez-Perez, F. J., Castelo-Branco, M. & Alvarez-Sabin, J. Albumin level and stroke. Potential association between lower albumin level and cardioembolic aetiology. *Int J Neurosci* 121, 25–32 (2011).
43. Kasundra, G. & Sood, I. Prognostic Significance Of Serum Albumin Prognostic Significance Of Serum Albumin Levels In Acute Ischemic Stroke. *NJIRM* 5, (2014).
44. Abubakar, S., Sabir, A., Ndakotsu, M., Imam, M. & Tasiu, M. Low admission serum albumin as prognostic determinant of 30-day case fatality and adverse functional outcome following acute ischemic stroke. *Pan African Medical Journal* 14, (2013).
45. Famakin, B. et al. Hypoalbuminemia Predicts Acute Stroke Mortality: Paul Coverdell Georgia Stroke Registry. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 19, 17–22 (2010).
46. Idicula, T. T., Waje-Andreassen, U., Brogger, J., Naess, H. & Thomassen, L. Serum albumin in ischemic stroke patients: The higher the better. *Cerebrovasc Dis* 28, 13–17 (2009).
47. Dziedzic, T., Slowik, A. & Szczudlik, A. Serum albumin level as a predictor of ischemic stroke outcome. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35, (2004).
48. Babu, M. S. et al. Serum albumin levels in ischemic stroke and its subtypes: Correlation with clinical outcome. *Nutrition* 29, 872–875 (2013).
49. Zhou, H. et al. Low serum albumin levels predict poor outcome in patients with acute ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Stroke Vasc Neurol* 6, 458–466 (2021).
50. Zhang, Q. et al. Serum albumin level is associated with the recurrence of acute ischemic stroke. *Am J Emerg Med* 34, 1812–1816 (2016).
51. Dziedzic, T., Pera, J., Slowik, A., Gryz-Kurek, E. A. & Szczudlik, A. Hypoalbuminemia in acute ischemic stroke patients: Frequency and correlates. *Eur J Clin Nutr* 61, 1318–1322 (2007).
52. Makris, K. et al. Prognostic significance of serum albumin level changes in acute ischemic stroke: The role of biological and analytical variation. *Clin Chem Lab Med* 54, 143–150 (2016).
53. Martin, R. H. et al. ALIAS (Albumin in Acute Ischemic Stroke) Trials: Analysis of the Combined Data from Parts 1 and 2. *Stroke* 47, 2355–2359 (2016).

54. Barugh, A. J., Gray, P., Shenkin, S. D., MacLulich, A. M. J. & Mead, G. E. Cortisol levels and the severity and outcomes of acute stroke: a systematic review. *J Neurol* 261, 533–545 (2014).
55. Saini, G. et al. Single Serum Cortisol Value as a Prognostic Marker in Acute Ischemic Stroke. *Cureus* 15, (2023).
56. Ben Assayag, E. et al. High hair cortisol concentrations predict worse cognitive outcome after stroke: Results from the TABASCO prospective cohort study. *PNEC* 82, 133–139 (2017).
57. Iranmanesh, F., Sedighi, B. & Ziaadini, B. Prognostic Value of Cortisol in Patients with Acute Ischemic Stroke. *ZJRMS* 2017 19:2 19, 6187 (2017).
58. Fatima, S. & Khan, R. Prognostic significance of serum cortisol and serum albumin in patients of ischemic stroke. *IJAM* 7, 650–655 (2020).
59. Kasundra, G., Sood, I., Bhushan, B., Bohra, G. & Supriya, P. Clinico-radiological correlation between serum calcium and acute ischemic stroke. *Int J Adv Med Health Res* 1, 69 (2014).
60. Vijay Prabhu, S., Tripathi, B., Agarwal, Y., Kabi, B. & Kumar, R. Association of serum calcium levels with clinical severity of ischemic stroke at the time of admission as defined by NIHSS score: A cross-sectional, observational study. *J Family Med Prim Care* 11, 6427 (2022).
61. Appel, S. A. et al. Serum calcium levels and long-term mortality in patients with acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 31, 93–99 (2011).
62. Chung, J. W., Ryu, W. S., Kim, B. J. & Yoon, B. W. Elevated Calcium after Acute Ischemic Stroke: Association with a Poor Short-Term Outcome and Long-Term Mortality. *J Stroke* 17, 54 (2015).
63. Gupta, A. et al. Effect of Vitamin D and calcium supplementation on ischaemic stroke outcome: a randomised controlled open-label trial. *Int J Clin Pract* 70, 764–770 (2016).
64. Guo, Y. et al. Lower serum calcium level is associated with hemorrhagic transformation after thrombolysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 46, 1359 (2015).
65. Chen, X. et al. Serum Calcium Levels and in-Hospital Infection Risk in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat* 18, 943 (2022).
66. Zhang, B., Wang, Y., Zhong, Y., Liao, S. & Lu, Z. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency predicts poor outcome among acute ischemic stroke patients without hypertension. *Neurochem Int* 118, 91–95 (2018).
67. Xu, T. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency predicts poor outcome amongst acute ischaemic stroke patients with low high density lipoprotein cholesterol. *Eur J Neurol* 23, 1763–1768 (2016).

68. Tu, W. J., Zhao, S. J., Xu, D. J. & Chen, H. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts the short-term outcomes of Chinese patients with acute ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)* 126, 339–346 (2014).
69. Wang, Y., Ji, H., Tong, Y. & Zhang, Z. B. Prognostic value of serum 25-hydroxyvitamin D in patients with stroke. *Neurochem Res* 39, 1332–1337 (2014).
70. Park, K. Y. et al. Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 40, 73–80 (2015).
71. Koh, J., Shah, S. U., Chua, P. E. Y., Gui, H. & Pang, J. Vitamin D and Stroke: Effects on Incidence, Severity, and Outcome and the Potential Benefits of Supplementation. *Front Neurol* 11, 1–15 (2020).
72. Dumas, A. et al. Association between Admission Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Functional Outcome of Thrombolysed Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25, 907–913 (2016).
73. Qiu, H. et al. Vitamin D Status and the Risk of Recurrent Stroke and Mortality in Ischemic Stroke Patients: Data from a 24-Month Follow-Up Study in China. *J Nutr Health Aging* 21, 766–771 (2017).
74. Michos, E. D. et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with fatal stroke among whites but not blacks: The NHANES-III linked mortality files. *Nutrition* 28, 367–371 (2012).
75. Huang, H. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts early recurrent stroke in ischemic stroke patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26, 908–914 (2016).
76. Narasimhan, S. & Balasubramanian, P. Role of Vitamin D in the Outcome of Ischemic Stroke- A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res* 11, CC06 (2017).
77. Mi, D. et al. Stress hyperglycemia is associated with in-hospital mortality in patients with diabetes and acute ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther* 28, 372–381 (2022).
78. Olivot, J. M. et al. MRI profile of the perihematomal region in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41, 2681–2683 (2010).
79. Perez-Vega, C. et al. Influence of glucose levels on clinical outcome after mechanical thrombectomy for large-vessel occlusion: a systematic review and meta-analysis. *J Neurointerv Surg* 14, (2022).
80. Kleindorfer, D. O. et al. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 52, E364–E467 (2021).
81. Fuentes, B. et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on glycaemia management in acute stroke. *Eur Stroke J* 3, 5–21 (2018).

82. Mi, D. et al. Correlation of hyperglycemia with mortality after acute ischemic stroke. *Ther Adv Neurol Disord* 11, (2017).
83. Rinkel, L. A. et al. High Admission Glucose Is Associated With Poor Outcome After Endovascular Treatment for Ischemic Stroke. *Stroke* 51, 3215–3223 (2020).
84. Chamorro, Á. et al. Glucose Modifies the Effect of Endovascular Thrombectomy in Patients With Acute Stroke. *Stroke* 50, 690–696 (2019).
85. Wang, Y. et al. Blood glucose level affects prognosis of patients who received intravenous thrombolysis after acute ischemic stroke? A meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14, 1120779 (2023).
86. Huang, Z. X. et al. Admission Glucose Levels May Increase the Risk for Early Neurological Deterioration in Females With Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol* 11, (2020).
87. Gordon, W. R. et al. Association of Blood Glucose and Clinical Outcome after Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. *Interv Neurol* 7, 182 (2018).
88. Yao, M. et al. Elevated Fasting Blood Glucose Is Predictive of Poor Outcome in Non-Diabetic Stroke Patients: A Sub-Group Analysis of SMART. *PLoS One* 11, (2016).
89. Liu, L. et al. Metabolic syndrome and the short-term prognosis of acute ischemic stroke: A hospital-based retrospective study. *Lipids Health Dis* 14, 1–9 (2015).
90. Wang, L. et al. Impact of Relative Blood Glucose Changes on Mortality Risk of Patient with Acute Ischemic Stroke and Treated with Mechanical Thrombectomy. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 28, 213–219 (2019).
91. Hou, D., Zhong, P., Ye, X. & Wu, D. Persistent hyperglycemia is a useful glycemic pattern to predict stroke mortality: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol* 21, 487 (2021).
92. Saxena, A. et al. Prognostic Significance of Hyperglycemia in Acute Intracerebral Hemorrhage: The INTERACT2 Study. *Stroke* 47, 682–688 (2016).
93. Rhein, S. et al. Glyoxal in hyperglycaemic ischemic stroke - a cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 22, (2023).
94. Hu, G. C. et al. Relationship of initial glucose level and all-cause death in patients with ischaemic stroke: the roles of diabetes mellitus and glycated hemoglobin level. *Eur J Neurol* 19, 884–891 (2012).
95. Egi, M. et al. Blood glucose concentration and outcome of critical illness: the impact of diabetes. *Crit Care Med* 36, 2249–2255 (2008).
96. Capes, S. E., Hunt, D., Malmberg, K., Pathak, P. & Gerstein, H. C. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 32, 2426–2432 (2001).

97. Roberts, G. W. et al. Relative Hyperglycemia, a Marker of Critical Illness: Introducing the Stress Hyperglycemia Ratio. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 4490–4497 (2015).
98. Kruyt, N. D., Biessels, G. J., Devries, J. H. & Roos, Y. B. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: pathophysiology and clinical management. *Nat Rev Neurol* 6, 145–155 (2010).
99. Song, E. C. et al. Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 34, 2215–2220 (2003).
100. Bharosay, A. et al. Effect of Lipid Profile Upon Prognosis in Ischemic and Haemorrhagic Cerebrovascular Stroke. *Indian J Clin Bioche* 29, 372 (2014).
101. Shridharan, P., Nair, R., Gorthi, S. P., Prakashini, K. & Chatterjee, A. Effects of Serum Cholesterol on Severity of Stroke and Dosage of Statins on Functional Outcome in Acute Ischemic Stroke. *Neurol India* 71, 923–927 (2023).
102. Yi, S. W., Shin, D. H., Kim, H., Yi, J. J. & Ohrr, H. Total cholesterol and stroke mortality in middle-aged and elderly adults: A prospective cohort study. *Atherosclerosis* 270, 211–217 (2018).
103. Karagiannis, A. et al. Serum Uric Acid as an Independent Predictor of Early Death After Acute Stroke. *Circulation J* 71, 1120–1127 (2007).
104. Zhou, P. et al. Association of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol with Stroke Risk, Severity and Prognosis. *J Atheroscler Thromb* 27, 1310 (2020).
105. Xing, Y. et al. Low Density Lipoprotein Cholesterol and the Outcome of Acute Ischemic Stroke: Results of a Large Hospital-Based Study. *Eur Neurol* 76, 195–201 (2016).
106. Tziomalos, K. et al. Prognostic significance of major lipids in patients with acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 32, 395–400 (2017).
107. Xu, Q. et al. Low-Density Lipoprotein Cholesterol to Triglyceride Ratio and Clinical Outcomes after Acute Ischaemic Stroke or Transient Ischaemic Attack. *J Atheroscler Thromb* (2024) doi:10.5551/JAT.64704.
108. Deng, Q. W. et al. Triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts worse outcomes after acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 24, 283–291 (2017).
109. Niu, L. et al. Total cholesterol affects the outcome of patients with anterior cerebral artery-occluded acute ischemic stroke treated with thrombolysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24, 1504–1514 (2020).
110. Zhang, B. et al. Triglyceride-Glucose Index Linked to Hospital Mortality in Critically Ill Stroke: An Observational Multicentre Study on eICU Database. *Front Med (Lausanne)* 7, (2020).
111. Liu, L. et al. Association of LDL-C/HDL-C Ratio With Stroke Outcomes Within 1 Year After Onset: A Hospital-Based Follow-Up Study. *Front Neurol* 11, (2020).

112. Shen, H. et al. Serum lipid profiles and post-stroke depression in acute ischemic stroke patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15, 1573 (2019).
113. Yang, N. et al. Low level of low-density lipoprotein cholesterol is related with increased hemorrhagic transformation after acute ischemic cerebral infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2016).
114. Park, J. H., Lee, J. & Ovbiagele, B. Non-traditional Serum Lipid Variables and Recurrent Stroke Risk. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45, 3269 (2014).
115. Tan, C. et al. Statin, cholesterol, and sICH after acute ischemic stroke: systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci* 40, 2267–2275 (2019).
116. Wang, A. et al. Association of oxidized low-density lipoprotein with prognosis of stroke and stroke subtypes. *Stroke* 48, 91–97 (2017).
117. Cai, W. et al. Association between triglyceride-glucose index and all-cause mortality in critically ill patients with ischemic stroke: analysis of the MIMIC-IV database. *Cardiovasc Diabetol* 22, (2023).
118. Hou, Z. et al. An Analysis of the Potential Relationship of Triglyceride Glucose and Body Mass Index With Stroke Prognosis. *Front Neurol* 12, 630140 (2021).
119. Lin, S. F. et al. Triglyceride-Glucose Index and Intravenous Thrombolysis Outcomes for Acute Ischemic Stroke: A Multicenter Prospective–Cohort Study. *Front Neurol* 13, (2022).
120. Zhou, Y. et al. Triglyceride Glucose Index and Prognosis of Patients With Ischemic Stroke. *Front Neurol* 11, (2020).
121. Nam, K. W., Kwon, H. M. & Lee, Y. S. High triglyceride-glucose index is associated with early recurrent ischemic lesion in acute ischemic stroke. *Sci Rep* 2021 11:1 11, 1–8 (2021).
122. Miao, M. et al. Triglyceride-glucose index and short-term functional outcome and in-hospital mortality in patients with ischemic stroke. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 33, 399–407 (2023).
123. Nayak, S. S. et al. Diagnostic and prognostic value of triglyceride glucose index: a comprehensive evaluation of meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol* 23, (2024).
124. Hong, X. W. et al. Lipoprotein (a) as a Predictor of Early Stroke Recurrence in Acute Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 55, 718–726 (2018).
125. Zhang, W. & Zhang, X. A. Prognostic value of serum lipoprotein(a) levels in patients with acute ischemic stroke. *Neuroreport* 25, 262–266 (2014).
126. Zhong, C. et al. Plasma Homocysteine and Prognosis of Acute Ischemic Stroke: a Gender-Specific Analysis From CATIS Randomized Clinical Trial. *Mol Neurobiol* 54, 2022–2030 (2017).

127. Zhong, C. et al. High homocysteine and blood pressure related to poor outcome of acute ischemia stroke in Chinese population. *PLoS One* 9, (2014).
128. Kwon, H. M., Lee, Y. S., Bae, H. J. & Kang, D. W. Homocysteine as a predictor of early neurological deterioration in acute ischemic stroke. *Stroke* 45, 871–873 (2014).
129. Huang, S., Cai, J. & Tian, Y. The Prognostic Value of Homocysteine in Acute Ischemic Stroke Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Syst Neurosci* 14, 600582 (2021).
130. Ji, Y. et al. Prognostic Significance of Homocysteine Levels in Acute Ischemic Stroke: A Prospective Cohort Study. *Curr Neurovasc Res* 12, 334–340 (2015).
131. Shi, Z. et al. Changes in total homocysteine levels after acute stroke and recurrence of stroke. *Sci Rep* 8, (2018).
132. Shi, Z. et al. Elevated Total Homocysteine Levels in Acute Ischemic Stroke Are Associated With Long-Term Mortality. *Stroke* 46, 2419–2425 (2015).
133. Markišić, M., Pavlović, A. M. & Pavlović, D. M. The Impact of Homocysteine, Vitamin B12, and Vitamin D Levels on Functional Outcome after First-Ever Ischaemic Stroke. *Biomed Res Int* 2017, (2017).
134. Jiang, B. et al. Effects of differences in serum total homocysteine, folate, and vitamin B12 on cognitive impairment in stroke patients. *BMC Neurol* 14, (2014).
135. Zhang, P., Xie, X. & Zhang, Y. Associations between homocysteine, vitamin B12, and folate and the risk of all-cause mortality in American adults with stroke. *Front Nutr* 10, (2023).
136. Ye, Z. et al. Prognostic Value of C-Reactive Protein and Homocysteine in Large-Artery Atherosclerotic Stroke: a Prospective Observational Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26, 618–626 (2017).
137. Jaiswal, V. et al. Association between baseline high-sensitive C-reactive protein, homocysteine levels, and post-stroke depression among stroke patients: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Curr Probl Cardiol* 49, 102338 (2024).
138. Cheng, L. S., Tu, W. J., Shen, Y., Zhang, L. J. & Ji, K. Combination of High-Sensitivity C-Reactive Protein and Homocysteine Predicts the Post-Stroke Depression in Patients with Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 55, 2952–2958 (2018).
139. Bayir, A. The Effects of Vitamin B12 and Folic Acid Deficiencies on Stroke, and Vitamin B12 and Folic Acid Supplements. *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults* 335–340 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-418680-4.00032-4.
140. Zhou, L., Song, X., Wang, J., Tan, Y. & Yang, Q. Effects of vitamin B12 deficiency on risk and outcome of ischemic stroke. *Clin Biochem* 118, 110591 (2023).

141. Markišić, M., Pavlović, A. M. & Pavlović, D. M. The Impact of Homocysteine, Vitamin B12, and Vitamin D Levels on Functional Outcome after First-Ever Ischaemic Stroke. *Biomed Res Int* 2017, (2017).
142. Kanamaru, T. et al. Albuminuria predicts early neurological deterioration in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 372, 417–420 (2017).
143. Yahalom, G. et al. Chronic kidney disease and clinical outcome in patients with acute stroke. *Stroke* 40, 1296–1303 (2009).
144. Hojs Fabjan, T., Penko, M. & Hojs, R. Cystatin C, creatinine, estimated glomerular filtration, and long-term mortality in stroke patients. *Ren Fail* 36, 81–86 (2014).
145. Ahmed, M. et al. Serum Creatinine as Predictor Of Outcome in Hospitalized Patients After Acute Stroke. *J Dhaka Med Coll* 30, 16–23 (2021).
146. Yang, Y. et al. U-Shaped relationship between functional outcome and serum uric acid in ischemic stroke. *Cell Physiol and Biochem* 47, 2369–2379 (2018).
147. Liu, C. Y. et al. J-Shaped Relationship of Serum Uric Acid with Unfavorable Short-Term Outcomes among Patients with Acute Ischemic Stroke. *Biomedicines* 10, (2022).
148. Chamorro, Á. et al. Prognostic Significance of Uric Acid Serum Concentration in Patients With Acute Ischemic Stroke. <http://ahajournals.org> (2002).
149. Chiquete, E. et al. Serum uric acid and outcome after acute ischemic stroke: Premier study. *Cerebrovasc Dis* 35, 168–174 (2013).
150. Wang, Y. et al. Decreased uric acid levels correlate with poor outcomes in acute ischemic stroke patients, but not in cerebral hemorrhage patients. *Journal of Stroke and Cerebrovasc Dis* 23, 469–475 (2014).
151. Wu, S., Pan, Y., Zhang, N., Jun, W. Y. & Wang, C. Lower serum uric acid level strongly predict short-term poor functional outcome in acute stroke with normoglycaemia: A cohort study in China. *BMC Neurol* 17, (2017).
152. Brouns, R. et al. Decrease in uric acid in acute ischemic stroke correlates with stroke severity, evolution and outcome. *Clin Chem Lab Med* 48, 383–390 (2010).
153. Lee, S. H. et al. Effects of uric acid levels on outcome in severe ischemic stroke patients treated with intravenous recombinant tissue plasminogen activator. *Eur Neurol* 71, 132–139 (2014).
154. Duan, H., Geng, X. & Ding, Y. Hepatic responses following acute ischemic stroke: A clinical research update. *Brain Circ* 9, 57 (2023).
155. Inderhees, J. & Schwaninger, M. Liver Metabolism in Ischemic Stroke. *Neuroscience* 550, 62–68 (2024).

156. Wang, Y. Y. et al. Activation of hepatic inflammatory pathways by catecholamines is associated with hepatic insulin resistance in male ischemic stroke rats. *Endocrinology* 155, 1235–1246 (2014).
157. Ahmadabad, M. A. et al. Evaluation of De Ritis (AST/ALT), ALP/ALT, and AST/ALP ratios as prognostic factors in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurol* 22, (2022).
158. Akinci, E., Doğan, N. Ö., Gümüş, H. & Akilli, N. B. Can we use serum gamma-glutamyl transferase levels to predict early mortality in stroke? *Pak J Med Sci* 30, (2014).
159. Li, S. et al. Elevated gamma-glutamyl transferase levels are associated with stroke recurrence after acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *CNS Neurosci Ther* 28, 1637–1647 (2022).
160. Tu, W. J. et al. γ -Glutamyl Transferase as a Risk Factor for All-Cause or Cardiovascular Disease Mortality Among 5912 Ischemic Stroke. *Stroke* 48, 2888–2891 (2017).
161. Xie, J. et al. Liver function parameters aspartate aminotransferase and total protein predict functional outcome in stroke patients with non-cardioembolism. *Front Nutr* 9, (2022).
162. Gao, F. et al. De Ritis ratio (AST/ALT) as an independent predictor of poor outcome in patients with acute ischemic stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1551 (2017).
163. Tan, G. et al. Subclinical change of liver function could also provide a clue on prognosis for patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Neurol Sci* 37, 1693–1700 (2016).
164. Zhao, K. et al. Association between bilirubin levels with incidence and prognosis of stroke: A meta-analysis. *Front Neurosci* 17, 1122235 (2023).
165. Wang, Y. et al. Association of serum neuron-specific enolase and bilirubin levels with cerebral dysfunction and prognosis in large-artery atherosclerotic strokes. *J Cell Biochem* 119, 9685–9693 (2018).
166. Ouyang, Q. et al. Serum bilirubin levels are associated with poor functional outcomes in patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *BMC Neurol* 21, 195–202 (2021).
167. Peng, Q. et al. Predictive value of different bilirubin subtypes for clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke receiving thrombolysis therapy. *CNS Neurosci Ther* 28, 226 (2022).
168. Fu, K., Garvan, C. S., Heaton, S. C., Nagaraja, N. & Doré, S. Association of serum bilirubin with the severity and outcomes of intracerebral hemorrhages. *Antioxidants* 10, (2021).

169. Sheng, X., Du, H. & Tang, Y. Decreased Serum Total Bilirubin Level Predicts Early Neurological Deterioration in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat* 17, 1977 (2021).
170. Fan, Y., Jiang, M., Gong, D., Man, C. & Chen, Y. Cardiac troponin for predicting all-cause mortality in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Biosci Rep* 38, 20171178 (2018).
171. Raza, F., Alkhouli, M., Sandhu, P., Bhatt, R. & Bove, A. A. Elevated Cardiac Troponin in Acute Stroke without Acute Coronary Syndrome Predicts Long-Term Adverse Cardiovascular Outcomes. *Stroke Res Treat* 2014, (2014).
172. Su, Y. C., Huang, K. F., Yang, F. Y. & Lin, S. K. Elevation of troponin I in acute ischemic stroke. *Peer J* 4, (2016).
173. Jauch, E. C. et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44, 870–947 (2013).
174. Peddada, K. et al. Ischemic Stroke with Troponin Elevation: Patient Characteristics, Resource Utilization, and In-Hospital Outcomes. *Cerebrovasc Dis* 42, 213–223 (2016).
175. Batal, O. et al. The prognostic significance of troponin I elevation in acute ischemic stroke. *J Crit Care* 31, 41–47 (2016).
176. Lasek-Bal, A. et al. The significance of troponin elevation for the clinical course and outcome of first-ever ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 38, 212–218 (2014).
177. Wrigley, P. et al. Prevalence of Positive Troponin and Echocardiogram Findings and Association With Mortality in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 48, 1226–1232 (2017).
178. Faiz, K. W., Thommessen, B., Einvik, G., Omland, T. & Rønning, O. M. Prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin T in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23, 241–248 (2014).
179. Rosso, M. et al. Rising Cardiac Troponin: A Prognostic Biomarker for Mortality After Acute Ischemic Stroke. *J Am Heart Assoc* 13, 32922 (2024).
180. Chaudhuri, J. R., Sharma, V. K., Mridula, K. R., Balaraju, B. & Bandaru, V. C. S. S. Association of plasma brain natriuretic peptide levels in acute ischemic stroke subtypes and outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24, 485–491 (2015).
181. Stanescu, I. & Dogaru, G. Brain Natriuretic Peptide (BNP): Biomarker for risk stratification and functional recovery prediction in Ischemic Stroke. *Balneo Res J* 6, 40–44 (2015).
182. Fukuhara, K., Ogata, T., Takeshita, S. & Tsuboi, Y. Serum B-type natriuretic peptide level and timing of its measurement as a predictor of acute ischemic stroke outcome. *eNeurologicalSci* 18, 100217 (2020).

183. Cao, R. et al. Collateral Circulation and BNP in Predicting Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients with Atherosclerotic versus Cardioembolic Cerebral Large-Vessel Occlusion Who Underwent Endovascular Treatment. *Brain Sci* 13, (2023).
184. Gupta, H. V. et al. Can Admission BNP Level Predict Outcome After Intravenous Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke? *Neurologist* 24, 6–9 (2019).
185. Maruyama, K. et al. Brain Natriuretic Peptide Is a Powerful Predictor of Outcome in Stroke Patients with Atrial Fibrillation. *Cerebrovasc Dis Extra* 7, 35–43 (2017).
186. Chang, X. et al. Cardiac biomarkers are associated with increased risks of adverse clinical outcomes after ischemic stroke. *J Neurol.* 271, 6313-6324(2024).
187. Rodríguez-Castro, E. et al. NT-pro-BNP: A novel predictor of stroke risk after transient ischemic attack. *Int J Cardiol* 298, 93–97 (2020).
188. Nam, K. W., Kwon, H. M. & Lee, Y. S. Clinical significance of D-dimer levels during acute period in ischemic stroke. *Thromb J* 21, (2023).
189. Hou, H. et al. Association of level and increase in d-dimer with all-cause death and poor functional outcome after ischemic stroke or transient ischemic attack. *J Am Heart Assoc* 10, 1–10 (2021).
190. Zhang, P., Wang, C., Wu, J. & Zhang, S. A Systematic Review of the Predictive Value of Plasma D-Dimer Levels for Predicting Stroke Outcome. *Front Neurol* 12, 693524 (2021).
191. Yao, T. et al. Elevated plasma D-dimer levels are associated with short-term poor outcome in patients with acute ischemic stroke: a prospective, observational study. *BMC Neurol* 19, (2019).
192. Hsu, P. J. et al. High Plasma D-Dimer Indicates Unfavorable Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients Receiving Intravenous Thrombolysis. *Cerebrovasc Dis* 42, 117–121 (2016).
193. Wang, J. et al. D-dimer and its Combination with Blood Lipid on Prognosis of Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29, (2020).
194. Kim, T. W., Song, I. U. & Chung, S. W. Prognostic Value of Serum D-Dimer in Noncardioembolic Ischemic Stroke. *Can J Neurol Sci* 44, 404–409 (2017).
195. Elkind, M. S. V. et al. C-reactive protein as a prognostic marker after lacunar stroke: levels of inflammatory markers in the treatment of stroke study. *Stroke* 45, 707–716 (2014).
196. Yu, H. et al. High-sensitivity C-reactive protein in stroke patients – The importance in consideration of influence of multiple factors in the predictability for disease severity and death. *J Clin Neurosci* 36, 12–19 (2017).
197. Dziedzic, T. Clinical significance of acute phase reaction in stroke patients. *Front Biosci* 13, 2922–2927 (2008).

198. Wang, L., Li, Y., Wang, C., Guo, W. & Liu, M. C-reactive Protein, Infection, and Outcome After Acute Ischemic Stroke: A Registry and Systematic Review. *Curr Neurovasc Res* 16, 405–415 (2019).
199. Wang, S., Song, X., Wang, Y., Gao, Y. & Wu, J. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels predict poor outcomes among patients with acute cardioembolic stroke. *Ann Palliat Med* 10, 2907–2916 (2021).
200. Hu, Z. et al. Can baseline C-reactive protein level predict functional outcome in acute ischaemic stroke? A meta-analysis. *Biomarkers* 25, 525–532 (2020).
201. Vangilder, R. L. et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *J Clin Neurosci* 21, 547–553 (2014).
202. Yu, B., Yang, P., Xu, X. & Shao, L. C-reactive protein for predicting all-cause mortality in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Biosci Rep* 39, 20181135 (2019).
203. Zonoozi, A. K. et al. Interleukin-6 levels predicts mortality after stroke: a systematic review and meta-analysis – *Farmacia Journal* 69, 4 (2021).
204. Li, J. et al. Interleukin-6 and YKL-40 predicted recurrent stroke after ischemic stroke or TIA: analysis of 6 inflammation biomarkers in a prospective cohort study. *J Neuroinflammation* 19, (2022).
205. Hotter, B. et al. IL-6 Plasma Levels Correlate With Cerebral Perfusion Deficits and Infarct Sizes in Stroke Patients Without Associated Infections. *Front Neurol* 10, (2019).
206. Dieplinger, B. et al. Prognostic Value of Inflammatory and Cardiovascular Biomarkers for Prediction of 90-Day All-Cause Mortality after Acute Ischemic Stroke-Results from the Linz Stroke Unit Study. *Clin Chem* 63, 1101–1109 (2017).
207. Yang, G. et al. A combination of serum iron, ferritin and transferrin predicts outcome in patients with intracerebral hemorrhage. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–10 (2016).
208. Kumar Koul, R. et al. Role of Serum Ferritin in Determining the Severity and Prognosis of Stroke: A Hospital Based Study. 142 142 *Int J Sci Study* (2018) doi:10.17354/ijss/2018/315.
209. Narayan, M. & Kumar Singh, S. Study of Association between Serum Ferritin And Prognosis Of Patients In Acute Ischemic And Haemorrhagic Stroke. *IOSR-JDMS e-ISSN* 17, 46–56 (2018).
210. Singh, S. C. & Khatua, B. C. A Prospective Study to Determine Serum Ferritin as a Biomarker for Prognosis of Patients with Acute Hemorrhagic Stroke. *IOSR-JDMS e-ISSN* 20, 49–59 (2021).
211. Zhang, M., Li, W., Wang, T. & Zhang, Q. Association Between Baseline Serum Ferritin and Short-term Outcome of Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 28, 1799–1805 (2019).

212. Najmi, E., Bahbah, E. I., Negida, A., Afifi, A. M. & Baratloo, A. Diagnostic Value of Serum Neuron-Specific Enolase Level in Patients With Acute Ischemic Stroke; A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int Clin Neurosci J* 6, 36–41 (2019).
213. Mochetti, M. M. et al. Neuron-specific enolase at admission as a predictor for stroke volume, severity and outcome in ischemic stroke patients: a prognostic biomarker review. *Sci Rep* 14, (2024).
214. Lu, K. et al. Serum neuron specific enolase level as a predictor of prognosis in acute ischemic stroke patients after intravenous thrombolysis. *J Neurol Sci* 359, 202–206 (2015).
215. Kumar M, V. S. & Kavalikai, S. A Study on Acute Ischaemic Stroke With Neuron-Specific Enolase as Potential Biomarker and the Severity and Outcome of Disease: A Hospital Based Study. *EJMCM* 9, 4 (2022).
216. Freitas, T. E. et al. Neuron-specific enolase as a prognostic biomarker in acute ischemic stroke patients treated with reperfusion therapies. *Front Neurol* 15, 1408111 (2024).
217. Luger, S. et al. Role of S100B Serum Concentration as a Surrogate Outcome Parameter After Mechanical Thrombectomy. *Neurology* 97, E2185–E2194 (2021).
218. Honegger, T. et al. Serum S-100B adds incremental value for the prediction of symptomatic intracranial hemorrhage and brain edema after acute ischemic stroke. *Eur Stroke J* 8, 309–319 (2023).
219. Mojtavavi, H., Shaka, Z., Momtazmanesh, S., Ajdari, A. & Rezaei, N. Circulating brain-derived neurotrophic factor as a potential biomarker in stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Transl Med* 20, 126 (2022).
220. Satar, S. et al. S-100B levels in stroke patients: Is it useful for showing short-term mortality? *Neurosurg Q* 24, 87–90 (2014).
221. Haupt, W. F., Chopan, G., Sobesky, J., Liu, W. C. & Dohmen, C. Prognostic value of somatosensory evoked potentials, neuron-specific enolase, and S100 for short-term outcome in ischemic stroke. *J Neurophysiol* 115, 1273–1278 (2016).
222. Qiao, H. J. et al. Association of lower serum Brain-derived neurotrophic factor levels with larger infarct volumes in acute ischemic stroke. *J Neuroimmunol* 307, 69–73 (2017).
223. Stanne, T. M. et al. Low Circulating Acute Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated With Poor Long-Term Functional Outcome After Ischemic Stroke. *Stroke* 47, 1943–1945 (2016).
224. Lasek-Bal, A. et al. Low Concentration of BDNF in the Acute Phase of Ischemic Stroke as a Factor in Poor Prognosis in Terms of Functional Status of Patients. *Med Sci Monit* 21, 3900–3905 (2015).

225. Xu, H. B. et al. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor May Indicate the Development of Poststroke Depression in Patients with Acute Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 27, 709–715 (2018).
226. Zhang, J. et al. Atorvastatin treatment is associated with increased BDNF level and improved functional recovery after atherothrombotic stroke. *Int J Neurosci* 127, 92–97 (2017).



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

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

Trabalho realizado sob a orientação de:

Dra. Sofia Botelho Moniz

Unilabs Porto Central

Raquel Pinto

2024

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO
DE QUALQUER PARTE DESTE RELATÓRIO DE ESTÁGIO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Sofia Botelho Moniz pela orientação e aos restantes colaboradores da Unilabs pela disponibilidade e apoio durante o estágio no laboratório e na realização deste relatório.

Agradeço também aos colegas do mestrado pelo suporte sempre presente durante o curso, e à família e amigos por me acompanharem e apoiarem nesta etapa tão importante.

RESUMO

Este relatório documenta as atividades do estágio profissional do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. O estágio decorreu no Laboratório Central de Análises Clínicas do Porto da Unilabs (Unilabs Porto Central), iniciou-se a 2 de janeiro e finalizou a 15 de março de 2024, com uma duração de 450 horas.

O estágio e o presente relatório têm como objetivos a execução e validação de técnicas laboratoriais num contexto de um laboratório de análises clínicas, a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos, a integração no meio profissional e a elaboração de um relatório de atividades.

No decorrer do estágio, houve passagem pelas diferentes valências de um laboratório de análises clínicas, incluindo a fase pré-analítica, a fase analítica na área da Bioquímica, Imunologia, Imunohematoterapia, Hematologia e Microbiologia e, em menor grau, a fase pós-analítica com a validação de resultados.

Em todos os setores do laboratório foi possível visualizar e/ou aplicar os princípios básicos dos métodos analíticos de vários analisadores e também processos da rotina laboratorial, incluindo a manutenção dos analisadores e a programação de controlos, calibradores e amostras. Foi também possível evidenciar o papel fundamental das análises clínicas na prevenção, diagnóstico e monitorização de doença.

Neste relatório são descritas análises, métodos e instrumentos analíticos usados nos diversos setores durante o estágio, com um maior foco nas análises bioquímicas e de bacteriologia, e também as atividades realizadas como estagiária no laboratório.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Bioquímica; Microbiologia; Hematologia; Imunologia.

ABSTRACT

This report documents the activities carried out in the professional internship for the master's degree in Clinical Analysis at Faculdade de Farmácia of Universidade do Porto. The internship took place at Unilabs Porto Central, starting on January 2nd and ending on March 15th, 2024, with the duration of 450 hours.

The purpose of this internship is to apply and validate laboratory techniques in the context of a clinical laboratory, consolidate the theoretical knowledge acquired during the degree's first year, integration in a professional environment and the elaboration of an activity report.

During the internship, I achieved experience on the different areas of a clinical laboratory, including the pre-analytical phase, the analytical phase in Biochemistry, Immunology, Immunohematotherapy, Hematology and Microbiology and, to a lesser extent, the post-analytical phase with result validation.

It was possible to see and apply the basic principles of the analytical methods of various analyzers and laboratory routine processes in all the laboratory sectors, including the maintenance of analyzers and programming of controls, calibrators, and samples. It was also possible to highlight the role of clinical laboratory tests in the prevention, diagnosis, and monitoring of disease.

In this report, the laboratory tests, methods, and analytical instruments present in the different sectors are described, with a bigger focus on the Biochemistry and Microbiology, it also focuses more in the activities carried out by me as an intern in the laboratory.

Keywords: Clinical Analysis; Biochemistry; Microbiology; Hematology; Immunology.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	1
2. CONTROLO DE QUALIDADE	1
3. PRÉ-ANALÍTICA	2
3.1. TRIAGEM SORO, PLASMA E SANGUE TOTAL	3
3.2. TRIAGEM URINAS E FEZES	3
4. HEMATOLOGIA	4
4.1. HEMOGRAMA	5
4.1.1. XN Series	6
1. Citometria de fluxo	6
2. Impedância Eletroquímica	6
3. SLS-hemoglobina	6
a. Espetrofotometria	7
4.2. ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS	7
4.3. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	8
4.4. HEMOGLOBINA GLICADA	8
1. Cromatografia	8
4.5. ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA	9
1. Eletroforese Capilar	9
5. BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA	10
5.1. SETOR CORE	10
5.1.1. Aptio Automation	11
5.1.2. Atellica® CH 930 Analyzer	11

1. Turbidimetria.....	14
2. Potenciometria.....	14
5.1.3. Atellica® IM 1600 Analyzer	15
1. Imunoensaios de quimiluminescência	18
5.1.4. CAPILLARYS 2 Flex Piercing.....	19
5.1.5. IMMULITE 2000	19
5.1.6. VIDAS®	20
1. <i>Enzyme-linked fluorescence assay (ELFA)</i>	21
5.1.7. Cobas® e411	21
1. Eletroquimiluminescência	23
5.1.8. RAPIDpoint 500	23
5.1.9. Gonotec® Osmomat 3000.....	24
5.1.10. PROVAS DE COAGULAÇÃO	24
5.2. SETOR DE ANÁLISES ESPECIAIS	25
5.2.1. IMUNOENSAIOS	26
5.2.2. ELISA.....	27
5.2.3. IMUNOFIXAÇÃO	27
5.2.4. Siemens BN Prospec®	28
1. Nefelometria	29
5.2.5. PlasmaQuant MS.....	29
1. Espetrometria de Massa	30
5.2.6. HPLC	30
5.2.7. ZENIT Pro.....	32
5.2.8. ImmunoCAP250.....	33
5.2.9. EUROBlotOne.....	35
1. Immunoblot.....	36
5.2.10. ALERGOLOGIA	36
5.2.11. RASTREIO PRÉ-NATAL.....	36
6. IMUNOHEMOTERAPIA	37
6.1. GRUPOS SANGUÍNEOS.....	38

6.2. PROVA DE COOMBS	39
6.3. TRANSFUSÕES	39
7. MICROBIOLOGIA.....	39
7.1. EXAME CULTURAL.....	40
7.2. IDENTIFICAÇÃO	41
7.2.1. Coloração de Gram e Coloração de Ziehl-Neelsen	41
7.2.2. MALDI-TOF.....	41
7.3. ANTIBIOGRAMA	42
7.4. INFECÇÕES BACTERIOLÓGICAS E MEIOS DE CULTURA.....	42
7.4.1. Infecções do trato urinário.....	42
7.4.2. Infecções do trato respiratório inferior.....	43
7.4.3. Infecções do trato respiratório superior.....	44
7.4.4. Infecções gastrointestinais.....	45
7.4.5. Infecções genitais	45
7.4.6. Outros produtos	46
8. URINA TIPO II	47
8.1. ANÁLISE QUÍMICA DA URINA	47
8.2. EXAME DO SEDIMENTO URINÁRIO.....	49
1. Células	49
2. Cilindros	50
3. Cristais	51
9. CONCLUSÕES	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Padrão de imunoglobulinas monoclonais (IgG) em imunofixação de proteínas do soro	28
Figura 2 - Células que podem ser observadas no sedimento urinário.....	49
Figura 3 - Diferentes cilindros que podem ser observados na urina	50
Figura 4 - Cristais encontrados em urina normal, de pH ácido	51
Figura 5 - Cristais encontrados em urina normal, pH alcalino	52
Figura 6 - Cristais encontrados em urina anormal, de pH ácido.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros eritrocitários presentes no hemograma com respectiva definição, valor de referência e interpretação clínica	5
Tabela 2 - Parâmetros leucocitários e plaquetários presentes no hemograma, valores de referência e interpretação clínica.....	6
Tabela 3 - Valores de referência e interpretação clínica da Velocidade de sedimentação	8
Tabela 4 - Valores de referência e interpretação clínica da hemoglobina glicada	8
Tabela 5 - Valores de referência da concentração das principais variantes de hemoglobinas.....	9
Tabela 6 - Interpretação clínica da presença de variantes de hemoglobinas patológicas	10
Tabela 7 - Análises de bioquímica clínica realizadas no aparelho Atellica® CH Analyzer, qual o método utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica	12
Tabela 8 - Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho Atellica® IM Analyzer, qual o método utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica	15
Tabela 9 - Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho IMMULITE 2000, valores de referência no adulto e importância clínica	19
Tabela 10 - Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas nos aparelhos VIDAS® e VIDAS®3 e importância clínica destes	21
Tabela 11 - Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho Cobas® e 411, princípio do teste utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica....	22
Tabela 12 - Análises de bioquímica clínica realizadas no aparelho RAPIDpoint 500, princípio do método utilizado, valores de referência em adultos e importância clínica destes	23
Tabela 13 - Provas de coagulação realizadas no aparelho Sysmex CS-5100, princípio do método utilizado, valores de referência em adultos e importância clínica.....	24
Tabela 14 - Análises realizadas nos instrumentos IDS-iSYS e MAGLUMI X3, valores de referência em adultos e importância clínica destas	26
Tabela 15 - ELISA realizadas nos instrumentos TRITURUS®, EUROIMMUN Analyzer I-2P, e DYNEX DS2® e sua importância clínica	27

Tabela 16 - Parâmetros analisados por nefelometria no instrumento BN Prospec®, valores de referência em adultos e importância clínica destes	28
Tabela 17 - Analitos estudados em cada um dos sistemas de HPLC, qual a amostra a analisar para cada, valores de referência em adultos e importância clínica	31
Tabela 18 - Analitos estudados no Waters™ ACQUITY, valores de referência em adultos e importância clínica.....	32
Tabela 19 - Padrão observado de imunofluorescência indireta e qual os antígenos e doenças associados a cada padrão. Adaptado de Nosal et al. (2022).....	32
Tabela 20 - Anticorpos estudados por IFI e doenças associadas.....	33
Tabela 21 - Antígenos para procura de autoanticorpos no instrumento Phadia™ ImmunoCAP® 250 e importância clínica destes.....	34
Tabela 22 - Perfis estudados por imunoblot, os autoanticorpos ou anticorpos de intolerância que cada deteta e importância clínica de cada.....	37
Tabela 23 - Testes bioquímicos do rastreio pré-natal, trimestre em que são realizados, instrumento utilizado na análise e importância clínica	36
Tabela 24 - Antígenos presentes na superfície dos eritrócitos e anticorpos presentes no plasma de cada grupo dos sistemas ABO e Rh	38
Tabela 25 - Principais bactérias responsáveis por infeções do trato urinário e as suas características microscópicas (coloração de Gram) e macroscópicas (aparência em meio CLED)	43
Tabela 26 - Produtos biológicos analisados para estudar infeções do trato respiratório inferior e respetivos métodos de exame direto e meios de cultura, quais os locais afetados pela infeção e principais bactérias responsáveis por essa	44
Tabela 27 - Produtos biológicos analisados para estudar infeções do trato respiratório superior e respetivos métodos de exame direto e meios de cultura, quais os locais afetados pela infeção e principais bactérias responsáveis por essa	44
Tabela 28 - Produtos biológicos analisados para estudar infeções genitais e respetivos métodos de exame direto e meios de cultura	46
Tabela 29 - Diferentes produtos biológicos analisados na microbiologia e respetivos métodos de exame direto e meios de cultura	46

Tabela 30 - Parâmetros avaliados nas tiras de reagentes, princípio da reação química que ocorre e a importância clínica dos resultados	47
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-HIAA – Ácido 5-hidroxi indol acético;

AAG - α 1-glicoproteína ácida;

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica;

AEQ - Avaliação externa de qualidade;

AFP – Alfafetoproteína;

ALT – Alanina Aminotransferase;

AMH – Hormona anti-muleriana;

ASCA- Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*;

AST – Aspartato Aminotransferase;

aTPO – Antiperoxidase Tiroideia;

BNP – Peptídeo Natriurético do tipo B;

CA – Antígeno cancerígeno;

CA – Antígeno cancerígeno;

CCP - Anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico;

CDT - Transferrina deficiente em hidratos de carbono;

CEA – Antígeno carcinoembrionário;

CENP – anticorpos anti centrómeros;

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média;

CK – Creatina Quinase;

CK-MB – Creatinina quinase do miocárdio;

Cl⁻ - Cloro;

CLED - Cystine Lactose Elctrolyte Deficient

cPSA – Antígeno complexado específico da próstata;

CTD – doença do tecido conjuntivo;

CTX-1- Fragmento telopeptídeo C-terminal;

DFS70 – anticorpos *anti-Dense Fine Speckled*, peso molecular 70kDa;

DHEA - Desidroepiandrosterona;

DHEA-SO₄ – Dihidroepiandrosterona sulfato;

DHT - Dihidrotestosterona ;

dsDNA – DNA dupla cadeia;

EBV – VCA – Antígeno de capsídeo viral do vírus de Epstein-Barr;

EBV-EBNA – Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr;

ELFA - *Enzyme-linked fluorescence assay*;

EPO – Eritropoietina;

Fe – Ferro;

fPSA – Antígeno livre específico da próstata;

FSH – Hormona folículo-estimulante;

FT3 – Triiodotironina livre;

FT4 – Tiroxina livre;

GAD – Descarboxilase do ácido glutâmico;

GBM – Glioblastoma multiforme;

GGT – Gama-glutamil transferase;

Hb – Hemoglobina;

HbA1c - Hemoglobina glicada

HCG – Gonadotrofina coriônica humana;

hCG – Gonadotropina coriônica humana;

HDL - Lipoproteínas de alta densidade;

HE4 – Proteína epididimal humana 4;

hGH – Hormona de crescimento;

HGM – Hemoglobina Globular Média;

HPLC - *High-pressure liquid chromatography*;

HSV – Vírus Herpes simplex;

HTLV – vírus linfotrópico de células T humanas;

HVA - Ácido homovanílico e ácido;

IA2 – Tirosina fosfatase;

ICP-MS - *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*;

IFN-γ – Interferão gama;

IGFBP-3 – Proteína-3 de transporte IGF-I;

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1;

K⁺ - Potássio;

LCR – Líquido cefalorraquidiano;

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade;

LH – Hormona luteinizante;

Lp(a) – Lipoproteína A;

M2 – Anticorpos anti-mitocôndria 2;

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*;

Mg – Magnésio;

Mi-2 – Anticorpos anti-sintetase;

MPO – Anticorpos anti-mieloperoxidase;

MS - Espetrometria de massa;

Na⁺ - Sódio;

NSE – Enolase específica dos neurónios;

NT-proBNP- pro-hormona do peptídeo natriurético do tipo B;

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogénio 1;

PAP – Fosfatase ácida prostática;

PAPP-A - Proteína A do plasma associada à gravidez;

PCNA – Anticorpos anti-células proliferativas;

PCR – Proteína C reativa;

PIGF – Fator de crescimento placentário;

PR3 – Anticorpos anti-proteinase 3;

PSA – Antigénio específico da próstata;

PTH – Hormona paratiroideia intacta;

RDW – *Red Cell Distribution Width*;

Rib-P – Anticorpos anti-proteína P ribossomal;

RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*;

SCC – Antígeno do carcinoma das células escamosas;

SHBG – Globulina ligadora de hormonas sexuais;

SLS - Lauril-sulfato de sódio;

SMD – Síndrome mielodisplásica;

ssDNA – DNA cadeia simples;

sTfR - Recetor solúvel da transferrina;

T3 - Triiodotironina total;

T4 – Tiroxina total;

TBG – Globulina ligadora de tiroxina;

TSH – Hormona estimulante da tiroide;

TSH-R – Recetor da TSH;

uE3 - Estriol não conjugado;

UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*;

VGM – Volume Globular Médio;

VMA - Ácido vanilmandélico;

VR - Valores de referência;

VS - velocidade de sedimentação dos eritrócitos;

vWF - Fator de von Willenbrand.

1. INTRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

As análises clínicas desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde. Um laboratório de análises clínicas fornece aos médicos e outros profissionais de saúde informações que auxiliam na prevenção, diagnósticos e monitorização de doença.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas tem como principal objetivo proporcionar uma formação robusta e atual nos diversos setores e processos de um laboratório de análises clínicas, incluindo a execução e validação de técnicas laboratoriais num contexto profissional.

O estágio decorreu no Laboratório Central de Análises Clínicas da Unilabs no Porto (Unilabs Porto Central), tendo iniciado a 2 de janeiro de 2024 e terminado a 15 de março de 2024, com duração de 450 horas. O laboratório Unilabs Porto Central localiza-se na Zona Industrial do Porto e está dividido em vários setores: Pré-analítico, Core, Hematologia, Microbiologia e Imunohemoterapia no piso 0, e as Análises especiais no piso 2. Além destes setores, há também uma secção pós-analítica com a validação dos resultados por médicos. O laboratório possui serviço de urgência e encontra-se operacional 24 horas por dia, 7 dias por semana.

No contexto do meu estágio curricular houve passagem pelas diversas valências do laboratório de análises clínicas: Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Coagulação, Microbiologia, Imuno-hemoterapia e Análises especiais. Além da componente analítica, a componente pré-analítica (triagem) e de validação também estiveram presentes no estágio.

Nos diferentes setores do laboratório foi possível compreender e aplicar os princípios básicos dos métodos analíticos dos diferentes analisadores e executar processos da rotina laboratorial tal como a manutenção diária e semanal dos aparelhos, programação de controlos, calibradores e amostras.

2. CONTROLO DE QUALIDADE

Os testes laboratoriais em análises clínicas têm como objetivo avaliar a condição fisiopatológica de um paciente para auxiliar no diagnóstico, prevenção e monitorização de doença. A calibração e o controlo de qualidade são, portanto, dos processos mais importantes nos laboratórios clínicos e têm como objetivo garantir a precisão e exatidão dos resultados^{1,2}.

A calibração é necessária em todos os instrumentos analíticos presentes num laboratório. Os calibradores são materiais que contêm quantidades conhecidas do analito de interesse. Para um único ensaio, são necessários pelo menos dois calibradores: um sem o analito (branco) e um calibrador com a concentração superior de deteção do analito. Na maioria dos casos, procede-se a uma curva de calibração com vários pontos. Esta curva é a representação gráfica do sinal instrumental em função da concentração, obtém-se pela medição de vários calibradores e permite determinar a concentração das amostras^{1,2}.

Um controlo é definido como um material que contém o analito de interesse com uma concentração conhecida. Normalmente, controlos de valores baixos, médios e altos de um único analito são usados para avaliar a precisão do método. A maioria dos materiais de controlo comercialmente disponíveis devem ser reconstituídos seguindo as instruções do fabricante^{1,2}.

O gráfico de Levey-Jennings é a representação gráfica mais comumente usada para avaliar os resultados do controlo de qualidade. Este formato mostra cada resultado ao longo do tempo e permite avaliar o desempenho do método. O valor da média é o valor esperado e os limites do desvio padrão representam a imprecisão do método. São aplicadas as regras de Westgard para rejeitar ou aceitar uma corrida analítica^{1,2}.

A avaliação externa de qualidade (AEQ) avalia o desempenho analítico de um laboratório em comparação com outros que utilizam os mesmos métodos e instrumentos. A AEQ mede a exatidão de um laboratório. Os vários laboratórios participantes recebem uma amostra que processam como se fossem uma amostra de paciente; os resultados depois são devolvidos ao organizador da AEQ para análise estatística. Finalmente, cada laboratório recebe um relatório que compara o seu desempenho individual com os restantes laboratórios do programa^{1,2}. O laboratório Unilabs Porto Central é integrante de programas de AEQ internacionais como o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) e o UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

3. PRÉ-ANALÍTICA

O processo pré-analítico refere-se a todos os passos críticos que têm de ocorrer antes de uma amostra poder ser analisada. Estudos demonstram que 30-75% dos erros de testagem acontecem nesta fase, onde ocorrem a coleção, identificação, processamento, armazenamento e transporte da amostra^{1,2}. Potenciais fontes de erro

são: a má-identificação da amostra, colheita no tempo errado, o uso de anticoagulante errado, volume de amostra insuficiente, hemólise da amostra, extravasamento da amostra no transporte, entre outros. Os erros nesta fase podem levar à necessidade de pedir nova colheita, o que implica custos e perda de tempo, ou causar uma interpretação incorreta dos resultados¹.

Na Unilabs, os postos de colheita dão entrada da maioria das amostras no sistema informático antes destas serem transportadas para o laboratório central. Neste, todas as amostras são revistas na zona pré-analítica para garantir a qualidade da amostra antes destas serem enviadas para o respetivo setor onde serão analisadas. A pré-analítica está dividida em duas zonas de triagem: uma onde são triados os tubos de soro, plasma e sangue total e uma segunda onde são triadas as amostras de urina e fezes.

3.1. TRIAGEM SORO, PLASMA E SANGUE TOTAL

Neste setor tive a oportunidade de participar em todas as fases de triagem das amostras durante uma semana (~40 horas), incluindo centrifugação de amostras, verificação da qualidade das amostras, separação dos tubos para os respetivos setores, arquivo de amostras e até envio de algumas para laboratórios externos.

Os tubos que mais comumente passam por este setor são: tubos de sangue total com EDTA, tubos de plasma com citrato de sódio e tubos com gel separador de soro.

Neste setor, cerca de metade dos tubos recebidos são direcionados para o AutoMate 2500® da Beckman Coulter, um sistema de automação pré-analítico que separa os tubos, retira as tampas, deteta o volume e a presença de coágulos, e prepara alíquotas e arquivos³. As restantes amostras são separadas manualmente.

3.2. TRIAGEM URINAS E FEZES

Assim como no setor anterior, neste setor participei de todas as etapas que ocorrem na triagem de amostras de urinas ocasionais, urinas de 24-horas e fezes, durante uma semana (~40 horas). Participei da verificação da qualidade da amostra (verificação de volume e se não houve extravasamento) e separação dos tubos para os setores adequados.

A urina é separada consoante as análises pedidas, sendo mais comuns os pedidos de exame sumário (urina tipo 2), bacteriologia e bioquímica. Em algumas análises mais

específicas, como no proteinograma, além do tubo para a análise vem também um tubo para armazenamento – urinoteca.

As amostras de fezes são majoritariamente amostras de 3 dias consecutivos e normalmente destinam-se a análises de pesquisa do sangue oculto ou para o exame parasitológico. Neste setor, são realizadas tanto a pesquisa do sangue oculto como a preparação das amostras para o exame parasitológico.

Na pesquisa de sangue oculto, a análise é feita nos aparelhos OC-Sensor DIANA⁴ e OC-Sensor PLEDIA⁵, que utilizam a tecnologia de imuno-turbidimetria de aglutinação em latex para detetar a hemoglobina nas fezes. Quando existe um nível significativo de hemoglobina na amostra, pode ser sinal de sangramento causado por doenças gastrointestinais como o cancro colorretal.

Na preparação do exame parasitológico direto, amostras de fezes são carregadas no sistema Biosepar ParasiTrap®⁶, que colora e separa os parasitas de outros resíduos. O pellet obtido no final do processo de separação é, então, enviado para o setor da microbiologia, onde é ressuspenso em solução salina e observado ao microscópio, para identificar a presença ou não de parasitas, por pessoas experientes.

4. HEMATOLOGIA

O setor da Hematologia é altamente automatizado devido ao grande número de amostras analisadas diariamente. As análises realizadas neste setor são o hemograma completo, a velocidade de sedimentação (VS), a hemoglobina glicada (HbA1c), e eletroforese de hemoglobina.

Inicialmente, os tubos entram na cadeia automatizada Sysmex XN-9000⁷, com 8 módulos XN-10 que realizam o hemograma, um módulo SP-50 para preparação e coloração das lâminas, um módulo que separa os tubos para arquivo, para outras análises (VS e HbA1c), ou para verificação manual por terem ocorrido erros durante o hemograma (ex. presença de coágulos ou necessitar homogeneização). A VS é determinada de forma automática em aparelhos Diesse CUBE 30 touch⁸, a HbA1c em aparelhos Trinity Biotech Hb9210 Premier⁹, e a eletroforese de hemoglobina é realizada em aparelhos Sebia Capillarys 2¹⁰. E finalmente, as lâminas preparadas pelo módulo SP-50 são visualizadas em aparelhos CellaVision DM96¹¹.

Durante 2 semanas (cerca de 80 horas) foi possível participar ativamente em várias etapas das diferentes análises realizadas no setor: colocação de racks na cadeia

automática XN-9000; arrumação de tubos de arquivo; colocação dos tubos para HbA1c em racks; colocação e programação de tubos de VS; e isolamento de glóbulos vermelhos para a eletroforese de hemoglobina. Para além disso, tive oportunidade de visualizar a manutenção diária dos aparelhos e garantia de controlo de qualidade, validação de resultados e visualizar e interpretar lâminas de esfregaços sanguíneos.

4.1. HEMOGRAMA

O hemograma é das determinações analíticas mais comuns e inclui o estudo quantitativo e qualitativo das células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. É composto por parâmetros de avaliação da componente eritrocitária: contagem de glóbulos vermelhos, valor de hematócrito, concentração de hemoglobina, volume globular médio, hemoglobina globular média, e concentração de hemoglobina globular média¹ (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros eritrocitários presentes no hemograma com respetiva definição, valor de referência e interpretação clínica.

Analito	Valores de referência (VR) em adultos ^[1]	Interpretação clínica
RBC	Homens: 4,52 – 5,90 x 10 ¹² /L Mulheres: 4,10 – 5,10 x 10 ¹² /L	Anemia (< VR) Policitemia (> VR)
Hematócrito (% de eritrócitos no volume total de sangue)	Homens: 41,5 – 50,4 % Mulheres: 35,9 – 44,6 %	Anemia (< VR) Policitemia (> VR)
[Hb]	Homens: 14,0 – 17,5 g/dL Mulheres: 12,3 – 15,3 g/dL	Anemia (< VR)
VGM (Volume médio dos eritrócitos)	80,0 – 96,1 fL	Microcítia (< VR) Macrocítia (> VR)
HGM (Conteúdo de Hb média no eritrócito)	27,5 – 33,2 pg	Anemia (< VR) Policitemia (> VR)
CHGM (Concentração média de Hb num determinado volume de eritrócitos)	33,4 – 35,5 g/dL	Hipocromia (< VR)
RDW (Amplitude de distribuição de tamanho dos eritrócitos)	11,6 – 14,6 %	Anisocitose eritrocitária (> VR)

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média; [Hb] – Concentração de Hemoglobina; HGM – Hemoglobina Globular Média; RDW – Red Cell Distribution Width; VGM – Volume Globular Médio

O hemograma inclui também a concentração e contagem diferencial dos leucócitos, e a contagem de plaquetas (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros leucocitários e plaquetários presentes no hemograma, valores de referência e interpretação clínica.

	Valores de referência em adultos ^[1]	
	Valor absoluto	Valor relativo
Leucócitos	4,4 – 11,3 x 10 ⁹ /L	
Neutrófilos	1,8 – 7,7 x 10 ⁹ /L	59%
Linfócitos	1,0 – 4,8 x 10 ⁹ /L	34%
Monócitos	0 – 0,8 x 10 ⁹ /L	4,0%
Eosinófilos	0 – 0,45 x 10 ⁹ /L	2,7%
Basófilos	0 – 0,2 x 10 ⁹ /L	0,5%
Plaquetas	172 – 450 x 10 ⁹ /L	

4.1.1. XN Series

Os aparelhos XN-1000 Pure da Sysmex Europe¹² determinam os diferentes parâmetros hematológicos através de técnicas de citometria de fluxo (contagem de leucócitos e reticulócitos) e impedância com focagem hidrodinâmica (contagem de eritrócitos e plaquetas). A concentração de hemoglobina é determinada de forma automatizada recorrendo ao método SLS-hemoglobina sem cianeto.

1. Citometria de Fluxo

Na técnica de citometria de fluxo as células em suspensão passam uma a uma por um laser. A luz que é dispersa e emitida são medidas por detetores a diferentes ângulos e são usadas para estimar a morfologia, o tamanho e a granularidade da célula. A dispersão de luz direta ou *Forward Scatter* é proporcional ao tamanho da célula, enquanto a dispersão em ângulo reto ou *Side Scatter* está relacionada com a granularidade da célula e irregularidade nuclear. Desta feita, esta técnica permite a diferenciação e contagem de diferentes populações de moléculas, células, ou partículas que são diferenciadas pelo padrão de luz dispersa e emitida. Adicionalmente, as células podem ainda ser marcadas com fluorocromos específicos, como é o caso da marcação específica contra ácidos nucleicos que é usada nos aparelhos X-1000 para identificar e quantificar os reticulócitos na amostra².

Os componentes básicos de um citômetro de fluxo são: uma célula de fluxo, uma fonte de luz, e um sistema ótico/eletrónico com filtros e detetores².

2. Impedância Eletroquímica

A contagem celular pelo método de impedância baseia-se em mudanças na impedância elétrica que são produzidas quando partículas não-condutoras, suspensas num eletrólito, passam por uma pequena abertura entre dois eletrodos, uma a uma. Desta forma, o volume de eletrólito disperso pela célula é medido como um pulso na

voltagem, que é proporcional ao volume dessa célula. O número de pulsos é diretamente relacionado com a contagem das células².

3. SLS-hemoglobina

O método de detecção de hemoglobina por SLS usa Lauril-sulfato de sódio como reagente. Nesta reação, as células vermelhas e brancas são inicialmente lisadas, o que causa a oxidação do grupo heme, que subsequentemente se liga ao SLS, formando um complexo colorido de SLS-hemoglobina. Este complexo é depois quantificado por métodos espectrofotométricos e está diretamente relacionado com a concentração de hemoglobina na amostra^{13,14}.

a. Espectrofotometria

Os métodos espectrofotométricos medem a intensidade de luz, num determinado comprimento de onda, que é absorvida por uma solução. A concentração do analito é determinada pela lei de Beer-Lambert, que define que a concentração deste é diretamente proporcional à quantidade de luz que absorve².

Os componentes básicos do espectrofotômetro incluem uma fonte de luz, um filtro ou, o suporte para cuvettes, e um fotodetector. A fonte de luz policromática fornece energia eletromagnética que o filtro isola no comprimento de onda pretendido. A amostra na cuvette absorve uma fração da luz incidente e transmite a restante, esta luz transmitida atinge o fotodetector e gera um sinal elétrico que é convertido na concentração do analito².

4.2. ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos é uma ferramenta importante para obter informação sobre a morfologia dos elementos do sangue. Inserido na cadeia automatizada da Sysmex, o componente SP-50 realiza automaticamente os esfregaços e as respetivas colorações (Giemsa ou Wright)¹⁵. Depois de preparadas pelo SP-50, as lâminas são analisadas no CellaVision DM96¹¹ que usa tecnologia de análise de imagens digitais para localizar e classificar células do sangue em amostras de sangue total ou outros fluídos corporais. Este aparelho tem a capacidade de diferenciar e quantificar os diferentes tipos de leucócitos, os seus precursores, plaquetas gigantes, e definir a morfologia dos eritrócitos¹.

4.3. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) dos eritrócitos é um marcador útil, mas não específico de inflamação subjacente. Quando sangue venoso é bem homogeneizado e colocado na vertical, os eritrócitos têm a tendência a acumular no fundo do tubo. A altura da coluna de eritrócitos que se forma em repouso num determinado intervalo, é denominado de VS. O aparelho Diesse CUBE 30 touch⁸ faz a medição da VS, num processo completamente automatizado do método de referência de Westerngren e que obtém os resultados em 20 minutos. A leitura da altura da coluna é detetada por sensores optoeletrônicos¹.

Tabela 3 – Valores de referência e interpretação clínica da Velocidade de sedimentação.

Valores de referência em adultos (mm/hora) ^[1]				Interpretação clínica
VS		Homens (♂)	Mulheres (♀)	Inflamação subjacente (> VR)
	< 50 anos	15	20	
	> 50 anos	20	30	
	> 85 anos	30	42	

VS – velocidade de sedimentação dos eritrócitos.

4.4. HEMOGLOBINA GLICADA

A medição da hemoglobina glicada (HbA1c) é utilizada para monitorizar o controlo da glucose em pacientes diabéticos, permitindo o follow-up destes pacientes e determinar se são necessárias mudanças na medicação ou no estilo de vida. O aparelho da Trinity Biotech Hb9210 Premier⁹ consiste de sistemas integrados de HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) com colunas de afinidade de boronato, que liga especificamente todas as espécies de hemoglobina glicada na amostra. O resultado é determinado pela área sob o pico de duas frações de hemoglobina: uma não glicada e uma glicada¹.

Tabela 4 – Valores de referência e interpretação clínica da hemoglobina glicada.

	Valores de referência ^[1]	Interpretação clínica
HbA1c	4,0 – 6,0 %	Diabetes ≥ 6,5 %

HbA1c – Hemoglobina glicada.

1. Cromatografia

Cromatografia é um método de separação de moléculas com base nas diferentes interações dos diferentes compostos de uma amostra com uma fase móvel e uma fase estacionária. As moléculas/ compostos que interagem mais fortemente com a fase estacionária são retidos por mais tempo que aqueles que interagem mais com a fase móvel. As técnicas de cromatografia são classificadas consoante a sua fase móvel:

cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC). O tempo de retenção é característico de um composto e está relacionado com a força da sua interação tanto com a fase móvel como com a fase estacionária.

A *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é um tipo de cromatografia líquida que usa pressões elevadas para obrigar a fase móvel a passar pela fase sólida, e desta feita tem resolução superior e duração inferior às outras formas de LC e GC. Diferentes fases sólidas podem ser utilizadas para separar diferentes moléculas ^{1,2}.

4.5. ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma molécula complexa composta por dois pares de cadeias polipeptídicas ligadas ao grupo heme, um núcleo de porfirina e um átomo de ferro. O grupo heme é comum a todas as variantes de hemoglobina, mas a parte proteica, denominada de globina, é o que define as diversas variantes. O instrumento CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING é um analisador automatizado que executa o perfil completo da hemoglobina para a análise quantitativa das frações de hemoglobina normais (A, A2 e F) e para deteção das principais hemoglobinas variantes (S, C, E e D). Este aparelho utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre ^{16,17}.

Tabela 5 – Valores de referência da concentração das principais variantes de hemoglobinas.

	Valores de referência (%) ^[1]
Hb A	96,7 – 97,8
Hb F	≤ 0,5
Hb A2	2,2 – 3,2

Hb – Hemoglobina.

1. Eletroforese Capilar

A eletroforese consiste na separação de moléculas com base na sua carga elétrica ou tamanho. Quando uma voltagem é aplicada a uma solução salina, uma corrente elétrica é produzida pelo fluxo de iões. Quanto maiores a carga líquida das moléculas ou menor o seu tamanho, mais rápido elas se movem em direção ao eletrodo com carga oposta. Terminada a corrida da eletroforese, o meio de suporte (exemplo, agarose, capilar) é tratado com corante (exemplo, *Sudan Black B*) para identificar as frações separadas. À medida que os compostos da amostra migram em direção à saída do capilar, densitómetros óticos são usados para detetar e quantificar as bandas. Um sistema de eletroforese capilar é composto por: um capilar de sílica fundida, dois reservatórios de tampão eletrolítico; uma fonte de alimentação de alta tensão e um detetor.

As moléculas de hemoglobina em solução alcalina têm carga negativa e movem-se para o ânodo do sistema eletroforético, sendo a velocidade de migração das hemoglobinas relacionado com o seu tamanho. As variantes são então separadas na seguinte ordem, do cátodo para o ânodo: δA^2 (variante A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Filadélfia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore e H ^{1,17}.

Tabela 6 – Interpretação clínica da presença de variantes de hemoglobinas patológicas.

	Interpretação clínica
Hb S, C, E, O-Arab, ou D	Substituição ou mutação de um único aminoácido num dos 4 tipos de cadeias polipeptídicas. Levam a anomalias qualitativas – Hemoglobinopatias
Hb Bart ou H	Alfa-Talassemia. Diminuição da síntese de cadeias α
Hb F ou A2 aumentadas em relação à variante Hb A	Beta-Talassemia. Diminuição da síntese de cadeias β

Hb- Hemoglobina.

5. BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

A área da bioquímica clínica avalia o estado funcional de órgãos e vias metabólicas através de diversos parâmetros bioquímicos. Estes parâmetros são avaliados com recurso a reações enzimáticas ou imunológicas e a técnicas de espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria e luminescência, assim como eletroforese, espectrometria de massa e cromatografia.

A área da imunologia estuda o estado imune do paciente, tanto em questões de infeções virais, bacterianas e parasitológicas, como em questões de autoimunidade, reações de intolerância alimentar e alergologia. Estes parâmetros são avaliados por imunoturbidimetria, imunofluorescência indireta, nefelometria e imunoensaios de luminescência.

As análises da bioquímica clínica e da imunologia estão divididas em dois setores do laboratório: setor Core e setor das Análises Especiais.

5.1. SETOR CORE

A maioria das análises de bioquímica clínica são realizadas no setor Core. Os produtos analisados com maior frequência neste setor são amostras de soro e urina.

Devido à grande afluência de amostras analisadas diariamente neste setor (~10 000 tubos/dia), este encontra-se altamente automatizado. Está dividido em três linhas de serviço: as linhas 1 e 2 possuem dois analisadores de química analítica (Atellica® CH

Analyzer) e um analisador de imunoensaios (Atellica® IM Analyzer), enquanto a linha 3 possui um Atellica® CH Analyzer e dois (Atellica® IM Analyzer. Todas as linhas estão conectadas ao Aptio Automation e possuem um Atellica® Sample Handler. O setor possui também dois aparelhos para a eletroforese de proteínas CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING, quatro instrumentos de imunoensaios de luminescência: o IMMULITE 2000, o Cobas® e 411 e os aparelhos VIDAS® e VIDAS®3. Neste setor também são analisadas a osmolaridade das amostras recorrendo ao Gonotec® Osmomat 3000, e a concentração do cálcio ionizado no RAPIDpoint 500. Além disso também é neste setor que se realizam as provas de coagulação em dois instrumentos Sysmex CS-5100.

Neste setor foi possível contactar com o ambiente de um laboratório de bioquímica clínica de grande calibre e com a sua automação durante 2 semanas (~80 horas). Foi possível ter um papel ativo na manutenção do equipamento dos analisadores, programar controlos de qualidade e calibrações, substituir reagentes e soluções, colocar pontas de pipetas e cuvetes, e esvaziamento do lixo. Também participei na gestão das amostras, programei alguns testes e coloquei algumas amostras nos aparelhos; além de preparar alguns reagentes e reconstituir controlos e calibradores.

5.1.1. Aptio Automation

A automatização das diferentes componentes analíticas torna-se fundamental quando o volume de amostras é significativo, de forma a reduzir os erros e o tempo necessários para o processamento das amostras.

O *Aptio Automation* é constituído por vários módulos pré- e pós-analíticos. O *Rack Input Module* onde são colocadas *racks* com a maioria das amostras que saem da triagem; o *Input/Output Module* onde são colocadas e retiradas amostras específicas (e.g. amostras seladas ou sem tampa são inseridas e amostras com erros ou sem pedido são retiradas); o *Decapper Module* retira as tampas dos tubos e o *Sample Volume Detection Module* verifica o volume da amostra e reenvia para o *Input/Output Module* se este for insuficiente; após a análise da amostra o *Sealer Module* sela os tubos para armazenamento no *Refrigerated Storage Module*, do qual as amostras podem ser recuperadas ou eliminadas. Além destes, há também um *Desealer Module* que retira o selo dos tubos que são seleccionados para repetições ou testes adicionais ¹⁸.

5.1.2. Atellica® CH 930 Analyzer

O analisador Atellica® CH 930 realiza tanto testes fotométricos (espectrofotometria e turbidimetria) como testes de potenciometria. Permite analisar diferentes tipos de amostras: soro, plasma, líquido cefalorraquidiano, urina e sangue total ¹⁹.

Tabela 7 – Análises de bioquímica clínica realizadas no aparelho Atellica® CH Analyzer, qual o método utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica^{1,20}.

Analito	Método	Valor de referência em adultos (SI) ^[1,20]	Importância clínica
Ácido úrico	Espectrofotometria	Plasma/Soro ♂ = 220 – 547 µmol/L ♀ = 184 – 464 µmol/L Urina = 1,48 – 4,43 mmol/24h	Diagnóstico e tratamento de insuficiência renal, gota e eclâmpsia.
Albumina		32 – 49 g/L	Diagnóstico e tratamento de várias doenças que envolvem sobretudo o fígado ou os rins.
Álcool etílico		-	Diagnóstico e tratamento de intoxicação e envenenamento por álcool. Concentração fatal > 86,8 mmol/L.
ALT		10 – 49 U/L	Diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas ou cardíacas.
AST		< 34 U/L	
Amilase		Plasma/Soro = 30 – 118 U/L Urina ≤ 650 U/L	Diagnóstico e monitorização de pancreatite aguda.
Amilase pancreática		13 – 53 U/L	Diagnóstico e tratamento de distúrbios pancreáticos.
Amónia		11 – 32 µmol/L	Diagnóstico e tratamento de distúrbios hepáticos graves, como cirrose, hepatite e síndrome de Reye.
Bilirrubina direta		≤ 5 µmol/L	Rastreio de disfunções hepáticas ou diagnóstico de icterícia.
Bilirrubina total		5 – 21 µmol/L	Diagnóstico e tratamento de problemas hepáticos, hemolíticos, hematológicos e metabólicos (hepatite e doença da vesícula biliar).
Cálcio		Plasma/Soro = 2,18 – 2,60 mmol/L Urina 24h = 2,50 – 7,50 mmol/L Urina aleatória ♂ = 0,225 – 9,47 mmol/L ♀ = 0,125 – 8,92 mmol/L	Diagnóstico e tratamento da doença paratiroide, várias doenças ósseas, insuficiência renal crónica e tetania.
CK		♂ = 46 – 171 U/L ♀ = 34 – 145 U/L	Diagnóstico e tratamento de enfarte do miocárdio e doenças musculares.
Colesterol HDL		Alto risco < 1,04 mmol/L Baixo risco ≥ 1,55 mmol/L	Diagnóstico e tratamento de aterosclerose. Avaliação do risco cardiovascular.
Colesterol LDL*		< 2,59 mmol/L	
Colesterol total		Risco baixo < 5,18 mmol/L Risco alto ≥ 6,22 mmol/L	Tratamento de doentes com excesso de colesterol no sangue e diagnóstico de doenças do metabolismo de lípidos ou lipoproteínas.
Colinesterase		7000 – 19000 U/L	Diagnóstico e tratamento de intoxicação por organofosforados e certas doenças hepáticas (cirrose e hepatite aguda ou crónica).
Creatinina		Plasma/Soro ♂ = 53 – 97 µmol/L ♀ = 44 – 71 µmol/L	Diagnóstico e tratamento de doenças renais e monitorização de diálise.

		Urina ♂ = 800 – 200 mg/24h ♀ = 600 – 1800 mg/24h	
Dióxido de carbono		20,0 – 31,0 mmol/L	Diagnóstico e tratamento de distúrbios associados a alterações no equilíbrio ácido-base do organismo.
Fe		♂ = 11,6 – 31,3 µmol/L ♀ = 9,0 – 30,4 µmol/L	Diagnóstico e tratamento de anemias por deficiência de ferro ou hemocromatose.
Fosfatase alcalina		46 – 116 U/L	Diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, ósseas, paratiroides e intestinais.
GGT		♂ < 73 U/L ♀ < 38 U/L	Diagnóstico e tratamento de doença hepatobiliar e na avaliação de doentes com problemas de alcoolismo.
Glicose em jejum		Soro/Plasma = 4,1 – 5,9 mmol/L Urina = 2,8 mmol/24h	Diagnóstico e tratamento de distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, incluindo diabetes mellitus, hipoglicemia idiopática e sobredosagem de insulina.
Lactato		Plasma = 0,50 – 2,20 mmol/L LCR = 0,60 – 2,20 mmol/L	Concentração aumentada no sangue é indicador de metabolismo anaeróbico, fluxo sanguíneo reduzido aos tecidos e falta de O ₂ . No LCR, ajuda a distinguir entre meningite bacteriana de viral.
Lactato desidrogenase		120 – 246 U/L	Diagnóstico e tratamento do enfarte do miocárdio e enfarte pulmonar.
Lipase		12 – 53 U/L	Diagnóstico e tratamento de doenças do pâncreas (pancreatite aguda e obstrução de ducto).
Mg		Soro/Plasma = 0,66 – 1,07 mmol/L Urina = 0,99 – 10,45 mmol/24h	Diagnóstico e tratamento de hipomagnesemia e hipermagnesemia. Usado no estudo do metabolismo ósseo.
Proteína total		57 – 82 g/L	Diagnóstico e tratamento de várias doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, assim como outros distúrbios metabólicos e nutricionais.
Proteínas totais na urina		10 – 140 mg/L	
Triglicerídeos		< 1,70 mmol/L	Diagnóstico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática, outras doenças que envolvem metabolismo de lípidos ou vários distúrbios endócrinos.
Ureia		Plasma/Soro = 3,2 – 8,3 mmol/L Urina = 0,43 – 0,71 mol/dia	Diagnóstico e tratamento de doença renal, obstrução do trato urinário e insuficiência renal aguda ou crónica.
Antiestreptolisina O	Imunoturbidimetria	≤ 194 IU/mL	Auxilia diagnóstico de doenças causadas por bactérias estreptococos do grupo A.
Carbamazepina		Intervalo terapêutico = 16,9 – 33,9 µmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para ≥ 63,5 µmol/L.
Digoxina		Intervalo terapêutico = 1,02 – 2,56 mmol/L	Monitorização de fármaco.
Fator reumatoide		< 14 IU/mL	Diagnóstico de artrite reumatoide.
Gentamicina		Intervalo terapêutico = 8,64 – 21,6 µmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para > 4,32 µmol/L.
Lítio		Intervalo terapêutico = 1,00 – 1,20 mmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para > 1,50 mmol/L.
Lp(a)		< 0,3 g/L	Diagnóstico de distúrbios do metabolismo de

			Ípídeos e avaliação de pessoas com risco de doenças cardiovasculares.
Microalbumina		Urina 24h < 30 mg/24h	Diagnóstico e tratamento de microalbuminúria. Detecção e tratamento de pacientes em risco de desenvolver doença renal.
PCR		0,00 – 5,00 mg/L	Avaliação da quantidade de lesões nos tecidos corporais e de inflamação.
Teofilina		Intervalo terapêutico = 56 – 111 µmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para > 111 µmol/L.
Cl ⁻	Potenciometria	Soro/Plasma = 98 – 107 mmol/L Urina = 110 – 250 mmol/L/24h	Diagnóstico e tratamento de distúrbios metabólicos e de eletrólitos, como fibrose cística e cetoacidose diabética.
K ⁺		Soro = 3,5 – 5,1 mmol/L Plasma = 3,4 – 4,5 mmol/L Urina = 25 – 125 mmol/L/24h	Monitorizar o desequilíbrio de eletrólitos.
Na ⁺		Soro/Plasma = 136 – 145 mmol/L Urina = 40 – 220 mmol/L/24h	Diagnóstico e tratamento de aldosteronismo, diabetes insipidus, hipertensão de causa suprarrenal, doença de Addison, desidratação, secreção inadequada de hormonas antidiuréticas ou doenças com desequilíbrio de eletrólitos.

ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; Cl⁻ - cloro; CK – Creatina Quinase; Fe – Ferro; GGT – Gama-glutamil transferase; HDL - lipoproteínas de alta densidade; K⁺ - Potássio; LCR – Líquido cefalorraquidiano; LDL - Lipoproteínas de baixa densidade; Lp(a) – Lipoproteína A; Mg – Magnésio; Na⁺ - sódio; PCR – Proteína C reativa. * Quando os triglicéridos < 4,52 mmol/L, o colesterol LDL é quantificado pelo método indireto usando a equação: Colesterol LDL = Colesterol Total – Colesterol HDL – (Triglicéridos/5). Quando os triglicéridos > 4,52 mmol/L, o colesterol LDL é quantificado diretamente pelo método espectrofotométrico.

1. Turbidimetria

A turbidimetria é uma técnica analítica que mede a luz dispersa por partículas em suspensão. As partículas em suspensão dispersam, refletem e absorvem a luz quando esta lhes incide, o que causa uma diminuição da intensidade do feixe de luz que é detetado. Esta diminuição é proporcional à concentração e tamanho do analito e é utilizada em muitos imunoensaios ².

Os componentes de um turbidímetro são uma fonte de luz, uma lente, um suporte para cuvettes, um detetor e um dispositivo de leitura².

2. Potenciometria

A potenciometria mede a diferença de potencial entre dois elétrodos (de referência e de medição) numa célula eletroquímica. Deste modo são altamente empregues para medir pH, pCO₂ e eletrólitos. O potencial da célula está relacionado com a concentração

molar pela equação de Nernst, pelo que a diferença de potencial vai ser proporcional à concentração do analito na amostra^{1,2}.

No caso dos eletrólitos seletivos a diferença de potencial é causada pela permeabilidade da membrana do eletrodo a aniões ou catiões selecionados¹.

5.1.3. Atellica® IM 1600 Analyzer

O analisador Atellica® IM 1600 Analyzer realiza imunoenaios de diversos tipos (sanduíche, competitivo) com tecnologia quimiluminescente. Permite analisar amostras de soro, plasma, líquido amniótico, urina e sangue total¹⁹.

Tabela 8 – Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho Atellica® IM Analyzer, qual o método utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica^{1,20}.

Analito	Método	Valor de referência em adultos (SI) ^[1,20]	Importância clínica
AFP	Imunoensaio sanduíche, quimiluminescente	< 8,1 ng/mL	Marcador tumoral.
Anti-tiroglobulina		-	Auxiliar no diagnóstico de doenças de Graves e Hashimoto. Doença autoimune da tireoide quando anti-tiroglobulina ≥ 4,5 IU/L.
BNP		-	Auxiliar no diagnóstico e avaliação da gravidade da insuficiência cardíaca. Insuficiência cardíaca aparente para ≥ 100 pg/mL.
CA 125		-	Auxiliar na gestão de doentes com carcinoma dos ovários. Aumento ≥ 30% é indicador de progressão da doença.
CA 15-3		-	Monitorizar a evolução da doença e do tratamento de doentes com cancro da mama metastático. Limite superior do normal = 32,4 U/mL.
CA 19-9		-	Gestão de pacientes com carcinoma gastrointestinal. Tumores em doentes com níveis de CA 19-9 > 1000 U/mL são irressecáveis.
CEA		-	Auxiliar na gestão de doentes com cancro colorretal, pancreático, pulmonar e da mama.
Citomegalovírus		-	Deteção de anticorpos IgG e IgM. Diferenciar infeção primária de infeção latente ou reinfeção em mulheres grávidas.
CK-MB		-	Auxiliar no diagnóstico de lesão do miocárdio CK-MB > 0,0625 nmol/L é altamente indicativo de enfarte do miocárdio.
cPSA		-	Usado em conjunto com o exame digital retal na deteção de cancro da próstata em homens com > 50 anos.
Ferritina		♂ = 22 -640 pmol/L ♀ = 48 – 708 pmol/L	Auxiliar no diagnóstico da anemia por deficiência de ferro e sobrecarga de ferro (talassemia e hemocromatose).
fPSA		♂ = 4 – 10 ng/mL	Auxiliar na distinção entre cancro da próstata e doença prostática benigna.
FSH		♂ = 1,4 – 18,1 IU/L	Níveis anormais de FSH estão associados a

		♀ menstruada: Fase folicular= 2,5 – 10,2 IU/L Ovulação = 3,4 – 33,4 IU/L Fase lútea= 1,5 – 9,1 IU/L ♀ grávida < 0,3 IU/L ♀ na menopausa = 23,0 – 116,3 IU/L	várias condições patológicas. Níveis elevados de FSH estão associados a menopausa e hipofunção ovariana primária em mulheres e a hipogonadismo primário em homens. Níveis baixos de FSH estão associados a hiperfunção ovariana primária em mulheres e a hipergonadismo primário em homens.
hCG	-		Meio auxiliar na avaliação do estado da gravidez. Detetada 1 semana após a concepção.
HIV	-		Deteção de anticorpos e antígenos para HIV1 e HIV2. Auxiliar no diagnóstico da infecção por HIV e SIDA.
IgE Total	-		Fornece informações úteis sobre o diagnóstico clínico diferencial de doenças atópicas e não atópicas. Também estão elevados em infecções parasitárias, estados de imunodeficiência, doenças autoimunes, entre outras.
Insulina	3,0 – 25,0 mUI/L		Auxiliar no diagnóstico e tratamento de diabetes <i>mellitus</i> e hipoglicemia. Determinação de insulinoresistência e avaliação de anomalias na função secretora das células β.
LH	♂ = 1,5 – 9,3 IU/L ♀ menstruada: Fase folicular= 1,9 – 12,5 IU/L Ovulação = 8,7 – 76,3 IU/L Fase lútea= 0,5 – 16,9 IU/L ♀ grávida = 0,1 – 1,5 IU/L ♀ na menopausa = 7,9 – 53,8 IU/L		Níveis anormais estão associados a várias condições patológicas. Níveis elevados de LH estão associados a menopausa, hipofunção ovariana primária e síndrome do ovário policístico em mulheres e a hipogonadismo primário em homens. Níveis baixos de LH estão associados a hiperfunção ovariana primária em mulheres e a hipergonadismo primário em homens.
Mioglobina	-		Auxiliar no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio. Mioglobina > 110 µg/L é altamente indicativo de enfarte agudo do miocárdio.
NT-proBNP	-		Auxiliar no diagnóstico e avaliação da gravidade em indivíduos com suspeita de insuficiência cardíaca congestiva. Limiar de decisão = 125 pg/mL.
Prolactina	♂ = 45 – 375 µIU/mL ♀ não grávida = 59 – 619 µIU/mL ♀ grávida = 206 – 4420 µIU/mL ♀ na menopausa = 38 – 430 µIU/mL		Níveis de prolactina > 636 µIU/mL, na ausência de lactação na gravidez e pós-parto são indicadores de hiperprolactinemia. Insuficiência renal, hipotireoidismo e adenomas hipofisários secretores de prolactina também são causas comuns de níveis anormalmente elevados de prolactina.
PSA	-		Ajuda, em conjunto com exame digital retal, na deteção de cancro da próstata em homens com mais de 50 anos. PSA > 4,0 µg/L poderão justificar testes adicionais.
PTH	Plasma = 1,95 – 8,49		Ajudar no diagnóstico diferencial de

		pmol/L Soro = 1,96 – 9,33 pmol/L	hiperparatireoidismo ou hipoparatiroidismo. Também usado para avaliar e gerir doenças ósseas e metabólicas.
Sífilis		-	Anticorpos de <i>Treponema pallidum</i> . Auxiliar no diagnóstico de sífilis.
Toxoplasma		-	Anticorpos IgG e IgM de <i>Toxoplasma gondii</i> . Auxiliar no diagnóstico de toxoplasmose. Auxiliar na avaliação do estado de imunidade e na avaliação da suscetibilidade à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .
Troponina I		33,21 – 64,30 ng/L	Auxiliar no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio. Pode estar elevado em outras condições cardíacas e não cardíacas.
TSH		0,55 – 4,78 mIU/L	Diagnóstico de perturbações da tiroide ou da pituitária. Diagnóstico diferencial do hipotireoidismo primário, secundário ou terciário.
Vírus da hepatite B		-	Anti-HBe, Anti-HBs, Anti – HBe, HBe, HBs. Ajudar a determinar o estado clínico em relação ao vírus da hepatite B.
Vírus da hepatite C		-	Antigénio. Diagnóstico de hepatite C.
Vírus da rubéola		-	Anticorpos IgG e IgM. Avaliação do estado imunitário à rubéola.
aTPO	Imunoensaio competitivo, quimiluminescente.	-	Determinação quantitativa do auto-anticorpo antiperoxidase tiroideia, presentes nas doenças autoimunes da tiroide, na tiroide atrófica e mixedema primário.
Estradiol		♂ = 0 – 146,1 pmol/L ♀ menstruada: Fase folicular = 71,6 – 529,2 pmol/L Ovulação = 234,5 – 1309,1 pmol/L Fase lútea = 204,8 – 786,1 pmol/L ♀ na menopausa = 0 – 118,2 pmol/L	Avaliação da função dos ovários e para monitorização do desenvolvimento folicular nos protocolos de reprodução assistida.
Folato		> 12,19 nmol/L	Diagnóstico e tratamento de anemias macrocíticas.
FT3		3,5 – 6,5 pmol/L	Diagnóstico e tratamento da doença da tiroide.
FT4		11,5 – 22,7 pmol/L	Diagnóstico e tratamento da doença da tiroide.
Homocisteína		2,3 – 13,9 µmol/L	Auxiliar no diagnóstico e tratamento de doentes com suspeita de terem homocisteinúria ou hiper-homocisteinémia.
Progesterona		♂ = 0,89 – 3,88 nmol/L ♀ menstruada: Fase folicular = 0 – 4,45 nmol/L Fase lútea = 10,62 – 81,28 nmol/L ♀ na menopausa = 0 – 2,32 nmol/L	Produção inadequada poderá indicar deficiência da fase lútea, a qual está associada a infertilidade e aborto.
T3		0,92 – 2,79 nmol/L	Diagnóstico e tratamento de doenças da tiroide.
T4		58,1 – 140,6 nmol/L	Diagnóstico e tratamento de doenças da

			tiroide.
Testosterona		♂ $< 50 \text{ anos} = 6,85 - 23,23 \text{ nmol/L}$ $> 50 \text{ anos} = 6,51 - 23,74 \text{ nmol/L}$ ♀ $< 50 \text{ anos} = 0,62 - 1,21 \text{ nmol/L}$ $> 50 \text{ anos} = 0,49 - 1,25 \text{ nmol/L}$	Diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem as hormonas masculinas (androgénios), incluindo hipogonadismo primário e secundário, puberdade atrasada ou precoce, impotência em homens e, em mulheres, hirsutismo e virilização devido a tumores, ovários policísticos e síndromes adrenogenitais.
Vírus da hepatite A		-	Anticorpos totais, anticorpos IgG e IgM. Auxiliar no diagnóstico de infeções virais anteriores ou atuais por hepatite A ou na deteção de anti-HAV após vacinação.
Vitamina D		75 – 250 nmol/L	Auxiliar na determinação de suficiência de vitamina D.

AFP – Alfafetoproteína; aTPO – Antiperoxidase Tiroideia; BNP – Peptídeo Natriurético do tipo B; CA – Antígeno cancerígeno; CEA – Antígeno carcinoembrionário; cPSA – Antígeno complexado específico da próstata; CK-MB – Creatinina quinase do miocárdio; EPO – eritropoietina; FT3 – Triiodotironina livre; FT4 – Tiroxina livre; fPSA – Antígeno livre específico da próstata; FSH – Hormona folículo-estimulante; hCG – Gonadotropina coriônica humana; LH – hormona luteinizante; NT-proBNP- pro-hormona do peptídeo natriurético do tipo B; PSA – antígeno específico da próstata; PTH – Hormona paratiroideia intacta; T3 - Triiodotironina total; T4 – Tiroxina total; TSH – Hormona estimulante da tiroide.

1. Imunoensaios de quimiluminescência

Num imunoensaio, anticorpos são usados como reagente para detetar o analito de interesse. A elevada afinidade dos anticorpos aos antígenos permite a identificação e quantificação de diversas substâncias com elevada especificidade. Os imunoensaios podem ser classificados em duas grandes categorias: imunoensaios competitivos e imunoensaios não competitivos (sanduíche)².

Nos imunoensaios competitivos, quantidades conhecidas de antígeno marcado e os antígenos na amostra são misturados e reagem competitivamente com anticorpos presentes numa fase sólida. Após o equilíbrio, o complexo imune preso na fase sólida é separado através de lavagens. O sinal obtido é inversamente proporcional à concentração de analito na amostra^{1,2}.

Nos imunoensaios de sanduíche dá-se o uso de dois anticorpos que ligam epítomos diferentes da molécula alvo. O primeiro anticorpo está ligado à fase sólida, de forma extrair a molécula alvo da amostra. Seguidamente o segundo anticorpo, usualmente marcado, liga a molécula, formando uma “sanduíche” em que a molécula alvo está no centro. A concentração do analito é diretamente proporcional à intensidade do sinal^{1,2}.

Para facilitar o processo de identificação e quantificação do complexo anticorpo-antígeno os anticorpos podem estar marcados com diversas moléculas. Entre elas, são muitas vezes utilizadas moléculas quimiluminescentes, as quais emitem luz durante uma

reação química. A reação química produz um composto eletronicamente excitado que emite luz ao retornar ao seu estado fundamental, ou quando transfere a sua energia para outro composto. Um exemplo muito comum é a luz emitida aquando da reação de oxidação de ésteres de acridina ^{1,2}.

A quimiluminescência é detetada por meio de um luminómetro, que contém um fotomultiplicador no qual os fótons são convertidos em eletrões e onde se dá uma amplificação do sinal. A corrente resultante é proporcional à quantidade de luz e à quantidade de anticorpo marcado ligado ao antigénio².

5.1.4. CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING

O instrumento CAPILLARYS 2 é utilizado no setor core para separação de proteínas no soro ou urina por técnicas de eletroforese capilar. Este aparelho permite obter o perfil das proteínas, tanto qualitativo como quantitativo^{1,21}.

As proteínas do soro e urina usualmente separam-se em 5 zonas característica, do maior para menor peso molecular: albumina, alfa-1 globulinas, alfa-2 globulinas, beta-globulinas e gamaglobulinas. Alterações no padrão das proteínas pode ser indicativo de várias patologias, tal como acontece com o aumento da fração das beta-globulinas durante a inflamação e o aumento das gamaglobulinas em doenças monoclonais¹.

5.1.5. IMMULITE 2000

O instrumento IMMULITE 2000²² realiza imunoensaios de quimiluminescência. Este sistema utiliza amostras de soro, plasma, fluido amniótico ou urina. A enzima utilizada é a fosfatase alcalina, o substrato é dioxetano e a intensidade do sinal é detetada por um fotomultiplicador. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de analito originalmente presente na amostra².

Tabela 9 – Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho IMMULITE 2000, valores de referência no adulto e importância clínica^{1,20}.

Analito	Valor de referência em adultos (SI) ^[1,20]	Importância Clínica
Ácido Valpróico	Intervalo terapêutico = 237 – 693 µmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para < 693 µmol/L.
ACTH	0 – 46 pg/mL	Diagnóstico diferencial de insuficiência adrenal e hipersecreção.
Androstenediona	♂ = 2,1 – 10,8 nmol/L ♀ = 1,0 – 11,5 nmol/L	Precursor de testosterona e estrona. Comumente elevado em casos de hirsutismo e virilização.
Calcitonina	♂ < 8,4 pg/mL ♀ < 5,0 pg/mL	Diagnóstico de doenças paratiroides, e da tireoide.
Carbamazepina	Intervalo terapêutico = 17	Monitorização de fármaco.

	- 51 µmol/L	Toxicidade para > 63 µmol/L.
Cortisol	Durante a manhã = 5- 25 µg/dL Durante a tarde , aproximadamente metade	Monitorização do estado adrenal.
DHEA-SO ₄	♂ = 35 – 430 µg/dL ♀ = 80 – 560 µg/dL	Investigação de hirsutismo e alopecia em mulheres.
EBV-EBNA IgG	-	Diagnóstico de Mononucleose infecciosa e auxiliar na definição do estado imune do paciente.
EBV-VCA IgG		
EBV-VCA IgM		
EPO	4,3 – 20 mIU/mL	Diagnóstico de anemias e policitemia. Monitorização do tratamento com EPO recombinante.
Fenitoína	Intervalo terapêutico = 40 – 80 µmol/L	Monitorização de fármaco. Toxicidade para > 80 µmol/L.
Gastrina	13 – 115 pg/mL	Diagnóstico e tratamento de pacientes com alterações associadas com produção anormal de gastrina.
hCG	♂ e ♀ não grávidas < 2,7 mIU/mL	Teste de gravidez.
hGH	♂ < 3 ng/mL ♀ < 8 ng/mL	Diagnóstico e tratamento de secreção inapropriada da hormona de crescimento.
IGFBP-3	Varia com idade	Auxiliar na avaliação de doenças do crescimento
IGF-I		
PAP	♂ < 3,5 ng/mL	Marcador tumoral.
Peptídeo C	0,3 – 2,4 nmol/L	Diagnóstico e tratamento de pacientes com secreção anormal de insulina.
SHBG	♂ = 10 – 57 nmol/L ♀ não grávidas = 18 - 144 nmol/L	Diagnóstico diferencial de hirsutismo
TBG	14 – 31 µg/mL	Auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças da tireoide.
Tiroglobulina	1,6 – 59,9 ng/mL	Monitorização de pacientes com tireoidectomia.
β2 Microglobulina	Soro ♂ < 2,16 ng/mL ♀ < 2,30 ng/mL Urina < 300 ng/mL	Diagnóstico de artrite reumatoide ativa e doenças renais.

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica; DHEA-SO₄ – Dihidroepiandrosterona sulfato; EBV-EBNA – Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr; EBV – VCA – Antígeno de capsídeo viral do vírus de Epstein-Barr; EPO – Eritropoietina; HCG – Gonadotrofina coriônica humana; hGH – hormona de crescimento; IGFBP-3 – Proteína-3 de transporte IGF-I; IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; PAP – Fosfatase ácida prostática; SHBG – Globulina ligadora de hormonas sexuais; TBG – Globulina ligadora de tiroxina.

5.1.6. VIDAS®

Os analisadores VIDAS® e VIDAS® 3 são sistemas de imunoensaio automatizado que se baseiam na tecnologia de *Enzyme-linked fluorescence assay* (ELFA)^{23,24}. Estes aparelhos são usados maioritariamente como método alternativo de confirmação: Análises de virologia/imunologia que sejam positivos no IM ou IMMULITE sem histórico ou no limite são repetidas no aparelho VIDAS, como forma de confirmar que o resultado é

um verdadeiro positivo. Só depois de haver dois resultados positivos (no IM ou IMMULITE + no VIDAS) é que o resultado positivo é validado tecnicamente.

Tabela 10 – Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas nos aparelhos VIDAS® e VIDAS®3 e importância clínica destes^{1,23,24}.

Analito	Importância clínica
Citomegalovírus (IgG, IgM e avidéz)	Método alternativo de confirmação para diagnóstico de infecções. Determinação de IgM é indicativo de infecção recente. Detecção de anticorpos IgG com elevada avidéz é um forte indicador de infecção primária com mais de 3 meses.
HIV (anti-HIV-1, grupos M e O; HIV p24 antigénio; anti-HIV-2 imunoglobulinas)	
Toxoplasma gondii (IgM, IgG e avidéz)	
Rubéola (IgG e IgM, avidéz)	
Hepatite B (HBc, HBs e HBe)	
Borrelia burgdorferi	
Hepatite E (IgG e IgM)	
Hepatite C (IgG)	
Epstein-Barr (VCA IgG e IgM, EBNA IgG)	
D-Dímeros	Avaliar risco de trombose e tromboembolismo pulmonar.
Procalcitoninas	Marcador específico de infecção bacteriana grave e septicemia.
hCG	Teste de gravidez, e follow-up de gravidez e complicações (gravidez ectópica, aborto espontâneo). Marcador tumoral.

hCG - Gonadotrofina coriônica humana.

1. *Enzyme-linked fluorescence assay (ELFA)*

A tecnologia de ELFA trata-se de um tipo de imunoensaio quimiluminescente em que a enzima conjugada ao anticorpo catalisa a hidrólise do substrato num produto fluorescente². No caso dos aparelhos VIDAS® e VIDAS®3 o substrato é fosfato de 4-metilumbeliferil, que é hidrolisado em 4-metilumbeliferona, que emite fluorescência a 450nm^{23,24}.

Fluorescência é a emissão de radiação eletromagnética por um composto que absorveu radiação de excitação de uma fonte externa, neste caso proveniente da reação química. Esta fluorescência é detetada no instrumento por um fluorómetro ótico e a intensidade da luz emitida é diretamente proporcional à concentração do analito. Uma vez que a fluorescência consegue ser detetada a concentrações muito mais baixas que produtos coloridos, as técnicas fluorométricas são cerca de 100 vezes mais sensíveis que as técnicas espectralométricas².

5.1.7. Cobas® e411

O Cobas® e411 analyzer da Roche Diagnostics é um sistema automático de análise de imunoensaios de eletroluminescência para determinação quantitativa e

qualitativa de marcadores de vários tipos, incluindo marcadores cardíacos, tumorais, hormonas, e de doenças infecciosas^{25,26}.

Tabela 11 – Análises de bioquímica clínica e imunologia realizadas no aparelho Cobas® e 411, princípio do teste utilizado, valores de referência no adulto e importância clínica^{1,26}

Analito	Princípio do teste	Valores de referência em adultos	Importância clínica
AMH	Imunoensaio sanduiche de eletroluminescência.	Em ♀ varia com a idade	Utilizado na previsão de resposta à estimulação ovariana em técnicas de reprodução assistida.
CA 125 II		♀ < 35 U/mL	Marcador tumoral.
CA 72-4		5.6 – 8.2 U/mL	
Cyfra 21-1		< 2,37 ng/mL	
HE4		♀ Pré-menopausa < 70 pmol/L Pós-menopausa < 140 pmol/L	
NSE		15,7 – 17,0 ng/mL	
SCC		< 2,3 ng/mL	
HSV-1 e 2 IgG			Determinar estado imune e auxiliar no diagnóstico de infecção por HSV.
HTLV tipo I e II		-	Diagnóstico de infecção por HTLV. Utilizado no rastreio de dadores de sangue.
Osteocalcina		♂ < 50 anos = 10,2 -36,7 ng/mL > 50 anos = 10,8 – 31,1 ng/mL ♀ Antes da menopausa = 9,7 – 35,1 ng/mL Depois da menopausa = 7,3 – 37,8 ng/mL	Marcador de formação óssea e atividade osteoplástica. Útil na monitorização de osteoporose pós-menopausa.
Troponina T		-	Auxiliar no diagnóstico diferencial da síndrome coronária aguda para identificar necrose. Risco cardiovascular: - Baixo < 5 ng/L - Alto > 10 ng/L
Cortisol	Imunoensaio competitivo de eletroluminescência.	Manhã = 166 – 507 nmol/L Tarde = 73.8 – 291 nmol/L	Diagnóstico e monitorização de síndrome de Cushing e doença de Addison.
Cortisol na urina		31,7 – 282 nmol/24h	

AMH – Hormona anti-muleriana; CA – Antígeno cancerígeno; HE4 – Proteína epididimal humana 4; HSV – Vírus Herpes simplex; HTLV – vírus linfotrópico de células T humanas; SCC – Antígeno do carcinoma das células escamosas; NSE – Enolase específica dos neurónios.

1. Eletroquimiluminescência

Este método difere da quimiluminescência no ponto em que as espécies reativas que produzem a molécula luminescente são geradas electroquimicamente a partir de precursores estáveis na superfície de um eletrodo. O marcador eletroluminescente mais comumente usado é um quelato de tris(bipiridil) rutênio, e a luminescência é gerada no eletrodo via uma reação oxidação-redução com tripopilamina. A vantagem deste método é a sua elevada sensibilidade.

5.1.8. RAPIDpoint 500

O instrumento RAPIDPoint 500 da Siemens fornece determinação em soro ou sangue total de: pressão parcial de dióxido de carbono e oxigênio, pH, concentração de sódio, potássio, cálcio ionizado, cloreto, e lactato, e hemoglobina total e frações (Tabela 12). Para estas determinações o aparelho utiliza tecnologia baseada em fenómenos eletroquímicos (potenciometria e amperometria) e fenómenos de espectrofotometria.

Tabela 12 – Análises de bioquímica clínica realizadas no aparelho RAPIDpoint 500, princípio do método utilizado, valores de referência em adultos e importância clínica destes ^{1,27}.

Analito	Princípio do teste	Valores de referência em adultos ^[1,27]	Importância clínica
pCO ₂	Potenciometria	32,0 – 48,0 mmHg	Diagnóstico e tratamento de distúrbios ácido-base.
pO ₂	Amperometria	83,0 – 108,0 mmHg	
pH	Potenciometria	7,35 – 7,45	Diagnóstico e tratamento de desequilíbrio de eletrólitos
Na ⁺		136,0 – 145,0 mmol/L	
K ⁺		3,40–4,50 mmol/L	
Cl ⁻		98 – 107 mmol/L	
Ca ²⁺ ionizado		1,15- 1,33 mmol/L	Diagnóstico e tratamento da doença da paratireoide, de uma série de osteopatias, doença renal crónica e tetania.
Lactato	Amperometria	0,36 – 0,75 mmol/L	Avaliar estado ácido-base. Apoiar no diagnóstico e gestão de acidose, choque e sépsis.
Hemoglobina total	Espectrofotometria	120 – 175 g/L	Apoiar diagnóstico de anemia.
Oxihemoglobina		94,0 – 98,0 %	Identificação de deficiência no consumo de oxigênio.
Carboxihemoglobina		0,5 – 1,5 %	Diagnóstico de intoxicação por monóxido de carbono.
Metemoglobina		0,0 – 1,5 %	Diagnóstico de metemoglobinemia.
Desoxihemoglobina		0,0 – 5,0 %	Avaliação de hipoxemia.

5.1.9. Gonotec® Osmomat 3000

Este instrumento determina a osmolaridade total do soro ou da urina. Este parâmetro é utilizado para avaliar alterações no equilíbrio osmótico, usado em conjunto determinações de eletrólitos para avaliar distúrbios ácido-base².

A osmolaridade é determinada por medições comparativas do *freezing point* entre água pura e a solução. Enquanto a água tem um ponto de congelamento de 0°C, uma solução com 1 Osmol/kg tem um ponto de congelamento de -1,858°C. Os componentes deste instrumento incluem: uma câmara de arrefecimento, um mecanismo de agitação, e um termistor. A amostra é arrefecida no sistema até ao *plateau* de congelamento, o qual é detetado pelo sensor térmico (Burtis & Bruns, 2015; *Gonotec® OsmomatTM*, n.d.).

O valor de referência da osmolaridade no soro é 275 – 300 mOsmol/kg, e na urina é de 100 – 150 mOsm/kg².

5.1.10. PROVAS DE COAGULAÇÃO

O instrumento Sysmex CS-5100 é um analisador automatizado de coagulação sanguínea. Este instrumento analisa amostras utilizando métodos de coagulação, espectrofotometria, imunoensaio e agregação (Tabela 13). Analisa sangue total com citrato de sódio²⁹.

Tabela 13 – Provas de coagulação realizadas no aparelho Sysmex CS-5100, princípio do método utilizado, valores de referência em adultos e importância clínica^{1,20}.

Parâmetro de análise	Método	Valor de referência em adultos	Importância Clínica
Anticoagulantes Lúpicos	Coagulação – análise turbidimétrica da amostra deteta formação do coágulo.	LA 1 = 31 – 44 s LA 2 = 30 – 38 s	Rastreio e confirmação de anticorpos lúpicos em pacientes com doença tromboembólica, complicações na gravidez ou com APTT prolongado.
APTT		25,0 – 31,3 s	Diagnóstico e rastreio de distúrbios da hemóstase e na monitorização de heparina não fracionada.
Atividade da proteína S		60 – 130 % da norma	Adjuvante no diagnóstico de deficiências de proteína S congénitas ou adquiridas
Atividade do fator de coagulação CII		70 – 140 % da norma	Diagnóstico e monitorização de deficiências de fator de coagulação XII congénitas ou adquiridas.
Fator de coagulação II		70 – 120% da norma	Diagnóstico de deficiências de fatores de coagulação congénitas ou adquiridas em pacientes com doenças hemorrágicas.
Fator de coagulação IX		70 – 120 % da norma	
Fator de coagulação V		70 – 120 % da norma	
Fator de coagulação VII		70 – 120% da norma	
Fator de coagulação VIII		70 – 150% da norma	
Fator de coagulação X		70 – 120% da norma	
Fator de coagulação XI		70 – 120 % da norma	
Fator de coagulação XII		70 – 150% da norma	

Fator V de Leiden		Rácios $\leq 1,5$ indicam a variante do fator V Leiden.	Rastreio de mutação congénita do fator V Leiden em pacientes com doença tromboembólica.
PT		9,8 – 12,1 s	Diagnóstico e rastreio de perturbações de hemóstase e na monitorização da terapêutica de anticoagulação oral com antagonistas da vitamina K.
Tempo de trombina		14 – 21 s	Diagnóstico de perturbações de hemóstase relacionadas com fibrinogénio.
Antitrombina	Espectrofotometria	83 – 118 % da norma	Adjuvante no diagnóstico de deficiências de antitrombina congénitas ou adquiridas. Adicionalmente, utilizado para monitorizar a terapêutica de substituição da antitrombina.
Atividade da proteína C		70 – 140 % da norma	Adjuvante no diagnóstico de deficiências de proteína C congénitas ou adquiridas.
Heparina		-	Monitorizar doentes submetidos a terapêutica com heparina.
Antigénio da proteína S livre	Imunoturbidimetria	♂ = 73,2 – 129,5 % da norma ♀ = 65,4 – 138,7 % da norma	Adjuvante no diagnóstico de deficiências de proteína S congénitas ou adquiridas.
Fator de von Willenbrand (vWF)		50 – 60 % da norma	Diagnóstico de deficiências de vWF congénitas ou adquiridas.

APTT – tempo de tromboplastina parcial ativado; PT – tempo de protrombina.

5.2. SETOR DE ANÁLISES ESPECIAIS

No setor das Análises Especiais realizam-se as análises que não fazem parte dos testes laboratoriais de rotina. Na componente de bioquímica clínica o setor possui aparelhos que realizam imunoensaios (IDS-iSYS e Snibe MAGLUMI X3), três aparelhos de ELISA automatizados (TRITURUS®, EUROIMMUN Analyzer I-2P, e DYNEX DS2®), um aparelho de eletroimunofixação HYDRASYS 2 Scan Focusing, um aparelho de nefelometria (BN ProSpec®), cinco sistemas de HPLC (três sistemas de preparação HTA, e um sistema Shimadzu Nexera e Gilson® VERITY 271), um sistema de HPLC acoplado a espectrometria de massa (MS) (Waters™ ACQUITY), e um sistema de ICP-MS para análise dos elementos vestigiais (PlasmaQuantMS). Na área de autoimunidade este setor possui aparelhos de imunofluorescência indireta (IFI) ZENIT Pro, dois instrumentos Phadia™ ImmunoCAP® 250 que realizam imunoensaios de fluorescência, um instrumento EUROBlotOne que realizam imunoblots. Na área da alergologia o setor possui o instrumento Phadia™ 1000, que identifica e quantifica reações alérgicas. Além

disso, neste setor também se realiza o rastreio pré-natal, recorrendo aos instrumentos B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer e AutoDELFIA®.

Neste setor foi possível contactar com o ambiente de um laboratório de análises mais raras e com a sua automação durante 1 semana (~40 horas). Foi possível observar a manutenção do equipamento dos analisadores, programar controlos de qualidade e calibrações, e fazer análise das amostras e também realizar algumas técnicas manuais.

5.2.1. IMUNOENSAIOS

Os aparelhos IDS-iSYS e Snibe MAGLUMI X3 são instrumentos de imunologia com módulos de deteção de quimiluminescência/espectrofotometria. Nestes instrumentos podem ser realizadas quantificações de diversas moléculas, entre as quais, hormonas, marcadores de inflamação, drogas, entre muitos outros. No setor das análises especiais as análises feitas nestes aparelhos estão especificadas na Tabela 14^{30,31}.

Tabela 14 – Análises realizadas nos instrumentos IDS-iSYS e MAGLUMI X3, valores de referência em adultos e importância clínica destas^[30,31].

Aparelho	Analito	Valores de referência em adultos ^[30,31]	Importância clínica
IDS-iSYS	Aldosterona	3,7 – 43,2 ng/dL	Avaliação de síndromes relacionados à hipertensão.
	Renina	5,3 – 99,1 µIU/mL	
	1,25 (OH) ₂ Vitamina D	36,5 – 216,2 pmol/L	Avaliação da suficiência de vitamina D.
	17-OH-Progesterona	♂ < 50 anos = 0,32 – 3,32 ng/mL > 50 anos = 0,40 – 2,39 ng/mL ♀ < 50 anos = 0,35 – 4,13 ng/mL > 50 anos = 0,32 – 2,72 ng/mL	Diagnóstico e tratamento de várias patologias das glândulas adrenais ou ovários.
MAGLUMI X3	Testosterona livre	♂ 18 - 39 anos = 12,3 – 46,6 pg/mL 40 - 59 anos = 9,57 – 40,6 pg/mL > 60 anos = 7,72 – 31,4 pg/mL ♀ < 40 anos < 5,45 pg/mL > 40 anos < 4,43 pg/mL	Diagnóstico de distúrbios de hormonas sexuais masculinas, e hirsutismo e virilização femininas.

5.2.2. ELISA

Os instrumentos TRITURUS®, EUROIMMUN Analyzer I-2P, e DYNEX DS2® são analisadores automatizados de placas de ELISA que realizam todos os passos das reações, incluindo diluição das amostras, dispersão dos reagentes, leitura da placa e cálculo dos resultados (Tabela 15)³²⁻³⁴.

Tabela 15 – ELISA realizadas nos instrumentos TRITURUS®, EUROIMMUN Analyzer I-2P, e DYNEX DS2® e sua importância clínica¹.

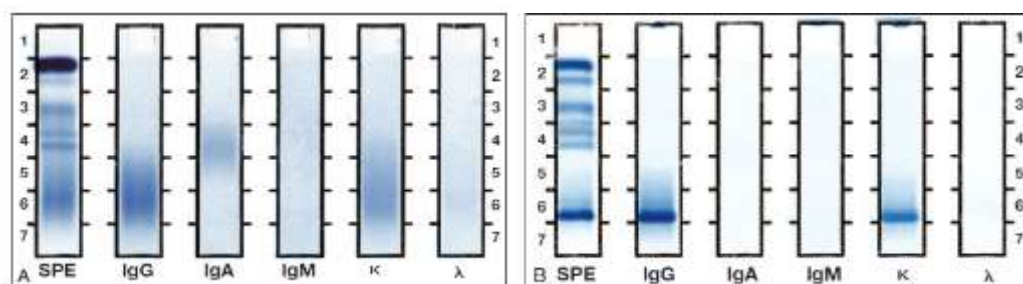
Analito	Importância clínica
DHEA	Diagnóstico de distúrbios de hormonas sexuais masculinas, e hirsutismo e virilização femininas.
Anti- <i>Chlamydia trachomatis</i> (IgG e IgM)	Diagnóstico de infecção crónica ou persistente de <i>C. trachomatis</i> .
Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (IgG e IgA)	Diagnóstico de infecção por <i>H. pylori</i> .
PAI-1	Identificação de deficiência ou elevação de PAI-1, e diagnóstico de alterações na fibrinólise.
Elastase	Avaliação da função pancreática.
DHT	Diagnóstico de distúrbios de hormonas sexuais masculinas, e hirsutismo e virilização femininas.
Anticorpos IgG contra polissacarídeos capsulares de Pneumococos	Medir resposta de anticorpos a vacinas contra Pneumococos.
CTX-1	Marcador de reabsorção óssea.
Imunocomplexos que ligam C1q	Avaliação de doenças autoimunes e doenças do complemento.
Anticorpos anti-insulina	Diagnóstico de diabetes mellitus insulínico dependente.
Anticorpos anti-GAD	Diagnóstico de diabetes mellitus insulínico dependente.
Anticorpos anti-transportador de zinco 8	Diagnóstico de diabetes mellitus insulínico dependente.
IFN-γ	Teste indireto para infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Anticorpos contra recetores de fosfolipase A2	Diagnóstico de glomerulonefrite membranosa primária.
Anticorpos anti-IA2	Diagnóstico de diabetes mellitus insulínico dependente.
Anti-Toxocara (IgG)	Diagnóstico de toxocaríase.
Proteína inibidora de C1	Diagnóstico de deficiência de proteína inibidora de C1 congénita ou adquirida.
Vírus da Hepatite C (IgM)	Monitorização de pacientes com hepatite C crónica que são submetidos a tratamentos anti-virais.

CTX-1- Fragmento telopeptídico C-terminal; DHEA - Desidroepiandrosterona; DHT - Dihidrotestosterona; GAD – descarboxilase do ácido glutâmico; IA2 – tirosina fosfatase; IFN-γ – Interferão gama; PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogénio 1.

5.2.3. IMUNOFIXAÇÃO

O instrumento da Sebia HYDRASYS 2 é um analisador multifuncional para eletroforese em gel³⁵. O aparelho realiza todas as etapas da eletroforese e é utilizado no setor das análises especiais para realizar imunofixação do soro e da urina para detetar e identificar imunoglobulinas com características monoclonais ou policlonais. Esta técnica é realizada principalmente para investigar suspeita de gamopatias mono- ou policlonais, que podem surgir devido a um mieloma ou distúrbio linfoproliferativo de células B^{1,36}.

Nesta técnica, as proteínas da amostra são separadas e incubadas com anticorpos específicos contra as cadeias pesadas gamma (IgG), alfa (IgA), e mu (IgM), e contra as cadeias leves kappa e lambda. Os imunoprecipitados são corados com violeta ácido e os padrões interpretados como mono- ou policlonais^{1,36}.



SPE – todas as proteínas da amostra que reagem com o violeta ácido; IgG – reagiu com anti-IgG; IgA - reagiu com anti-IgA; IgM – reagiu com anti-IgM; κ – reagiu com anti-kappa; λ - reagiu com anti-lambda.

Figura 1 – Padrão de imunoglobulinas monoclonais (IgG) em imunofixação de proteínas do soro. (A) Padrão normal de imunoglobulinas; (B) Imunoglobulinas IgG-κ monoclonal no soro. Adaptado de Mcpherson & Pincus (2017)¹.

5.2.4. Siemens BN Prospec®

Instrumento para determinações quantitativas, completamente automatizadas, de proteínas do soro, plasma, urina, e líquido cefalorraquidiano, por meio de análise nefelométrica^{20,37}. Os analitos estudados com este aparelho estão resumidos na Tabela 16.

Tabela 16 – Parâmetros analisados por nefelometria no instrumento BN Prospec®, valores de referência em adultos e importância clínica destes^{1,20}.

Analito	Valores de referência em adultos ^[1,20]	Importância clínica
Albumina	35,0 – 52,0 g/L Urina = 30 mg/L	Diagnóstico e monitorização da função hepática, síndromes de perda proteica e estado nutricional.
Alipoproteína E	0,023 – 0,063 g/L	Diagnóstico de hipo- e hiperproteinemia congênita.
Anti-Estreptococos-DNase B	< 200 U/mL	Diagnóstico e monitorização de doenças causadas por bactérias pertencentes ao gênero <i>Streptococcus</i> .
Apolipoproteína A-I	♂ = 0,90 -1,70 g/L ♀ = 1,08 – 1,85 g/L	Avaliação de risco de doenças cardiovasculares.
Apolipoproteína B	♂ = 0,45 – 1,39 g/L ♀ = 0,51 – 1,28 g/L	
Cadeias livres leves (do tipo kappa e lambda)	Kappa = 6,7 – 22,4 mg/L Lambda = 8,3 – 27,0 mg/L	Diagnóstico e monitorização do mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström e amiloidose.
Ceruloplasmina	0,2 – 0,6 g/L	Diagnóstico de perturbações do metabolismo

		do cobre.
Cistatina C	0,62 – 1,11 mg/L	Diagnóstico e monitorização da doença renal.
Fator do complemento C3/C3c	0,9 – 1,8 g/L	Diagnóstico e monitorização de perturbações associadas ao complemento.
Fator do complemento C4	0,1 – 0,4 g/L	
Fator do complemento C5	71,3 – 132 IU/mL	
Fibrinogénio	1,80 – 3,50 g/L	Diagnóstico de deficiência de fibrinogénio ou disfibrinogemia.
Haptoglobulina	0,3 – 2,0 g/L	Diagnóstico de hemólise e anemia hemolítica.
IgG	7,0 – 16,0 g/L	Diagnóstico e monitorização de imunodeficiências e gamopatias.
IgG da subclasse 1	4,05 – 10,11 g/L	Diagnóstico e monitorização de imunodeficiências
IgG da subclasse 2	1,69 – 7,86 g/L	
IgG da subclasse 3	0,11 – 0,85 g/L	
IgG subclasse 4	0,03 – 2,01 g/L	
Inibidor de C1	0,18 – 0,32 g/L	Diagnóstico de deficiências de inibidor C1 congénitas ou adquiridas.
Pré-albumina	0,2 – 0,4 g /L	Diagnóstico e monitorização de desnutrição proteica.
Proteína amiloide A sérica (SAA)	< 6,4 ng/L	Diagnóstico e monitorização de perturbações inflamatórias e infecciosas.
Recetor solúvel da transferrina (sTfR)	0,76 – 1,76 mg/L	Diagnóstico de deficiência de ferro e hipereritropoiese.
Transferrina deficiente em hidratos de carbono (CDT)	28,1 – 76,0 mg/L	Identificação de consumo de álcool elevado e crónico.
α 1-Antitripsina	0,9 – 2,0 g/L	Diagnóstico de deficiência de α 1-antitripsina.
α 1-glicoproteína ácida (AAG)	0,5 – 1,2 g/L	Diagnóstico e monitorização de perturbações inflamatórias e infecciosas.
α 2-macroglobulina	1,3 – 3,0 g/L	Diagnóstico diferencial de hematúria.

1. Nefelometria

Tal como a turbidimetria, a nefelometria baseia-se na dispersão de radiação por partículas em suspensão. Mas, contrariamente à turbidimetria, deteta a luz que é dispersa ou refletida a ângulos que não o diretamente oposto à luz incidente, entre 15 a 90°, por isso são mais sensíveis. Um nefelómetro comum inclui uma fonte de luz, um monocromador, uma zona para colocar a cuvette com amostra e um fotodetector. A quantidade de luz dispersa depende do comprimento de onda da luz e o tamanho das partículas. A um comprimento de onda constante, a quantidade de luz dispersa é proporcional à concentração das macromoléculas. A nefelometria é comumente aplicada na medição de complexos anticorpo-antígeno^{1,2}.

5.2.5. PlasmaQuant MS

O instrumento Plasma Quant MS é um sistema de *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS) utilizado para determinar as concentrações de vários oligoelementos e elementos vestigiais, entre eles, o alumínio, o arsênio, o cobre, o iodo, o manganês e o zinco.

1. Espetrometria de Massa

Um espectrômetro de massa ou MS (Mass Spectrometry) é um instrumento analítico que primeiro fragmenta e ioniza as moléculas e depois separa-as num espectro. O espectro de massa representa a massa dos fragmentos resultantes e a sua abundância relativa. Uma vez que a fragmentação das moléculas em iões depende da natureza das suas ligações, o padrão do espectro de massa de um certo composto é considerado uma “impressão digital” deste. Desta feita, esta técnica permite analisar uma mistura de espécies moleculares e identificar os seus constituintes através dos seus rácios m/z e recorrendo ao uso de bibliotecas de espectros.

Todos os espectrômetros de massa têm três constituintes básicos: uma fonte de iões, um analisador de massa e um detetor de iões. Em MS, as moléculas em solução são convertidas num fluxo de iões que são separadas pelo seu rácio massa/carga (m/z). Seguidamente, dá-se a contagem do número de iões de cada tipo ou a medição da corrente destes, e esta é proporcional à concentração destes.

Antes de um composto ser quantificado por MS, deve ser isolado por outro método. Alguns espectrômetros de massa são acoplados a um sistema de cromatografia líquida e realizam separações em tandem (LC-MS/MS): uma etapa de ionização suave adicional permite a separação dos iões formados inicialmente, que são depois identificados pelos padrões de fragmentação.

No caso da técnica de ICP-MS, o plasma de argónio acoplado indutivamente é a fonte de ionização das amostras. O soro ou plasma são atomizados por completo para que sejam formados iões de carga única, que são depois separados e quantificados pelo espectrômetro de massa. Esta técnica é altamente sensível e específica, e é o método de referência para a quantificação de elementos.

5.2.6. HPLC

Os sistemas HTA, Shimadzu Nexera, e Gilson® VERITY 271 são todos instrumentos de HPLC usados neste setor para quantificar os analitos da Tabela 17. Estes sistemas possuem três módulos principais: um Autosampler, um sistema de bomba mecânica com uma coluna de separação e um detetor. No instrumento Shimadzu Nexera encontra-se acoplado um detetor de espectrofotometria, nos aparelhos HTA e Gilson® VERITY 271 os detetores são amperómetros.

Tabela 17 – Analitos estudados em cada um dos sistemas de HPLC, qual a amostra a analisar para cada, valores de referência em adultos e importância clínica¹.

Aparelho	Analito	Amostra	Valores de referência em adultos	Importância clínica
Shimadzu Nexera	Vitamina B1	Sangue total	66,5 - 200 nmol/L	Diagnóstico e monitorização de deficiências ou excesso de vitaminas.
	Vitamina B6	Sangue total / plasma	Plasma = 15 – 73 nmol/L Sangue total = 35 – 110 nmol/L	
	Vitamina A	Soro / plasma	1,05 – 2,45 µmol/L	
	Vitamina E	Soro / plasma	12 -42 µmol/L	
	Vitamina B2	Sangue total	137 – 370 µg/L	
	Porfirinas	Urina	12 – 36 nmol/24h	Auxilia diagnóstico de envenenamento por chumbo, síndrome de Dubin-Johnson e diversas porfirias.
	Drogas antiepiléticas	Soro / plasma	-	Monitorização de fármacos.
	Antifúngicos (itraconazol, paraconzol e variconazol)	Soro / plasma	-	
	Ácido hipúrico, ácido metil-hipúrico, ácido mandélico e ácido fenilglicoxílico	Urina	-	Monitorização de pessoal exposto a tolueno, xileno e estireno.
HTA	β-Carotenos	Soro / plasma	40 – 322 ng/mL	Monitorizar níveis de β-Carotenos
	Epinefrina	Urina	4-20 µg/24h	Auxiliar no diagnóstico e monitorização de feocromocitomas.
	Norepinefrina	Urina	23 – 105 µg/24h	
	Dopamina	Urina	62 – 446 µg/24h	
	Metanefrinas	Urina	♂ < 1,9 µmol/24h ♀ < 1,4 µmol/24h	
	VMA	Urina	1,6 – 7,2 mg/24h	
	HVA	Urina	1,82 – 6,92 mg/24h	
	5-HIAA	Urina	2 – 8 mg/24h	
Gilson® VERITY 271	Serotonina	Soro / plasma / sangue total	Soro = 227 – 1135 nmol/L Plasma = 284 – 1873 nmol/L Sangue total = 385 - 1319 nmol/L	Monitorização de pacientes com suspeita de tumores secretores de serotonina.

5-HIAA – Ácido 5-hidroxi indol acético; HVA - Ácido homovanílico e ácido; VMA - Ácido vanilmandélico.

O Waters™ ACQUITY é um aparelho de HPLC acoplado a um espectrômetro de massa que é utilizado para a quantificação de metanefrinas e vitamina C em amostras de plasma e soro, respetivamente (Tabela 18).

Tabela 18 – Analitos estudados no Waters™ ACQUITY, valores de referência em adultos e importância clínica¹.

Analito	Valores de referência em adultos ^[1]	Importância clínica
Metanefrinas	0,04 – 0,45 nmol/L	Auxiliar no diagnóstico e monitorização de feocromocitomas
Vitamina C	23 – 85 µmol/L	Diagnóstico de deficiências ou excesso de vitamina C.

5.2.7. ZENIT Pro

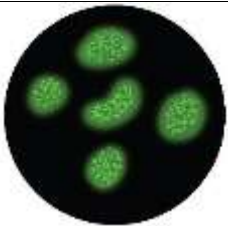
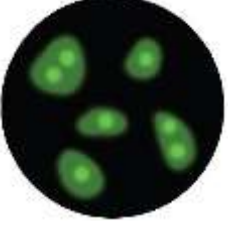
O ZENIT Pro é um instrumento automatizado para realização da técnica: Imunofluorescência indireta (IFI). O aparelho realiza a preparação completa das lâminas, além de tirar as fotografias e analisar os padrões nestas³⁸.

Esta é a técnica de referência para analisar o padrão de anticorpos antinucleares (ANA). Estes são anticorpos dirigido contra componentes nucleares das células. Um teste de ANA por imunofluorescência em células Hep-2 é solicitado em pacientes com suspeita de doença autoimunes, mais comumente em suspeita de lúpus eritematoso disseminado ou cirrose biliar primária^{1,39,40}.

Num ensaio de imunofluorescência indireta, o soro do paciente é incubado com as células Hep-2, seguido pela junção de anti-globulina humana marcada com fluoresceína. O padrão de imunocomplexos de ANA que se observa na lâmina é característico de certas doenças autoimunes (Tabela 19). Após resultados positivos, diluições em série fornecem uma estimativa da força da reação autoimune^{1,39,40}.

Tabela 19 – Padrão observado de imunofluorescência indireta e qual os antígenos e doenças associados a cada padrão. Adaptado de Nosal et al. (2022)³⁹.

Padrão em IFI	Natureza do antígeno	Doença associada
 Homogêneo	dsDNA, nucleossomas, histonas	Lúpus eritematoso disseminado, lúpus induzido por drogas, artrite idiopática juvenil.

 Mosqueado	U1RNP, Ro60, Mi-2, DFS70, TIF1Y, Ku,	Doenças mistas do tecido conjuntivo, lúpus eritematoso disseminado, síndrome de Sjögren, dermatomiosite, escleroma, e síndrome de sobreposição entre esclerodermia/polimiosite.
 Envelope nuclear	Proteínas do complexo poro nucleares (exemplo: gp210)	Colangite biliar primária, lúpus eritematoso disseminado, síndrome de Sjögren, e artrites seronegativas.
 Nucleolar	Scl-100, PM-Sc	Esclerodermia, síndrome de Sjögren, e síndrome de sobreposição entre esclerodermia/polimiosite.

Se um teste de ANA for positivo, devem ser realizados testes confirmatórios e de identificação dos anticorpos, consoante o padrão obtido no ensaio IFI. Estes testes são realizados através de imunoensaios de fluorescência no instrumento ImmunoCAP® 250. Os resultados são depois confirmados por imunoblot no aparelho EUROBlotOne.

Assim como os ANA, outros anticorpos relacionados com doenças autoimunes são estudados por IFI (Tabela 20). Para a pesquisa destes anticorpos, o soro do paciente é incubado com secções de tecido de rim, estômago e fígado de rato ^{1,2}.

Tabela 20 – Anticorpos estudados por IFI e doenças associadas.

Anticorpos	Doença associada
Anti-mitocondriais (AMA)	Cirrose biliar primária.
Anti-Músculo liso (ASMA)	Hepatite crónica ativa e hepatite viral aguda.
Anti-Células parietais gástricas (AGPA)	Anemia perniciosa e gastrite crónica atrofica.
Anti-Fígado/Rim/Microsomal (LKM)	Hepatite autoimune.

5.2.8. ImmunoCAP 250

O instrumento Phadia™ ImmunoCAP® 250 realiza imunoensaios de fluorescência quantitativos de forma completamente automatizada⁴¹. Este instrumento apresenta um amplo menu de testes para avaliação de diversos marcadores de doenças autoimunes (Tabela 21). Estes aparelhos são utilizados neste setor como teste confirmatório e de identificação de autoanticorpos, após resultados positivos no instrumento ZenitPRO.

Tabela 21 – Antígenos para procura de autoanticorpos no instrumento Phadia™ ImmunoCAP® 250 e importância clínica destes^{1,2,41}.

Antígeno	Importância clínica
IgG4	Avaliar respostas imunitárias associadas à IgG4, como auxiliar para avaliar o desenvolvimento de intolerância alérgica.
IgG	Avaliar as respostas imunitárias associadas à IgG, como auxiliar para avaliar doenças alérgicas.
U1RNP	Meio auxiliar no diagnóstico clínico do Lúpus Eritematoso Sistémico e Doenças mistas do tecido conectivo.
RNP70	
Symphony ^S	Meio auxiliar no diagnóstico clínico de Lúpus eritematoso sistémico, doenças mistas do tecido conectivo, síndrome de Sjögren, escleroderma e polimiosite/dermatomiosite.
CTD	
ssDNA	Ajuda ao diagnóstico clínico de lúpus induzido por fármacos.
β2-Glicoproteína I	Apoio ao diagnóstico da síndrome anti-fosfolípido e para avaliar o risco trombótico em doentes com lúpus eritematoso sistémico.
Cardiolipina	
SmD ^P -S	Meio auxiliar no diagnóstico clínico do Lúpus Eritematoso Sistémico.
Rib-P	
PCNA	
dsDNA	
Scl-70S	
CENP	Meio auxiliar no diagnóstico clínico da esclerose sistémica (síndrome de CREST).
Ro60	Meio auxiliar no diagnóstico clínico do Lúpus eritematoso sistémico e Síndrome de Sjögren.
La	
anti-TSH-R	Auxiliar no diagnóstico clínico da doença de Graves (hipertiroidismo autoimune).
PR3 ^S	Suporte ao diagnóstico clínico da granulomatose com poliangíte.
PM-Sc	Auxílio ao diagnóstico clínico da síndrome de Overlap da poliomiosite/escleroderma.
Células parietais	Ajuda no diagnóstico de anemia perniciosa.
Fator intrínseco	
MPO ^S	Meio auxiliar no diagnóstico clínico da poliangite microscópica.
Mi-2	Diagnóstico clínico da miosite idiopática (autoimune).
M2	Ajuda no diagnóstico clínico de colangite biliar primária.
Jo-1	Auxiliar no diagnóstico clínico das miopatias inflamatórias idiopáticas.
Gliadina ^{DP}	Apoio ao diagnóstico de doença celíaca.
Celikey	
GBM	Meio auxiliar no diagnóstico clínico da síndrome de Goodpasture e na doença Glioblastoma multiforme.
DFS70	Auxiliar na avaliação de doenças do tecido conjuntivo.
Calprotectina	Meio auxiliar ao diagnóstico clínico das Doenças Inflamatórias Intestinais.
CCP	Auxiliar no diagnóstico clínico da artrite reumatoide.
ASCA	Medição de anticorpos direcionados às mananas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Auxiliar no diagnóstico clínico da doença de Crohn.

ASCA- Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*; CCP - Anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico; CENP – anticorpos anti centrómeros; CTD – doença do tecido conjuntivo; DFS70 – anticorpos anti-*Dense Fine Speckled*, peso molecular 70kDa; dsDNA – DNA dupla cadeia; GBM – Glioblastoma multiforme; M2 – anticorpos anti-mitocôndria 2 ; Mi-2 – anticorpos anti-sintetase; MPO – anticorpos anti-mieloperoxidase; PCNA – anticorpos anti-células proliferativas; PR3 – anticorpos anti-proteinase 3; Rib-P – anticorpos anti-proteína P ribossomal; SMD – síndrome mielodisplásica; ssDNA – DNA cadeia simples; TSH-R – recetor da TSH.

5.2.9. EUROBlotOne

O EUROBlotOne é um aparelho para o processamento automático de imunoblots. O sistema realiza todos os passos, incluindo as diluições e os passos de incubação e lavagem⁴². Este aparelho é utilizado no setor das Análises Especiais para realizar testes confirmatórios para doenças autoimunes, para identificar intolerâncias alimentares e para auxiliar no diagnóstico de algumas infeções (Tabela 22).

Tabela 22 – Perfis estudados por imunoblot, os autoanticorpos ou anticorpos de intolerância que cada deteta e importância clínica de cada^{2,42}.

Perfil	Deteta	Importância clínica
Perfil AMA	Deteta auto-anticorpos contra os antígenos do fígado (AMA-M2, -M2-3E, -M4 e -M9)	Auxilia no diagnóstico de colangite biliar primária.
Perfil ANA	Deteta 16 autoanticorpos nucleares, citoplasmáticos e mitocondriais – abordagem multiplex para a deteção de autoanticorpos numa única reação (nRNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleosomas, histonas, rib. P-prot., AMA-M2, DFS70)	Auxiliar no diagnóstico de síndrome de Sharp, Lúpus sistémico eritematoso (SLE), Síndrome de Sjögren's, esclerose sistémica e colangite biliar primária.
Doenças autoimunes do fígado	Deteta 9 auto-anticorpos relevantes para patologias hepáticas (AMA-M2, -M2-3E, Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, Ro-52)	Auxilia no diagnóstico de colangite biliar primária e hepatite autoimune.
Esclerose Sistémica (núcleo)	Abordagem multiplex para detetar auto-anticorpos associados com esclerose sistémica (CENP A, CENP B, RP11, RP155, fibrilarina, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52).	Auxiliar no diagnóstico de esclerose sistémica.
Miopatias inflamatórias autoimunes	Abordagem multiplex para detetar autoanticorpos relevantes para miosite (Zo, Ks, Há, cN-1A, Ro-52, OJ, EJ, PL-12, PL-7, SRP, Jo-1, PM-Scl75, PM-Scl100, Ku, SAE1, NXP2, MDA5, TIF1γ, Mi-2β, Mi-2α).	Auxiliar no diagnóstico de miopatias inflamatórias idiopáticas.
Síndromes paraneoplásicas neurológicas (SPN)	Deteta 12 autoanticorpos relevantes para SPN (anfifisina, CV2, PNMA2 (Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu, recoverina, SOX1, titina, zic4, GAD65 e Tr (DNER)).	Auxiliar no diagnóstico de síndromes paraneoplásicas neurológicas.
Anti-Echinococcus	Deteta autoanticorpos contra lisados totais de Echinococcus além de anticorpos contra os antígenos Em95, Em18 e EgAgB.	Teste confirmatório após obtenção de um resultado positivo de serologia. Distingue entre infeções por <i>Echinococcus granulosus</i> e <i>E. multiloculares</i> .
Anti-gangliosídeos.	Deteta autoanticorpos contra 7 gangliosídeos (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b e GQ1b).	Auxilia no diagnóstico de neuropatias periféricas incluindo: síndrome de Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica (PDIC), neuropatia motora multifocal,

		neuropatia sensitiva e síndrome de Miller-Fisher.
Intolerância alimentar	Deteta anticorpos IgG específicos para comida e aditivos alimentares.	Diagnóstico de reação de hipersensibilidade contra alimentos ou aditivos alimentares.

1. Imunoblot

Na técnica de imunoblot, membranas impregnadas com antígenos são usadas como fase sólida para a reação antígeno-anticorpo. Se o paciente contém os anticorpos específicos, estes ligam a membrana. Seguidamente, um segundo anticorpo conjugado e marcado é adicionado à reação. Se a amostra contém os anticorpos alvo, o respetivo poço apresenta cor e a intensidade desta é proporcional à concentração do anticorpo na amostra^{1,43}.

5.2.10. ALERGOLOGIA

O instrumento Phadia™ 1000 é dedicado, no setor das Análises Especiais, ao auxílio do diagnóstico de doenças alérgicas. Este aparelho realiza automaticamente o imunoensaio qualitativo e semi-quantitativo para determinação de anticorpos IgE específicos de alérgenos inalantes ou alimentares. Este instrumento permite analisar mais de 550 alérgenos completos e misturas e 100 componentes de alérgenos. Valores de $\geq 0,35$ kU/L normalmente são considerados como tendo significância clínica⁴⁴.

5.2.11. RASTREIO PRÉ-NATAL

O rastreio pré-natal é um rastreio precoce, não invasivo, feito durante o primeiro e o segundo trimestres das gravidezes, de forma a avaliar o risco de existência no feto de trissomia 21 (Síndrome de Down), trissomia 18 (Síndrome de Edwards) e trissomia 13 (Síndrome de Patau). O rastreio combina informação sobre a idade materna, o exame ecográfico e o exame bioquímico. No primeiro trimestre são quantificados dois marcadores biológicos no soro materno: gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) e proteína A do plasma associada à gravidez (PAPP-A). No segundo trimestre, são quantificados até quatro marcadores: Alfa-fetoproteína (AFP), gonadotrofina coriônica humana (hCG) (=teste duplo), estriol não conjugado (uE3) (=teste triplo) e inibina A (=teste quádruplo). O cálculo do risco individual é depois efetuado através do software B.R.A.H.M.S Fast Screen pre I plus⁴⁵, e as mulheres são triadas em grupos de baixo, médio ou alto risco. A testagem invasiva está indicada para mulheres com risco individual aumentado^{1,2}.

Na secção do rastreio pré-natal do setor das Análises Especiais, estes analitos são quantificados usando os instrumentos B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer e

AutoDELFIA®. Estes aparelhos são ambos imunoanalisadores automatizados^{46,47}. O AutoDELFIA® é utilizado para rastrear os marcadores AFP, β -hCG e PAPP-A em amostras de sangue seco, enquanto o B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer é usado para analisar os marcadores em amostras de soro como especificado na Tabela 23.

Tabela 23 – Testes bioquímicos do rastreio pré-natal, trimestre em que são realizados, instrumento utilizado na análise e importância clínica^{1,46,47}.

	Analito	Aparelho	Importância Clínica
1º trimestre	β -hCG	AutoDELFIA® e B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer	Auxiliar na avaliação não invasiva do risco de trissomia 21, 18 e 13 fetal.
	PAPP-A	AutoDELFIA® e B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer	Auxiliar na avaliação não invasiva do risco de trissomia 21, 18 e 13 fetal. Também avalia o risco de desenvolver pré-eclampsia.
	PIGF	B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer	Avalia o risco de desenvolver pré-eclampsia. Auxiliar na avaliação não invasiva do risco de trissomia 21 fetal, quando não é possível realizar medições de translucência nuchal.
2º trimestre	β -hCG	AutoDELFIA® e B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer	Auxiliar na avaliação não invasiva do risco de Trissomia 21.
	AFP	AutoDELFIA® e	
	uE3	B.R.A.H.M.S KRYPTOR Analyzer	

AFP – Alfa-fetoproteína; β -hCG – subunidade beta da fração livre da gonadotrofina coriônica humana; uE3 – estriol não conjugado; PIGF – fator de crescimento placentário.

6. IMUNOHEMOTERAPIA

O setor da Imunohemoterapia realiza testes de identificação de grupos sanguíneos, provas de Coombs tanto direta como indireta, e realiza os testes de compatibilidade e prepara unidades de componentes sanguíneos para transfusão. O laboratório da Unilabs possui acordo com o IPST (Instituto Português do Sangue e da Transplantação) e com vários hospitais. Estes hospitais requerem unidades de transfusão para cirurgias e outros procedimentos, enviando uma amostra de sangue do paciente que é estudada e compatibilizada com unidades que foram obtidas do IPST.

No período de 2 semanas (cerca de ~80 horas) que passei neste setor, foi possível acompanhar as várias etapas dos diferentes testes e preparação de unidades de transfusão, incluindo preparar as amostras de sangue e programar os respetivos testes nos instrumentos ORTHO Vision e ORTHO Vision Swift, além da realização de testes manuais confirmatórios.

6.1. GRUPOS SANGUÍNEOS

Muitas moléculas expressas na membrana das células sanguíneas apresentam características antigénicas, e têm capacidade de reagir com anticorpos do complemento ou recetores celulares. Desta forma, estão descritos 12 sistemas de antígenos que definem o tipo sanguíneo de um indivíduo e que são considerados clinicamente relevantes no serviço de transfusão, entre eles o sistema ABO e o sistema Rh. A maioria destes genes está localizada em cromossomas autossómicos e é herdada de acordo com as regras de Mendel. A maioria desses alelos também demonstram codominância^{1,48}.

O grupo ABO é o único sistema sanguíneo em que os indivíduos já têm anticorpos no soro contra os antígenos que estão ausentes nos seus eritrócitos, sem exposição prévia⁴⁸.

O grupo Rh refere-se a um sistema de grupo sanguíneo complexo composto por 61 antígenos diferentes. Contrariamente ao que acontece com o grupo ABO, os anticorpos Rh são produzidos apenas após exposição. O Rh é muito importante em termos de reações transfusionais hemolíticas e na doença hemolítica do feto e recém-nascido, uma vez que o alelo D deste grupo é muito imunogénico. O termo Rh positivo ou negativo descrevem a presença ou ausência, respetivamente, do antígeno D^{1,48}.

Prova direta é definida como usar soros conhecidos de origem comercial para detetar os anticorpos nos eritrócitos, enquanto a prova indireta é definida como detetar os anticorpos ABO no soro do paciente usando células vermelhas de fenótipo conhecido (Tabela 24)⁴⁸.

Tabela 24 – Antígenos presentes na superfície dos eritrócitos e anticorpos presentes no plasma de cada grupo dos sistemas ABO e Rh⁴⁸.

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O	Rh +	Rh -
Antígeno no eritrócito	Antígeno A	Antígeno B	Antígenos A e B	-	Antígeno D	-
Anticorpos no plasma	Anti-B	Anti-A	-	Anti-A e Anti-B	-	Anti-D

Os grupos sanguíneos são determinados, tanto pela prova direta como pela indireta, por aglutinação em cards ORTHO BioVue®, que são preparados e analisados automaticamente nos aparelhos ORTHO Vision^{49,50}.

6.2. PROVA DE COOMBS

O teste de anti-globulina humana, também denominado prova de Coombs, pode ser usado para detetar anticorpos ligados a eritrócitos (prova de Coombs direta) ou detetar a reação de anticorpos e eritrócitos após uma fase de incubação apropriada (prova de Coombs indireta)^{1,48}.

A prova de Coombs direta é usada para investigar a doença hemolítica do feto ou recém-nascido, reações transfusionais hemolíticas, anemia hemolítica autoimune, ou hemólise induzida por drogas⁴⁸.

A prova de Coombs indireta, por outro lado, é utilizada em provas de compatibilidade (para identificar a presença de anticorpos que possam aglutinar com eritrócitos de dadores) ou para determinar o fenótipo dos eritrócitos usando anti-soros conhecidos⁴⁸.

A prova de Coombs é realizada de modo automático no ORTHO Vision. Se a prova de Coombs indireta for positiva, os anticorpos são identificados usando painéis da Ortho Clinical Diagnostics^{50,51}.

6.3. TRANSFUSÕES

Uma etapa crítica na preparação pré-tranfusional é a colheita e identificação adequadas da amostra de sangue do recetor e da unidade de transfusão⁴⁸.

O teste pré-transfusão de rotina consiste, inicialmente, na tipagem ABO e Rh e a prova de Coombs indireta. Se a prova de Coombs indireta for positiva, os anticorpos devem ser identificados, como mencionado acima. Os resultados destes testes devem ser comparados com o histórico do paciente, se disponíveis⁴⁸.

A etapa final, compatibiliza-se os tipos sanguíneos, realizando uma prova cruzada. O soro do recetor é misturado com uma amostra da unidade de transfusão para verificação final da compatibilidade ABO e deteção de anticorpos não identificados⁴⁸.

Todas estas provas são realizadas nos instrumentos ORTHO Vision⁵⁰.

7. MICROBIOLOGIA

O setor da microbiologia é responsável pelos estudos bacteriológicos, micológicos e parasitológicos. O setor está dividido em três secções principais: secção de sementeiras

de urinas e outros produtos biológicos, secção de identificação e antibiogramas e secção de validação de resultados.

Durante 2 semanas (cerca de 80 horas), foi possível passar pelas diferentes secções do setor e participar e visualizar diferentes etapas: colocação de tubos de urina do tipo II na cadeia automatizada de análise; visualização do processo de sementeira de diversos produtos biológicos e realização de algumas sementeiras de urina; visualização e participação na identificação dos microrganismos por MALDI-TOF; visualização da preparação dos antibiogramas e interpretação de resultados de sementeiras e antibiogramas.

O foco desta secção do relatório caíra principalmente no estudo bacteriológico, uma vez que este é o mais comum na área da microbiologia. No entanto, o exame micológico segue uma sequência de testes semelhantes. O exame parasitológico trata-se, normalmente, da visualização da amostra fresca a microscópio.

7.1. EXAME CULTURAL

Os meios de cultura são selecionados de modo a fornecer as condições ideais para o crescimento de agentes patogénicos mais comumente encontrados no tipo específico de amostra que se pretende analisar. Assim, os meios selecionados podem incluir meios seletivos e diferenciais, além do meio de enriquecimento padrão⁵².

As culturas bacterianas são geralmente incubadas a 35°C e são analisadas inicialmente após 18h a 24h de incubação. Algumas bactérias exigem uma temperatura mais elevada (exemplo, *Campylobacter* spp.), outras exigem a adição de 5-10% de dióxido de carbono na estufa e algumas têm de ser incubadas em sistema de cultura anaeróbio⁵².

As placas ou tubos de culturas micológicas devem ser incubados a 25°-30°C. Nos casos em que há forte suspeita de fungos endémicos, a incubação a 37°C deve ser considerada, para recuperar a fase leveduriforme dos fungos dimórficos. A maioria dos fungos cresce em meio Sabouraud dentro de um período de incubação de 2 semanas, mas alguns fungos podem demorar até 28 dias⁵².

Após a sementeira e incubação, há interpretação do crescimento da placa: contabilizados o número de colónias ($<10^3$, 10^3 , 10^4 , ou $>10^5$), avaliada a pureza da cultura (se esta é pura ou polimicrobiana), e a sua significância clínica (comparação do resultado da cultura com o histórico do doente e os valores do sedimento urinário).

Culturas puras vão logo para a zona de identificação e de realização de antibiograma. Culturas polimicrobianas que tenham predomínio de uma bactéria que possa ter interesse clínico são isoladas, a que se procede a identificação e o respetivo antibiograma, sendo o resultado reportado com o comentário “a valorizar clinicamente” e com indicação que o crescimento era polimicrobiano com predomínio da bactéria identificada.

7.2. IDENTIFICAÇÃO

7.2.1. Coloração de Gram e Ziehl-Neelsen

O exame direto de uma amostra com coloração de Gram fornece informações que ajudam a avaliar a qualidade da amostra e a valorizar os organismos do exame cultural. Nesta coloração, os organismos que possuem parede celular gram-positiva resistem à descoloração pelo metanol e retêm a cor roxa do corante violeta cristal. Por outro lado, os organismos gram-negativo são descolorados pelo metanol e apresentam a cor do segundo corante vermelho, a safranina. Os esfregaços das amostras são realizados manualmente, mas os passos da coloração são realizados no instrumento Aerospray® Gram Slide Stainer/Cytocentrifuge^{52,53}.

A coloração de Ziehl-Neelsen é usada para identificar micobactérias e outros organismos ácido resistentes. Estes organismos são corados com carbolfuscina básica e resistem à descoloração com soluções ácido-alcálinas. O fundo é contrastado com azul de metileno, fazendo com que os organismos ácido-resistentes apareçam a vermelho contra um fundo azul-claro. Os esfregaços das amostras são realizados manualmente, mas os passos da coloração são realizados no instrumento Aerospray® TB Slide Stainer/Cytocentrifuge^{52,54}.

7.2.2. MALDI-TOF

A identificação dos organismos isolados nas placas é realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*), no instrumento MALDI MBT Smart da Bruker^{55,56}. Esta é uma técnica rápida e poderosa para identificação de microorganismos. Uma amostra de colónia pura é colocada num *biotarget* e de seguida colocada na matriz, sendo o *target* inserido no equipamento e por ação do laser, ionizada, e os fragmentos separados no espectro de massa. Como mencionado anteriormente, o padrão de espectro de massa trata-se de uma “impressão digital” das moléculas na amostra, e a comparação dos espectros obtidos com bancos de

espectros identificados permite a identificação microbiana de forma rápida e com elevada sensibilidade entre estripes^{52,56}.

7.3. ANTIBIOGRAMA

Os testes de sensibilidade antimicrobiana in vitro, ou antibiogramas, são valiosos na seleção de agentes terapêuticos ativos contra o patógeno identificado. Duas formas de antibiogramas são realizadas no laboratório clínico: testes de diluição em caldo e testes de difusão em agar⁵².

Nos testes de diluição em caldo, diluições seriadas de um antibiótico são preparadas num meio com nutrientes e inoculadas com uma concentração padronizada do microrganismo. Após incubação, a concentração mais baixa de antibiótico capaz de inibir o crescimento da bactéria é referida como a concentração inibitória mínima (CIM). No setor da microbiologia, as diluições de antibióticos e inoculação são preparadas em placas de microtitulação, enquanto a incubação e interpretação das CIMs é feito de forma automatizada por aparelhos MicroScan WalkAway 96 plus^{52,57}.

O método manual com discos de difusão em agar é realizado quando há erros ou dúvidas no antibiograma por diluição em caldo. Para os testes de difusão em agar, é feita uma sementeira de concentração padronizada e, em seguida, discos ou tiras de papel impregnados com antibióticos são colocados na superfície do agar. O tamanho da área de inibição corresponde à atividade do antibiótico, quanto mais suscetível o organismo maior a área de crescimento que é inibida⁵².

7.4. ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E MEIOS DE CULTURA

7.4.1. Infecções do trato urinário

A sementeira de urina de 2º jato é feita em meio CLED (Cystine Lactose Elctrolyte Deficient), um meio diferencial para o isolamento de microrganismos causais de infeções do trato urinário. Este meio tem na sua composição lactose e azul de bromotimol, permitindo diferenciar bactérias fermentadoras de lactose (a colónia fica amarela) das não fermentadoras⁵².

Além disso, a análise microbiológica alia-se ao estudo químico da urina, nesta fase do processo. Um elevado número de leucócitos na amostra é indicativo de uma infeção, pelo que em casos com crescimento bacteriano negativo onde está presente

uma leucocitúria acentuada faz-se a realização de nova sementeira em meio de gelose chocolate. Este trata-se de um meio não-seletivo e enriquecido, modificado do meio agar sangue, onde crescem a maioria das bactérias, incluindo *Hemophilus* spp. e estirpes patogénicas de *Neisseria* spp.. Nestas amostras, realiza-se também coloração de Gram do sedimento urinário⁵².

Os principais organismos responsáveis por infeções do trato urinário são bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e Estafilococos coagulase-negativos (Tabela 25) ⁵².

Tabela 25 – Principais bactérias responsáveis por infeções do trato urinário e as suas características microscópicas (coloração de Gram) e macroscópicas (aparência em meio CLED)⁵².

	GRAM	Aparência em CLED
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram negativos	Colónias amarelas, opacas. Meio amarelo
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilos Gram negativos	Colónias azul-transluzente. Meio azul-esverdeado a azul
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gram negativos	Colónia amarela a branca-azulada, bastante mucoide. Meio amarelado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos Gram negativos, tipicamente aos pares	Colónias verdes, opacas e periferia irregular. Meio azul
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos Gram positivos em pares	Pequenas colónias amarelas. Meio amarelo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram positivos em clusters	Colónias de amarelo profundo. Meio amarelo
Estafilococos coagulase-negativos	Cocos Gram positivos em clusters	Colónias amarelo-claro, mais opacas que <i>Enterococcus faecalis</i>

7.4.2. Infeções do trato respiratório inferior

As amostras do trato respiratório inferior são sempre sujeitas a um exame direto com coloração de lâminas com Gram e Ziehl-Neelsen. O número de leucócitos e células observado nessas colorações é de extrema importância para verificar se a colheita foi realizada corretamente e valorizar os resultados do exame cultural⁵².

Uma vez que a infeção pode ocorrer em diversos locais do trato respiratório inferior, e estes podem ser afetados por diferentes bactérias, estes produtos de expetoração são semeados em meio de gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey (Tabela 26) ⁵².

Tabela 26 – Produtos biológicos analisados para estudar infecções do trato respiratório inferior e respectivos métodos de exame direto e meios de cultura, quais os locais afetados pela infecção e principais bactérias responsáveis⁵².

Amostra	Exame direto	Sementeira em	Tipo de infecção	Bactérias mais associadas
Expetoração	Gram	Gelose sangue	Bronquite	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
	Ziehl-Neelson	Gelose chocolate	Empiema	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Estreptococos do grupo A</i>
		MacConkey	Pneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , outras <i>Enterobacteriaceae</i>

O meio de gelose de sangue trata-se de um meio não seletivo e enriquecido com dois componentes principais: um meio basal e sangue. Este meio é recomendado para o crescimento de bactérias fastidiosas e para determinar propriedades hemolíticas das colónias. A α -hemólise aparece como pigmentação esverdeada e uma zona estreita de hemólise parcial ao redor da colónia, a β -hemólise aparece como uma zona clara ao redor da colónia por haver lise completa dos eritrócitos. Isto auxilia na identificação das bactérias, uma vez que certas estirpes como *Streptococcus pneumoniae* são conhecidos por realizarem α -hemólise, enquanto os *Estreptococos do grupo A* demonstram β -hemólise. Este meio não garante o crescimento de *Haemophilus* spp., mas o meio gelose chocolate já o garante⁵².

O meio de MacConkey agar é um meio seletivo para bactérias Gram negativas e é diferencial para bactérias fermentadoras de lactose das bactérias não fermentadoras. As bactérias que fermentam a lactose produzem um ácido que precipita os sais biliares e causa uma cor vermelha na placa⁵².

7.4.3. Infecções do trato respiratório superior

As amostras do trato respiratório superior incluem os exsudados orofaríngeo, auricular e ocular (Tabela 27).

Tabela 27 – Produtos biológicos analisados para estudar infecções do trato respiratório superior e respectivos métodos de exame direto e meios de cultura, quais os locais afetados pela infecção e principais bactérias responsáveis⁵².

Amostra	Exame direto	Sementeira em	Tipo de infecção	Bactérias mais associadas
Exudado orofaríngeo	Não	Gelose de sangue CNA	Faringite, sinusite e epiglote	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .
Exudado auricular	Gram	Gelose sangue	Otite	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i>

		Gelose chocolate		<i>pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> e estreptococos do grupo A
Exudado ocular	Gram	Gelose sangue Gelose chocolate MacConkey Caldo de soja	Ocular	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , outras <i>Enterobacteriaceae</i>

O meio gelose de sangue CNA é um meio gelose sangue suplementado com colistina e ácido nalidíxico, pelo que se torna seletivo para bactérias Gram positiva (especificamente estafilococos e estreptococos)⁵².

7.4.4. Infecções gastrointestinais

As amostras de fezes são cultivadas em meio MacConkey, XLD, CAMPY, e enriquecidas em caldo Rappaport. No dia seguinte realiza-se a subcultura do caldo Rappaport para outra placa de XLD. Os principais agentes responsáveis por infecções gastrointestinais são da espécie das *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* e *coli*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*⁵².

O meio XLD é um meio moderadamente seletivo e diferencial para isolamento e cultivo de bactérias entéricas Gram negativas, principalmente para a diferenciação de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. O desoxicolato de sódio no meio inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos. As bactérias não patogénicas que crescem neste meio fermentam a lactose, sucrose e xilose do meio para produzir colónias amarelas, uma vez que *Shigella* spp. não fermenta estes carboidratos, as suas colónias têm cor vermelha. Como a maioria das *Salmonellas* produz sulfeto de hidrogénio na presença de citrato férrico de amónio, estas bactérias apresentam colónias pretas, permitindo a sua diferenciação⁵².

O meio CAMPY é um meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. Este meio tem um conjunto de agentes antimicrobianos que atuam para suprimir os organismos da flora normal. O crescimento de *Campylobacter* spp. requer uma atmosfera microaerofílica (5-7% oxigénio, 5-10% de dióxido de carbono) e temperaturas elevadas (estufa a 42°C)⁵².

7.4.5. Infecções genitais

Os exsudados cervico-vaginal e uretral usados para diagnosticar vaginoses bacterianas e uretrites. A vaginose bacteriana é caracterizada por mudanças dramáticas na flora vaginal, com a diminuição do número de lactobacilos e um crescimento elevado

de bactérias como *Gardnerella vaginalis*. A infecção por esta é caracterizada pela presença de “Clue cells”, células epiteliais cobertas de cocobacilos na coloração de Gram. Desta feita, todas as amostras são submetidas a exame direto a fresco e coloração de Gram (Tabela 28)⁵².

Tabela 28 – Produtos biológicos analisados para estudar infecções genitais e respectivos métodos de exame direto e meios de cultura⁵².

Amostra	Exame direto	Exame cultural
Exsudado cervico-vaginal	Fresco	Gelose sangue Gelose chocolate VCAT
Exsudado uretral	Gram	Gelose chocolate Gelose chocolate VCAT

O meio gelose de chocolate VCAT é suplementado com uma mistura de antibióticos (vancomicina, colistina, anisomicina e trimetoprim) que inibe os comensais naturais da flora genital e é recomendado em particular para o isolamento de estirpes de *Neisseria* spp. patogênicas, entre elas *Neisseria gonorrhoeae*, bactéria sexualmente transmissível e responsável por uretrites e cervicites. Outras bactérias responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis como *Chlamydia trachomatis* e *Treponema pallidum* não são cultiváveis e o diagnóstico é feito por testes serológicos ou PCR⁵².

Streptococcus agalactiae (Estreptococos do grupo B) é um coco Gram-positivo colonizador natural do trato genital feminino que pode ser responsável por doença neonatal (bacteremia, pneumonia e até meningite). Por isto, foi incluído no rastreio das mulheres grávidas a testagem para esta bactéria, de forma a identificar as mulheres portadoras de alto risco e iniciar o seu tratamento com profilaxia de antibióticos. Essa testagem é feita recorrendo ao teste rápido Acro Biotech Strep A.

7.4.6. Outros produtos

Para além dos produtos biológicos já mencionados, o laboratório analisa outros produtos de elevada importância (Tabela 29).

Tabela 29 – Diferentes produtos biológicos analisados na microbiologia e respectivos métodos de exame direto e meios de cultura⁵².

		Exame direto	Exame culturais
Pele e tecidos moles	Feridas superficiais	Gram	Gelose sangue, MacConkey, Manitol Salt Agar (MSA)
	Feridas profundas	Gram	Gelose sangue, MacConkey, caldo de soja
Sangue	Hemoculturas positivas	Gram	Gelose sangue

	Exsudado de cateter	Gram	Gelose sangue, MSA
Líquidos das cavidades naturais	Líquido peritoneal, pleural, pericárdico, LCR	Gram	Gelose sangue, gelose chocolate, MacConkey, caldo de soja
	Líquido sinovial	Gram	Gelose sangue, gelose chocolate, caldo de soja

O MAS (Mannitol Salt Agar) é um meio seletivo usado para o isolamento de estafilococos. Os estafilococos podem crescer na presença de uma alta concentração de sal e *Staphylococcus aureus* fermenta o manitol, produzindo coloração amarela no agar⁵².

8. URINA TIPO II

As amostras de urinas tipo II são analisadas no setor da Microbiologia. O exame de rotina feito à urina consiste em três partes: exame macroscópico/físico (cor, aspeto e odor), análise química com a tira de reagentes, e exame do sedimento urinário.

Tanto a análise química como o exame do sedimento urinário estão automatizados pelo uso da cadeia UN da Sysmex⁵⁸.

8.1. ANÁLISE QUÍMICA DA URINA

As tiras de reagentes são o método *gold standard* para a avaliação química da urina. Onde se realizam múltiplas reações químicas¹.

A leitura das tiras era tradicionalmente feita de forma manual, no entanto, estão agora disponíveis instrumentos automatizados. Os dois aparelhos UC-3500 são o primeiro passo na análise automatizada das urinas. Este aparelho aspira uma quantidade precisa de cada amostra, e aplica-a a cada espaço dedicado da tira teste, compara as cores das tiras por fotometria de refletância e dá o resultado. As tiras de reagente, Meditape UC-9A, Sysmex, avaliam parâmetros como o urobilinogénio, eritrócitos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, bilirrubina, nitritos, leucócitos e pH (Tabela 30) ^{1,58}.

Tabela 30 – Parâmetros avaliados nas tiras de reagentes, princípio da reação química que ocorre e a importância clínica dos resultados¹.

Parâmetro	Reação química e princípio	Importância clínica
pH	Indicadores vermelho metilo e azul de bromotimol – variação do espetro	Urina ácida pode ser produzida por uma dieta rica em proteínas e em pacientes

	de cores entre o laranja, verde e azul com o aumento do pH.	com acidose respiratória ou metabólica. Por outro lado, urina básica pode ser produzida com uma dieta rica em frutas cítricas, quando a função tubular está comprometida, na síndrome de Falconi e nas alcaloses metabólicas e respiratórias.
Proteínas	Azul de tetrabromofenol – Na ausência de proteínas a tira é amarela, depois da aplicação da amostra vai-se desenvolver tons de verde dependentes da concentração de proteínas presente.	Deteção de quantidades elevadas de proteínas na urina é um indicador importante de doença renal, estando presente em síndromes nefróticas, em inflamações do trato urinário e na presença de cálculos. Uma vez que um resultado positivo para proteínas na urina é tão significativo, este é confirmado por um segundo método no setor core.
Glucose	Reação enzimática sequencial: oxidase seguida de peroxidase. Há mudança da cor da tira dependendo do cromogénio específico usado na reação de peroxidase.	Glicosúria ocorre quando os níveis plasmáticos de glucose ultrapassam a capacidade de reabsorção tubular, como em situações de diabetes, síndromes endócrinas, tumor cerebral ou hemorragia cerebral, enfarte do miocárdio, infeções, doenças do fígado e obesidade.
Corpos Cetónicos	Reação da acetona e ácido acetoacético com nitroprussiato de sódio em solução alcalina dando coloração violeta à tira.	Cetonemia ou Cetonúria são comuns em diabetes mellitus não controlados e na acidose láctica.
Hemoglobina/ mioglobina	A tira reagente tem peróxido que é degradado pela atividade tipo-peroxidase da hemoglobina/mioglobina, ao mesmo tempo dá-se a oxidação de tetrametilbenzidina, que produz a cor verde na tira.	A presença de hemoglobina livre na urina (hemoglobinúria) normalmente está relacionado com hemólise intravascular significativa, como em anemias hemolíticas. A tira teste não consegue distinguir a hemoglobina da mioglobina.
Bilirrubina	Reação da bilirrubina com sal de diazónio em meio ácido, com mudança de cor	O aparecimento de bilirrubina direta na urina indica um excesso desta na corrente sanguínea, e normalmente ocorre quando há obstrução do canal biliar ou então em caso de doença hepatocelular.
Urobilinogénio	Reação Ehrlich aldeído ou formação de corante azo-vermelho a partir de um composto de diazónio.	Dano hepatocelular, falha cardíaca congestiva e colangite, tornam o fígado incapaz de lidar com o urobilinogénio reabsorvido na circulação portal e consequentemente vai levar à excreção aumentada deste pela urina. Por outro lado, excesso de urobilinogénio na urina com bilirrubina ausente é tipicamente associado a hemólise.
Nitrito	A tira contém ácido p-arsanílico que reage com o nitrito para formar said de diazónio. Este composto complexa com benzoquinolona para formar um corante-azo rosa.	A avaliação da presença de nitritos na urina é a modalidade mais comum para a avaliação indireta de bacteriúria, enquanto a esterase leucocitária avalia a leucocitúria, ambos testes muito usados para excluir infeções do trato urinário.
Leucócitos	Hidrólise de estéres da tira para produzir os respetivos álcoois e ácidos	

8.2. EXAME DO SEDIMENTO URINÁRIO

No sedimento urinário podem ser observados elementos celulares (células epiteliais do trato urinário, eritrócitos e leucócitos), cilindros e cristais com diversa significância clínica, e outros organismos como bactérias, fungos e parasitas¹.

Todas as amostras de urina que são analisadas têm o seu sedimento urinário avaliado por citometria de fluxo em aparelhos UF-5000 e, em casos em que o resultado da tira de reagentes não é concordante com os resultados de citometria, o sedimento é analisado por microscopia automatizada em aparelhos UD-10 da cadeia automatizada da Sysmex⁵⁸.

1. Células

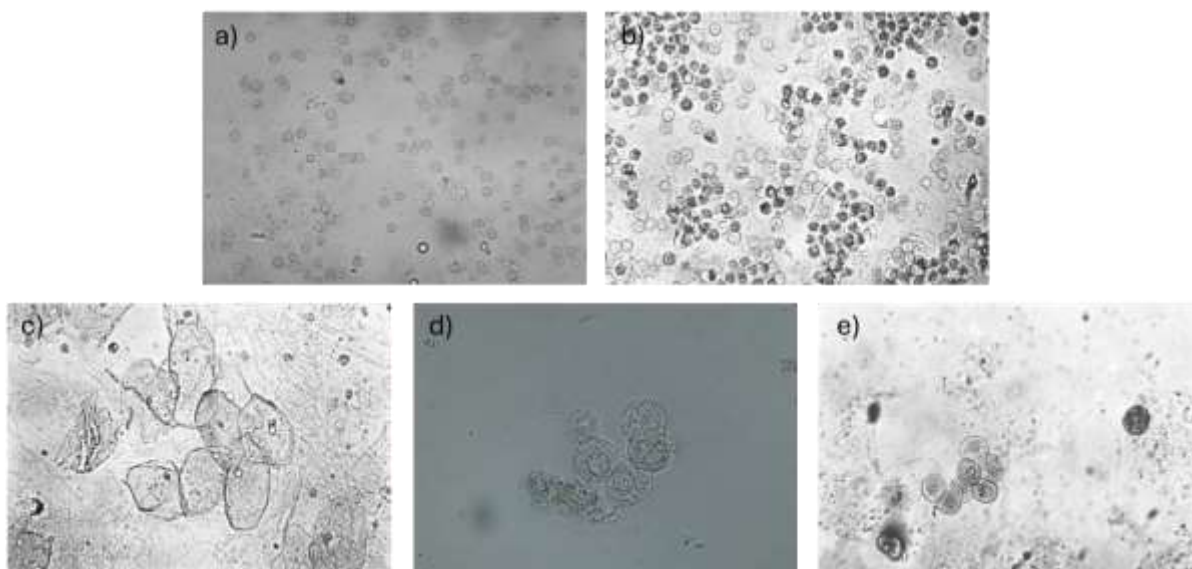


Figura 2 – Células que podem ser observadas no sedimento urinário. a) Eritrócitos: quando encontrados mais de três eritrócitos por campo pode ser indicativo de várias patologias sistêmicas ou do trato urinário. b) Leucócitos: quando observados mais de cinco por campo indica presença de infecção ou inflamação no trato urinário. c) Células epiteliais descamadas: são as células mais observadas em amostras de urina e também as menos significativas. A sua presença em grande número é indicativa de má colheita. d) células epiteliais de transição: são indicativas de inflamação ou dano por litíase. e) células do epitélio tubular renal: são as células mais significativas, uma vez que um número aumentado destas indica dano tubular. Adaptado de McPherson & Pincus (2017)¹.

2. Cilindros

Cilindros são raramente visto no sedimento urinário de uma pessoa normal. O seu aparecimento está normalmente relacionado com doença dos rins e um número elevado de cilindros indica que vários nefrónios podem estar envolvidos. A formação dos cilindros aumenta com pH baixo e concentração iónica elevada, e com estase ou obstrução dos nefrónios¹.

Os cilindros podem ser bastante variáveis na sua aparência, tamanho, forma e estabilidade. E por isso têm também significância clínica variável¹.

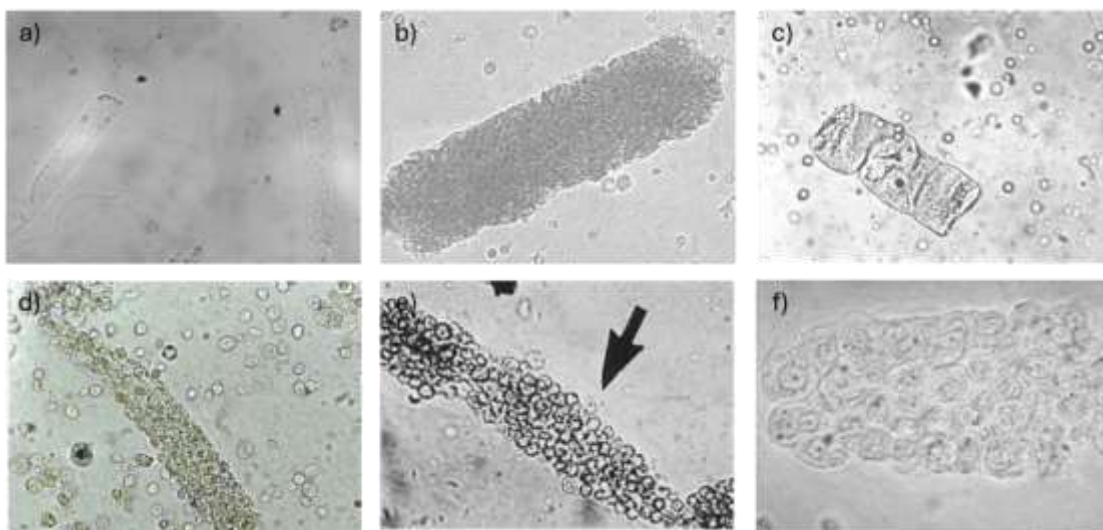


Figura 3 – Diferentes cilindros que podem ser observados na urina. a) Cilindros hialinos: são os observados mais frequentemente, observação de zero a dois cilindros destes por campo é considerado normal. O seu número aumenta em doenças renais, exercício físico, exposição ao calor, febre e tratamento diurético. b) Cilindros granulosos: são comuns e podem aparecer tanto em condições patológicas como não-patológicas. Podem originar de agregados de proteínas do plasma, restos celulares, precipitados de sais e lisossomas. Aparecem em doenças glomerulares e tubulares, e em rejeições de alógrafo renal. Podem também aparecer em pielonefrites, infeções virais e intoxicação crónica por chumbo, e podem estar presentes após exercício ou stress extremos. c) Cilindros cerosos: estão comumente associados com inflamação e degeneração tubular, e são muitas vezes observados em pacientes com falência crónica renal. d) Cilindros leucocitários: reflete doença tubulointersticial e inflamação intersticial. Associados a pielonefrites e infeções urinárias. e) Cilindros eritrocitários: indicadores de hemorragia no nefrónio e dano glomerular. Aparecem em patologias como glomerulonefrites. Cilindros de células do epitélio tubular renal: encontrados em urina com necrose aguda tubular, doença viral (isto é, doença do citomegalovirus) ou exposição a drogas. São também

indicativos pós-operatórios de rejeição aguda do alógrafo. Adaptado de McPherson & Pincus (2017)¹.

3. Cristais

Os cristais formam-se pela precipitação de sais urinários. A presença da maioria na urina tem significado clínico limitado, no entanto, identificação correta torna-se essencial para não deixar passar os poucos cristais anormais que estão associados com condições patológicas.

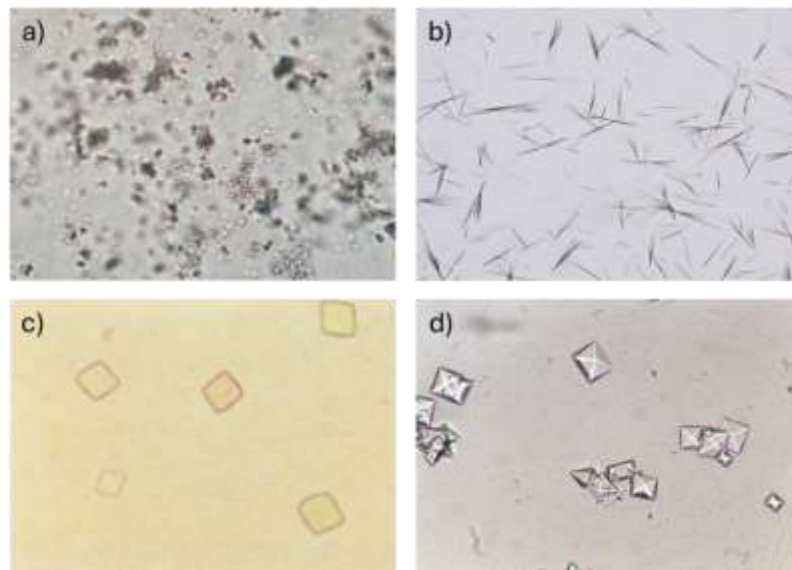


Figura 4 - Cristais encontrados em urina normal, de pH ácido. a) Cristais de urato amorfos (cálcio, sódio ou potássio). b) Cristais de urato cristalinos (sódio, potássio e amónia). c) Cristais de ácido úrico, em níveis elevados estes podem refletir um aumento do turnover das proteínas ou gota. d) Cristais de oxalato de cálcio, em números elevados podem refletir doença renal crónica. Adaptado de McPherson & Pincus (2017)¹

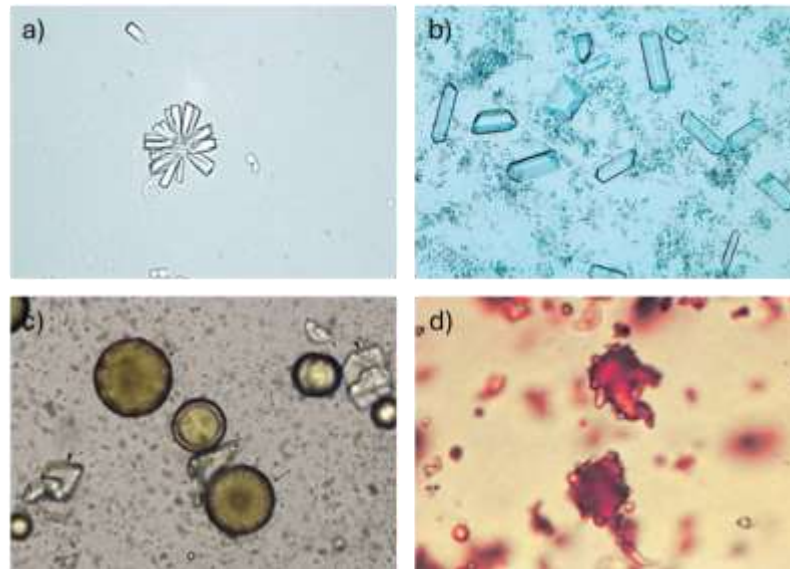


Figura 5 - Cristais encontrados em urina normal, pH alcalino. a) Cristais de fosfatos amorfos (na imagem de cálcio, podem também ser de magnésio). b) Cristais de trifosfato, vistos frequentemente em urina infetada. c) Cristais de carbonato de cálcio. d) Cristais de biurato de amónia. Adaptado de McPherson & Pincus (2017)¹

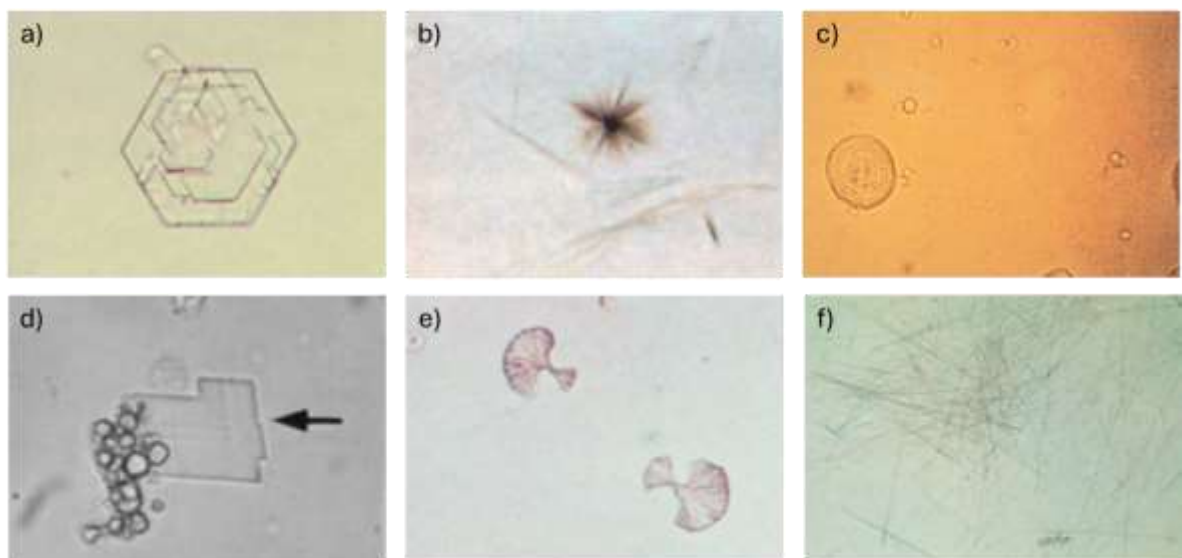


Figura 6 - Cristais encontrados em urina anormal, de pH ácido. a) Cristais de Cistina, estes cristais aparecem em pacientes com cistinúria e podem estar associados a cálculos de cistina. b) Cristais de tirosina, estão associadas a urinas de pacientes com doença hepática severa. Aparecem nessa patologia em conjunto com c) Cristais de leucina. d) Cristais de colesterol, associados a síndrome nefrótica ou falência renal. e) Cristais de sulfonamida, que aparecem em pacientes em terapia de sulfonamida com sintomas de desidratação. f) Cristais de ampicilina, este e outros fármacos cristalizam na urina em condições de dose exagerada. Adaptado de McPherson & Pincus (2017)¹.

9. CONCLUSÕES

O estágio na Unilabs Porto Central permitiu-me consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do ano letivo e também adquirir novos conhecimentos na área das análises clínicas, principalmente conhecimento práticos dos diversos métodos e instrumentos analíticos presentes no laboratório.

Foi possível ter uma visão completa e robusta do trabalho realizado num contexto profissional de um laboratório de análises clínicas, desde a receção de amostras e verificação da sua qualidade na pré-analítica até à validação de resultados realizada em todos os setores. Na fase analítica, foi possível visualizar e experienciar o papel de um técnico de análises clínicas nos vários setores, sendo-me permitido ajudar na manutenção do bom funcionamento dos analisadores, com a programação de controlos de qualidade e calibrações, manuseamento de amostras e substituição de reagentes, fluídos e outros materiais.

Ao longo do estágio, a importância do trabalho realizado no laboratório de análises clínicas foi enfatizada, sendo que estes laboratórios têm um papel fundamental nos cuidados de saúde, fornecendo aos médicos e outros profissionais de saúde informações que auxiliam na prevenção, diagnóstico e monitorização de doença. Na Unilabs, todos os técnicos têm atenção à qualidade dos resultados obtidos e estão cientes da sua importância, pois por de trás de cada análise há um paciente.

Assim, agradeço a disponibilidade da Unilabs e de todos os técnicos e colaboradores dos diferentes setores do laboratório para me receberem e acompanharem durante o estágio.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McPherson, R. A. & Pincus, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. (Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, 2017).
2. Burtis, C. A. & Bruns, D. E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. (Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, 2015).
3. Sample Processing System | AutoMate 2500 Family | Beckman Coulter. <https://www.beckmancoulter.com/products/automation/automate-2500-family-sample-processing-systems>.

4. OC-Sensor DIANA - Palex Medical.
<https://www.palexmedical.com/en/product.cfm?id=oc-sensor-diana>.
5. OC-SENSOR PLEDIA | Faecal Testing “OC-SENSOR” | Products | EIKEN CHEMICAL CO.,LTD,. <https://www.eiken.co.jp/en/products/fit/pledia/>.
6. Biosepar | Parasitrap. <https://biosepar.de/en/parasitrap-2/>.
7. XN-9100 Automated Hematology Systems.
<https://www.sysmex.com/US/en/products/hematology/xnseries/pages/xn-9100-automated-hematology-system.aspx>.
8. CUBE 30 TOUCH. <https://www.diesse.it/en/products/cube-30-touch/>.
9. Premier Hb9210 HbA1c Analyzer - Trinity Biotech .
<https://www.trinitybiotech.com/products/premier-hb9210-hba1c-analyzer/>.
10. CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. (2007).
11. CellaVision DM96 Digital Cell Morphology System. <https://www.siemens-healthineers.com/br/hematology/systems/cellavision-dm96-digital-cell-morphology-system>.
12. XN-1000. <https://www.sysmex.es/es-pt/productos/products-detail/xn-1000/>.
13. SLS detection method - Sysmex technologies. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/technologies/sls-detection-method/>.
14. Oshiro, I., Takenaka, T. & Maeda, J. New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). *Clin Biochem* **15**, 83–88 (1982).
15. SP-50 - Sysmex product details. <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/sp-50/>.
16. Rastreio de alterações da hemoglobina | Sebia | PT. <https://www.sebia.com/pt-pt/tests/rastreio-de-alteracoes-da-hemoglobina/>.
17. Riou, J. *et al.* Precision of CAPILLARYS 2 for the Detection of Hemoglobin Variants Based on Their Migration Positions. *Am J Clin Pathol* **149**, 172–180 (2018).
18. Aptio Automation - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/laboratory-automation/systems/aptio-automation>.

19. Atellica® Solution Integrated Immunoassay & Clinical Chemistry Analyzers from Siemens Healthineers - Siemens Healthineers. <https://www.siemens-healthineers.com/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers>.
20. Document Library - Siemens Healthineers. <https://doclib.siemens-healthineers.com/documents?products=18620,25549&productgroups=1&countries=172&sortingby=modified-at&direction=desc&languages=12>.
21. CAPILLARYS PROTEIN(E) 6.
22. IMMULITE 2000 - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/immunoassay/systems/immulite-2000-immunoassay-system>.
23. VIDAS® 3 | bioMérieux Portugal. <https://www.biomerieux.pt/produto/vidasr-3>.
24. VIDAS® | bioMérieux Portugal. https://www.biomerieux.pt/produto/vidasr#_vidas-strips-bio0946.jpg_0_1.
25. cobas® e 411 analyzer. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-e-411-ins-502.html#productInfo>.
26. ROCHE - eLabDoc. https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/pi/en/products/INS_502.
27. RAPIDPoint 500 Systems - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/blood-gas/blood-gas-systems/rapidpoint-500-systems>.
28. Gonotec® Osmomat™. <https://www.osmometers.com/osmomat.html>.
29. CS-5100 System - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/cs-5100-system>.
30. Maglumi X3 Full Auto Chemiluminescence Immunoassay CLIA System, Laboratory Equipment, Immunoassay Analyze. <https://www.ysenmed.com/products/maglumi-600-fully-automated-chemiluminescence-immunoassay-analyzer>.
31. IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System | EUROIMMUN. <https://www.euroimmun.com/products/automation/chlia/ids-isys/>.
32. TRITURUS® Immunoassay System from Grifols | SelectScience. <https://www.selectscience.net/products/triturus-immunoassay-system/?prodID=197269#tab-1>.

33. EUROIMMUN Analyzer I-2P | EUROIMMUN.
<https://www.euroimmun.com/products/automation/elisa/euroimmun-analyzer-i-2p/>.
34. ELISA Systems | Dynex Technologies.
<https://www.dynextechnologies.com/systems>.
35. HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING | Sebia | PT. <https://www.sebia.com/pt-pt/instruments/hydrasys-2-scan-focusing/>.
36. HYDRAGEL 1 IF Violet Acide / Acid Violet HYDRAGEL 2 IF Violet Acide / Acid Violet HYDRAGEL 4 IF Violet Acide / Acid Violet Masque dynamique / Dynamic mask.
37. BN ProSpec System - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/plasma-protein/systems/bn-prospec-system>.
38. Zenit PRO - Menarini Diagnostics. <https://pdf.medicaexpo.com/pdf/menarini-diagnostics/zenit-pro/79119-184715.html>.
39. Nosal, R. S., Superville, S. S., Amraei, R. & Varacallo, M. Biochemistry, Antinuclear Antibodies (ANA). *StatPearls* (2022).
40. Sousa, M. J. *et al.* International Consensus on Antinuclear Antibody em Portugal. *Acta Med Port* **34**, 347–354 (2021).
41. Instrumento Phadia™ 250 | Thermo Fisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/phadia/wo/pt/our-solutions/phadia-laboratory-systems/phadia-250.html>.
42. EUROBlotOne | EUROIMMUN.
<https://www.euroimmun.com/products/automation/immunoblot/euroblotone/>.
43. Immunoblot | EUROIMMUN.
<https://www.euroimmun.com/products/techniques/immunoblot/>.
44. Instrumento Phadia™ 1000 | Thermo Fisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/phadia/wo/pt/our-solutions/phadia-laboratory-systems/phadia-1000.html>.
45. Software Fast Screen pre I plus. <https://www.brahms.de/en-gb/products/prenatal-screening/products-assays/software-fast-screen-pre-i-plus>.
46. AutoDELFIA immunoassay system for prenatal screening | Revvity.
<https://www.revvity.com/product/autodelfia-system-sp-and-pp-1235-5220>.

47. KRYPTOR Analyzers. <https://www.brahms.de/en-gb/products/kryptor-analyzers.html>.
48. Harmening, D. *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*. (F.A. Davis Company, Philadelphia, 2019).
49. Ortho Clinical Diagnostics ID-Micro Typing System™. <https://www.cardinalhealth.com/en/product-solutions/medical/laboratory-products/blood-bank/blood-bank-reagents/id-micro-typing-system.html>.
50. ORTHO VISION® Swift Analyzer. <https://www.cardinalhealth.com/en/product-solutions/medical/laboratory-products/blood-bank/blood-bank-analyzers/ortho-vision-swift-analyzer.html>.
51. Ortho Clinical Diagnostics Reagent Red Blood Cells. <https://www.cardinalhealth.com/en/product-solutions/medical/laboratory-products/blood-bank/blood-bank-reagents/reagent-red-blood-cells.html>.
52. Murray, P. R. *Medical Microbiology*. (ELSEVIER, Philadelphia, 2016).
53. Aerospray® Gram. <https://www.aerospraystaining.com/gram.php>.
54. Aerospray® TB. <https://www.aerospraystaining.com/tb.php>.
55. MBT SMART IVD - Bruker Daltonics Inc. - PDF Catalogs | Technical Documentation. <https://pdf.medicalexpo.com/pdf/bruker-daltonics-inc/mbt-smart-ivd/75820-155258.html>.
56. Microbial Identification | Bruker. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification.html>.
57. MicroScan WalkAway plus Microbiology System | Beckman Coulter. <https://www.beckmancoulter.com/products/microbiology/microscan-walkaway-plus-system>.
58. UN-SERIES-Urinalysis. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Urinalysis/UN-Series-Urinalysis/Pages/UN-Series-Urinalysis.aspx>.