

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FÁRMACIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

SARA FERREIRA SANTOS BATALHA

LISBOA, 2011/12

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FÁRMACIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO
Laboratório Dr. Joaquim Chaves
Orientação: Dr. Carlos Oliveira

Mestrado em Análises Clínicas

Sara Ferreira Santos Batalha

LISBOA, 2011/12

Introdução

O estágio no âmbito do III Mestrado em Análises Clínicas decorreu no período de 7 de Fevereiro de 2011 a 19 de Agosto de 2011, em regime pós-laboral, no Laboratório Dr. Joaquim Chaves, sob a orientação do Farmacêutico Especialista Dr. Carlos Oliveira.

Foram abrangidas diversas áreas analíticas, sendo o estágio organizado da seguinte forma:

Nº de Semanas	Data	Área Analítica
4	7/2/2011 a 4/3/2011	Core Laboratorial - Hematologia
4	7/3/2011 a 1/4/2011	Core Laboratorial – Química Clínica
5	4/4/2011 a 6/5/2011	Imunologia
3	9/5/2011 a 27/5/2011	Radio Imuno Assay (RIA)
2	30/5/2011 a 10/6/2011	Química Analítica
1	13/6/2011 a 24/6/2011	Biologia Molecular
5	27/6/2011 a 5/8/2011	Microbiologia

Enquanto organização prestadora de serviços na área das análises clínicas, o Laboratório Dr. Joaquim Chaves é uma entidade Certificada segundo a ISO 9001:2008, atribuída pela Bureau Veritas Certification. São abrangidas pela certificação as várias valências clínicas existentes na organização, tal como os postos de colheitas pertencentes ao grupo.

Durante o estágio surgiu a oportunidade de contactar com diversos equipamentos, metodologias, determinação dos mais variados parâmetros analíticos, realidades distintas e variadas em função da área analítica envolvida. De forma a não tornar este relatório demasiado exaustivo, irei organizá-lo por sectores analíticos.

Para cada sector será feita uma breve explicação dos equipamentos utilizados, fundamento da metodologia, exemplo de parâmetro analítico determinado por esse método e em algumas situações irei também caracterizar o interesse clínico associado.

É importante referir que a quantidade de parâmetros analíticos determinados no Laboratório é muito vasta. Por esse motivo tornar-se-ia demasiado exaustivo referir ou abordar todas as determinações observadas durante o estágio. Com este relatório pretendo descrever os aspectos mais importantes aprendidos durante o estágio, nos diversos sectores constituintes do Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

Índice

Introdução	4
Índice	5
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	7
Controlo de Qualidade Interno.....	8
Avaliação Externa da Qualidade	9
Core Laboratorial - Hematologia e Imunohematologia	11
Hemograma	11
Técnicas Hematológicas Manuais	16
Velocidade de Sedimentação.....	16
Hemoglobinopatias	17
Classificação de Anemias e sua Avaliação	19
Avaliação da Hemostase e Coagulação.....	21
Imunohematologia	24
Core Laboratorial – Química Clínica	27
Sobre Metodologias utilizadas	27
1. Métodos Eletroquímicos: Potenciometria	27
2. Métodos Fotométricos: Espectrofotometria	28
3. Reações de Precipitação: Imunoturbidimetria/Nefelometria.....	28
4. Cromatografia	29
5. Electroforese	30
6. Imunoensaios marcados: Enzima Imuno Ensaio (EIA), Imunoensaio de Luminiscência	31
Metabolismo dos Hidratos de Carbono.....	34
Metabolismo dos Lípidos	36
Metabolismo Proteico	38
Função Hepática e Tracto Biliar	40
Função Renal	42
Função Pancreática	44
Equilíbrio Electrolítico e Ácido/Base	45
Metabolismo Fosfo/Cálcio	46
Função Cardíaca	48
Estudo dos Marcadores Tumorais.....	50
Ovário e Endométrio:.....	51
Colon e Recto:	52
Pulmão:	52
Doenças Infeciosas	53
Anticorpos anti-HVC (Hepatite C), Totais	53
HBV (Hepatite B)	53
Anticorpos Anti-HIV-1 e Anti-HIV-2	54
Rastreio da Grávida	55
Toxoplasmose (IgG e IgM)	55
Rubéola (IgG e IgM).....	55
Citomegalovírus (IgG e IgM)	56
Endocrinologia	56
Eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra Renais:.....	56
Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas:.....	57
Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tiróide:.....	59
Urianálise	61
Imunologia.....	65
Técnicas manuais.....	66
Citometria de Fluxo	67
Nefelometria.....	68
ELISA	69

Imunoblot	70
Técnicas de Aglutinação	71
Imuno Difusão Radial	72
Espermograma	73
Serologia Infeciosa.....	75
Autoimunidade	77
RIA (Rádio Imuno Ensaio)	80
Alergologia.....	84
Química Analítica.....	86
Potenciometria	86
HPLC	86
Absorção Atômica	87
ICP	89
Espectrometria IV	89
GC-MS	90
Helicobacter pylori	90
Biologia Molecular	92
Microbiologia.....	98
Exsudado Nasal	98
Exsudado Faringeo	98
Expectoração	99
Pesquisa de BK.....	99
Urina Asséptica	100
Exsudado vaginal/uretral.....	101
Ferida ou Exsudado purulento.....	103
Hemocultura	103
Coprocultura.....	103
Pesquisa de sangue oculto	104
Exame parasitológico nas fezes.....	105
Pesquisa directa de Strepto grupo A (pyogenes)	105
Agradecimentos	108

Índice de Figuras

Figura 1: Gráficos Advia.....	13
Figura 2: Gráficos Advia.....	13
Figura 3: Equipamento VES-Matic 200.....	17
Figura 4: Equipamento BCS® XP.....	21
Figura 5: Equipamento Ortho Auto Vue.....	24
Figura 6: Esquema de Absorção, Reflexão e Transmissão da luz.....	28
Figura 7: Equipamento BN ProSpec.....	29
Figura 8: Esquema de ensaios imunoenzimáticos.....	31
Figura 9: Esquema do interior do Advia Centaur.....	33
Figura 10: Equipamento Cobas 411.....	33
Figura 11: Gráfico do ADAMS A1c.....	35
Figura 12: Lipidograma.....	38
Figura 13: Gráfico de eletroforese de Proteínas.....	39
Figura 14: Imunofixação de imunoglobulinas.....	39
Figura 15: Gráfico da evolução dos marcadores do vírus da Hepatite B.	54
Figura 16: Esquema da ligação Ag-Ac por ELISA.....	69
Figura 17: Imunoblot.....	70
Figura 18: Esquema das alterações morfológicas.....	74
Figura 19: Placa de Imunofluorescência.....	75
Figura 20: Técnica de IFI.....	75
Figura 21: Esquema de ligações.....	81
Figura 22: Equipamento Phadia.....	85
Figura 23: Strip com chip para genotipagem.....	93
Figura 24: Equipamento m2000.....	94
Figura 25: Equipamento Ligth Cyclor.....	97

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros hematimétricos e respectivas fórmulas.	12
Tabela 2: Apresentação de resultados na pesquisa de Fosfatase Alcalina Leucocitária.....	16
Tabela 3: Variações da Velocidade de Sedimentação.....	17
Tabela 4: Constituição das principais Hemoglobinas.....	18
Tabela 5: Classificação de Hiperdislipidémias segundo Fredrickson.....	38
Tabela 6: Variações nos indicadores do equilíbrio ácido/base.....	46
Tabela 7: Marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio.....	48
Tabela 8: Patologias do eixo Hipotalamo-hipofise- supra renais.....	57

Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) consiste no conjunto de procedimentos adoptados num Laboratório, com vista a permitir um controlo e monitorização da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas. Consiste nas medidas de controlo levadas a cabo na rotina laboratorial, que visam garantir a consistência, reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados obtidos. Tem como objectivo garantir a deteção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correção.

No Laboratório Dr. Joaquim Chaves, as amostras utilizadas no CQI podem ter duas origens, nomeadamente, o próprio fabricante do reagente/Kit ou um fornecedor independente especializado na produção de amostras de controlo de qualidade. Sempre que possível opta-se pela utilização do controlo de qualidade dum fornecedor independente. A realização deste controlo visa a monitorização do desempenho e da estabilidade dos sistemas analíticos utilizados. Para os diversos parâmetros analisados, existem objectivos e requisitos de qualidade definidos e adequados aos sistemas analíticos instalados, garantindo assim a utilização racional e eficaz de procedimentos de controlo.

Cada sector analítico tem um plano de CQI, onde se encontram descritos os requisitos exigidos para cada parâmetro. Estes requisitos são os que melhor se adequam a cada sistema analítico e podem ser diferentes para cada um. Os requisitos traduzem-se por um Erro total (ET) admissível, que é determinado com base numa de cinco opções:

1. ET adoptado: ponderado tendo em conta o histórico analítico, factores biológicos e clínicos (fórmula de Tomb)
2. Recomendações INSA
3. RCV variabilidade clinicamente significativa (C.G.Fraser)
4. ET biológico (Ricos C. et al)
5. CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments)

Para determinar a frequência com que se realiza o controlo de determinado parâmetro, são tidas em conta as características dos sistemas analíticos, a Imprecisão (Ip) e Incerteza (Ie), recomendações de consensos, critérios clínicos, resultados de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) e o estado da arte. As recomendações de consensos contemplam informação do próprio Laboratório (in house, valores ponderados tendo em conta o histórico analítico, factores biológicos e clínicos) ou requisitos do próprio material de controlo, recomendações de Guidelines de AEQ, $\frac{1}{2}$

RCV% - valor da alteração de referência segundo C.G. Fraser, ET% Biológico segundo Ricos C. et al, CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), RCPA (Royal College of Pathologists of Australasia), RICHTLINIE (Rilibak 2008: <http://www.dach-gmbh.de/DACHDok/Rilibaek/RILIBAEK%202008.pdf>).

Mensalmente efetua-se o tratamento estatístico dos resultados do CQI, avaliando a Inexatidão, Imprecisão, ICV e Erro total para cada programa. Os resultados são registados para a elaboração de cartas controlo e determinação de parâmetros que permitem avaliar o desempenho como a média, o desvio padrão (SD), o coeficiente de variação (CV), o BIAS e o Erro Total (ET). Na avaliação dos resultados de controlo interno deverá verificar-se se o ET obtido para cada parâmetro é inferior ao ETa. Caso seja superior, devem ser avaliados problemas de inexatidão ou imprecisão de forma a implementar as medidas corretivas adequadas.

Avaliação Externa da Qualidade

A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) tem como objectivo atingir uma harmonização de resultados inter-laboratórios, se possível, inter-instrumento, e monitorizar o nível de desempenho geral do laboratório. Esta avaliação é a longo termo, retrospectiva e fornece exemplos aleatórios do modo como o laboratório trabalha.

A avaliação do desempenho do Laboratório Dr. Joaquim Chaves em comparação com outros Laboratórios que utilizam os mesmos procedimentos analíticos é assegurada através da participação em Programas de AEQ internacionais ou nacionais.

Existem diversos tipos de programas de avaliação externa da qualidade, devendo os mesmos ser seleccionados em função da frequência com que enviam amostras, parâmetros analíticos contemplados, qualidade da amostra (deve ser o mais semelhante possível com a amostra biológica), número de participantes e equidade nos equipamentos utilizados por cada um, entre outros. O Laboratório Dr. Joaquim Chaves participa, principalmente, nos programas de AEQ do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e no programa de um consórcio inglês designado UKNEQAS.

Os relatórios emitidos para o laboratório contemplam informação diversa, que deve ser analisada de forma crítica. Alguns dos parâmetros que devem ser verificados são o índice de desvio (ID), que deve encontrar-se abaixo de 2,5 e que quando ultrapassado deve originar uma acção correctiva. Deve-se confirmar também o valor de

amostras (n) no nosso grupo de comparação, devendo este ser o maior possível e não inferior a 10.

À semelhança do que sucede para o CQI, também no caso da AEQ existe um plano que descreve o desempenho de cada área analítica para cada parâmetro. Os critérios de desempenho adoptados variam entre sectores, verificando-se que no Core Laboratorial - Química Clínica o critério utilizado é o BIS.

$$\text{BIS} = [(\text{Valor obtido} - \text{Valor de consenso}) / \text{Valor Consenso}] \times (10000 / \text{CCv}\%)$$

O Valor de consenso varia entre parâmetros e é uma característica específica de cada um deles. O valor obtido é comparado com uma das médias dos resultados do grupo. O NEKAS determina na origem qual o indicador a ser comparado, ou a média dos que utilizam o mesmo método ou a média de todos.

A AEQ apresenta maiores fragilidades quando se pretende controlar determinações analíticas que impliquem tecnologia de ponta onde se observa baixa padronização de métodos (ex: PCR em tempo real para infecciologia), ou quando implicam grande intervenção humana (ex: IFI na Autoimunidade) para elaboração do resultado. Nestas situações a variação observada nas respostas dos diversos participantes, leva à obtenção de desvios muito elevados com comprometimento do significado estatístico obtido.

Todos os resultados do **CQI** e **AEQ** são compilados pelo coordenador de controlo de qualidade, que elabora um relatório mensal a ser avaliado pela Direcção técnica do laboratório, com conhecimento da Administração.

A área analítica Core Laboratorial reúne várias valências da actividade Laboratorial em torno duma única cadeia de equipamentos. Os tubos de colheita primários percorrem a cadeia e são utilizados por cada equipamento, conforme o perfil analítico que lhe está associado. As valências analíticas envolvidas são múltiplas, desde sistemas metabólicos e homeostasia dos diversos órgãos e sistemas, eixos endócrinos, doenças infecciosas, etc. processam-se determinações em soro, sangue total, urina, entre outros.

Core Laboratorial - Hematologia e Imunohematologia

A Hematologia é uma área analítica que engloba o estudo quantitativo e qualitativo dos elementos figurados do sangue, o estudo das alterações quantitativas, qualitativas e funcionais da coagulação e hemostase e a fenotipagem sanguínea do sistema ABO e Rh.

Na hematologia processada no Core Laboratorial englobam-se os hemogramas, a determinação de velocidade de sedimentação (VS), a determinação de grupos sanguíneos e a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), a avaliação da função hemostática e da coagulação e o estudo dos factores de coagulação.

Hemograma

O hemograma é uma das análises mais requisitadas ao laboratório. Reúne os dados do eritrograma, leucograma e plaquetas.

O **Advia 2120** é um equipamento para determinação de parâmetros hematológicos, maioritariamente a partir de amostras de sangue total. O sangue total é obtido por punção venosa, quando recolhido para tubo apropriado contendo EDTA, anticoagulante que vai remover o Cálcio garantindo que todos os elementos figurados do sangue se mantêm em suspensão. O sangue citratado é obtido em tubo de citrato, em que o citrato trissódico actua por remoção do Cálcio. O método utilizado é o da coloração da peroxidase.

O hemograma engloba dois tipos de análises: uma quantitativa dos elementos figurados, com quantificação dos mesmos e determinação dos índices eritrocitários, e um exame morfológico dessas células. Qualquer parâmetro que apresente um valor afastado dos limites predefinidos, desencadeia a emissão de um “flag” de alerta. Na validação dos resultados, o analista avalia a necessidade de observação de esfregaço sanguíneo.

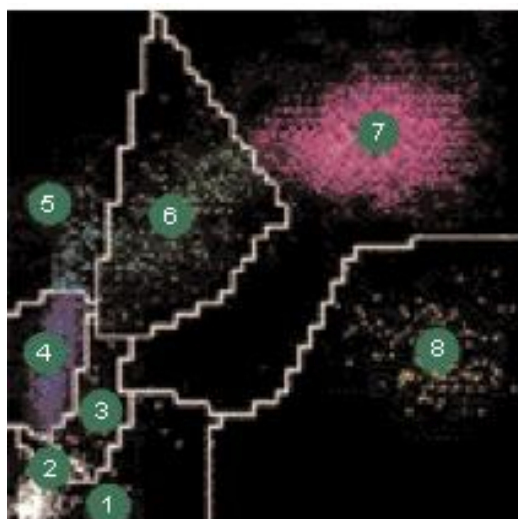
A análise dos eritrócitos é feita por esferificação e fixação parcial dos glóbulos, eliminando-se as variações na forma. Para a determinação dos índices o equipamento

executa uma contagem total de eritrócitos, determina o valor de Hemoglobina e de Hematócrito e a partir destes valores são calculados os restantes parâmetros, segundo as fórmulas:

Parâmetro	Fórmula	Valor Referência	Alteração
Volume Celular Médio	$VCM = Ht / RBC$	(80 - 100) fL	↑Macrocitose ↓Microcitose
Concentração Média Hemoglobina	$MCH = Hb / RBC$	(26 - 32) pg	↑Macrocitose ↓Microcitose
Concentração Celular Média Hemoglobina	$MCHC = Hb / Ht$	(32 - 36) g/dL	↑Hiperchromia ↓Hipocromia
Coeficiente de Dispersão Eritrocitário	RDW	(11.5 - 14) %	↑Anisocitose

Tabela 1: Parâmetros hematimétricos e respectivas fórmulas.

A fórmula leucocitária é feita por citometria de fluxo, método que consiste na medição das propriedades ópticas das células que se movem uma a uma, de forma ordenada, no seio de uma suspensão líquida em fluxo contínuo. A separação de cada célula é feita consoante o seu tamanho e complexidade, com formação de populações celulares. A combinação da dispersão da luz, coloração citoquímica e densidade nuclear permite medir a totalidade e diferenciar os glóbulos brancos. O método da peroxidase permite a diferenciação das populações através da coloração das células que contém mieloperoxidase. Após adição do substrato da enzima peroxidase, a intensidade da reacção citoquímica é medida pela absorvância da luz branca emitida por uma lâmpada de tungsténio. Os neutrófilos, eosinófilos e os monócitos são peroxidase positiva e os linfócitos e basófilos são peroxidase negativa. O equipamento distingue ainda no canal peroxidase, além das cinco populações celulares, uma sexta denominada de LUCs (Large unstained cells) que correspondem a “células grandes não coradas”, que podem representar leucócitos atípicos, células plasmáticas, blastos, tricoleucócitos ou outros. Os leucócitos são também avaliados pelo canal de Basófilos/Lobularidade através da adição de um reagente que lisa os eritrócitos e retira o citoplasma a todas as células, excepto aos basófilos permitindo depois a sua diferenciação.



Legenda: Canal Peroxidase

1. Ruído
2. Reticulócitos, Eritrócitos
3. Agregados Plaquetares
4. Linfócitos e Basófilos
5. LUCs
6. Monócitos
7. Neutrófilos
8. Eosinófilos

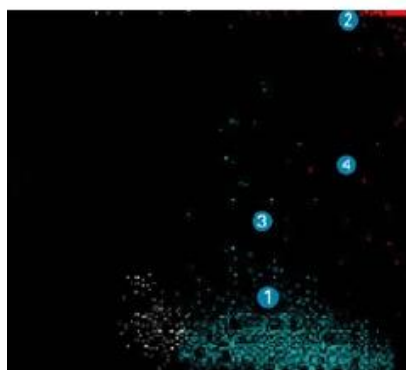


Legenda: Canal Baso/Lobularidade

1. Ruído
2. Blastos
3. Leucócitos mononucleares
4. Basófilos
5. Basófilos suspeitos
6. Saturação
7. Polimorfonucleares

Figura 1: Gráficos Advia

A contagem das plaquetas é feita pela avaliação da dispersão da luz a ângulos específicos que caracterizam o volume e índice de refração das células.



Legenda: Gráfico de Plaquetas

1. Plaquetas
2. Eritrócitos
3. Plaquetas gigantes
4. Eritrócitos microcíticos

Figura 2: Gráficos Advia

O **Advia Auto Slide** é um equipamento destinado à execução de esfregaços e coloração automática de lâminas, utilizando a coloração de May-Grunwald-Giemsa. Trabalha em modo automático ou manual, sendo a indicação de realização de esfregaço dada pelo especialista, após avaliação dos resultados obtidos nos parâmetros hematológicos.

A coloração de May-Grunwald-Giemsa combina as vantagens de vários corantes, corando elementos celulares acidófilos, grânulações neutrófilas e grânulações azurófilas. Os reagentes a utilizar são solução de May-Grunwald, que vai promover a fixação do

esfregaço e consiste numa solução metanólica de eosinato de azul-de-metileno. A solução May-Grunwald com tampão de fosfatos em partes iguais, permite a dissociação em eosina e azul-de-metileno do corante de May-Grunwald, pelo pH conferido á solução. Por fim utiliza-se a solução de Giemsa diluída, composta por eosinato de azul-de-metileno e eosinato de azul de metileno. Os corantes dissociados vão actuar, a eosina é o corante ácido (cora os componentes da célula de rosa-alaranjado, eosinófilos) e o azul-de-metileno é o corante básico (cora os componentes das células de azul-arroxado, basófilos) e o azul de metileno (cora granações azurófilas de vermelho-púrpura).

Os **reticulócitos** são os precursores imediatos dos eritrócitos maduros, constituem células já anucleadas mas que, dada a sua imaturidade, conservam ainda restos de RNA que pode ser evidenciado através de coloração supravital. A contagem de reticulócitos apresenta interesse clínico no diagnóstico de anemias, para diferenciar as anemias regenerativas de arregenerativas, na monitorização do seu tratamento.

O método utilizado no Laboratório para contagem de Reticulócitos é automático por citometria de fluxo e realizado no Advia. No entanto, é importante conhecer o método manual. A uma amostra de sangue fresco colhido em EDTA, adiciona-se uma parte igual de azul de cresil brilhante (corante vital), homogeneiza-se a mistura e incuba-se a 37°C por 20 minutos. Da preparação obtida, coloca-se uma gota sobre a lâmina e executa-se o esfregaço.

Depois de seco, pode ser observado. É feita a contagem de 1000 células anucleadas (glóbulos vermelhos + reticulócitos) e o resultado é apresentado em percentagem.

A observação de um **esfregaço sanguíneo** é uma parte importante na avaliação da doença hematológica. Embora possa ser sugerido um diagnóstico específico com base em resultados obtidos por métodos automáticos, muitas doenças têm uma contagem celular normal mas com morfologia celular anormal. Situações como poiquilocitose (variações da forma) só podem ser avaliadas através da realização de um esfregaço sanguíneo. Um bom esfregaço sanguíneo e, por consequência, o sucesso da análise morfológica exigem particular atenção na preparação e coloração do esfregaço e familiaridade com a aparência morfológica de tipos celulares normais ou patológicos.

A coloração dos esfregaços de sangue periférico utilizada é a de May-Grünwald-Giemsa.

A observação de esfregaços sanguíneos, inicia-se com um varrimento da lâmina com a objectiva de 40×, para avaliar o aspecto geral das células e posterior observação

das alterações com objectiva de imersão de 100×, o condensador deve encontrar-se em cima e a intensidade da luz pode ser ajustada, devendo ser luz total.

Existem alterações morfológicas que são detectadas durante a observação do esfregaço, apresento alguns exemplos dessas alterações e seu significado, bem como o perfil patológico associado.

- Poiquilocitose: eritrócitos de formas variadas, sem predomínio de uma forma. Podem surgir associados a anemias ferropénicas, megaloblásticas, hemolíticas, talassémias ou mielofibroses.
- Policromasia: coloração heterogénea dos eritrócitos, associada ao aumento do número de reticulócitos. Podem surgir associados a anemias regenerativas, hemolíticas, no decurso de tratamento de anemias.
- “Target cells”: eritrócitos com forma de alvo. Podem surgir associados a anemias ferropénicas, hemolíticas, doenças hepáticas, hemoglobinopatias.
- Estomatócitos: eritrócitos unicôncavos, com zona central em fenda. Podem surgir associados a estomatocitose hereditária, alcoolismo e cirrose alcoólica ou doença hepática obstrutiva.
- Drepanócitos: eritrócitos em forma de foice, que resultam de uma mutação missense no gene β globina, determinando a substituição de aminoácidos que dão origem à síntese de Hb S. Em situações de hipo-oxigenação esta Hb polimeriza no interior do eritrócito, conferindo-lhe a forma de foice. Podem surgir associadas a drepanocitose, ou outras hemoglobinopatias.
- Pontuado Basófilo: grânulos finos de restos de ribossomas, RNA, mitocôndrias que precipitam, distribuídos por todo o eritrócito e que coram de azul-arroxado. Podem surgir associados a alterações da eritropoiese, da síntese de hemoglobina, intoxicações por metais pesados, talassémias, anemias, alcoolismo.
- Corpos de Howell Jolly: inclusões redondas de restos de DNA nuclear que coram de azul escuro-púrpura. Podem surgir associados a atrofia esplénica, após esplenectomia, anemias megaloblástica ou hemolíticas.
- Rouleaux: fenómeno que ocorre quando os eritrócitos se empilham, por modificação do seu potencial de membrana. Surge associado a aumentos de proteínas plasmáticas de elevado peso molecular, durante a gravidez, inflamações, infecções, mielomas.
- Agregados plaquetares: indicam que o valor obtido na contagem de plaquetas não é real, pelo que deve repetir-se a análise com tubo de EDTA imediatamente a

seguir à colheita ou em tubo de citrato (1:9) e multiplica-se o valor obtido por 1,1 para retirar a interferência da diluição, obtendo assim um valor mais próximo do real de contagem total de plaquetas.

- **Corpos de Heinz:** consistem em Hb desnaturada que precipita, podendo ser visualizados utilizando colorações vitais. Podem surgir associados a deficiência em G6PD ou outras enzimopatias do eritrócito, algumas hemoglobinopatias ou após intoxicações com drogas oxidantes. São observados por coloração supravital.

Técnicas Hematológicas Manuais

Nas técnicas manuais, os controlos de qualidade interno são garantidos pela observação de uma amostra possivelmente normal em paralelo com a amostra a analisar.

Técnica da Fosfatase Alcalina Leucocitária: coloração de lâmina preparada a partir de sangue fresco (sem anticoagulante). A coloração permite observar as granulações dos polimorfonucleares, permitindo dar resultados em valor de index com base na tabela apresentada:

Intensidade Granulação	Cell Count %	(Intens. * CC%)
0	8	(0*8) 0
1	42	(1*42) 42
2	24	(2*24) 48
3	12	(3*12) 36
4	7	(4*7) 28
Soma	100	158

Tabela 2: Apresentação de resultados na pesquisa de Fosfatase Alcalina Leucocitária
 Valor de Referência: 10 a 100. É feita contagem de 100 Neutrófilos e classificam-se os mesmos de 0 a 4. A coloração tem interesse nas síndromes mieloproliferativas, especialmente na diferenciação da leucemia mielóide crónica.

Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) representa a velocidade de queda espontânea dos elementos figurados do sangue, em suspensão no plasma. A VS resulta da diferença de gravidade específica existente entre os GV e o plasma, da atracção electrostática que se gera entre as cargas eléctricas negativas presentes na membrana dos GV e as cargas positivas de certas proteínas plasmáticas (formação de rouleaux) e da contra corrente plasmática.

O fenómeno de sedimentação caracteriza-se por três etapas, a agregação que corresponde à formação de pilhas de eritrócitos, a sedimentação ou queda rápida que corresponde à queda das pilhas de eritrócitos a uma velocidade constante e a sedimentação final que corresponde ao seu empilhamento no fundo do tubo.

A VS é expressa pela distância percorrida pelos eritrócitos durante uma hora, em milímetros. A sua determinação é clinicamente útil em doenças associadas ao aumento de produção de proteínas de fase aguda.

O **VES-Matic 200** é um equipamento automático para a determinação da VS. A amostra a utilizar é sangue total colhido em tubo de EDTA, com volume mínimo de 1,5mL. O equipamento faz uma homogenização



Figura 3: Equipamento VES-Matic 200

automática, ficando a amostra em repouso durante um período de tempo determinado permitindo assim que a sedimentação ocorra. Através de sensores analógicos o instrumento determina o nível de sedimentação dos eritrócitos e calcula automaticamente o valor, que é impresso ou transmitido para o Software central. As leituras são efectuadas por feixe de luz visível, sendo a primeira feita após a homogenização e outra passados 26 minutos, as subseqüentes leituras são realizadas a cada 18 segundos até obtenção de valor constante e estável. O resultado obtido resulta do diferencial observado entre leituras. Os valores de referência para VS são:

- 2 – 20 mm/h no Homem
- 2 – 30 mm/h na Mulher
- 2 – 10 mm/h na criança
- Valores superiores a 120 mm/h são reportados como 120 mm/h.

A interpretação dos resultados da VS podem ser associados a:

Elevação da VS		
Patológica	Fisiológica	Diminuição da VS
Anemias	Idade	Drepanocitose
Leucemias	Sexo feminino	Esferocitose
Inflamação activa	Gravidez	
Mieloma múltiplo	Período menstrual	

Tabela 3: Variações da Velocidade de Sedimentação

Hemoglobinopatias

A hemoglobina é uma metaloproteína, constituída por um tetrâmero com dois pares de cadeias polipeptídicas e quatro grupos Heme, que estabelecem a ligação ao Oxigénio. A hemoglobina normal apresenta a seguinte composição:

Hemoglobina	Composição	Recém Nascido	Adulto
Hb A	($\alpha_2\beta_2$)	25%	96-98%
Hb A2	($\alpha_2\delta_2$)	< 1%	< 3,5%
Hb F	($\alpha_2\gamma_2$)	75%	< 1%

Tabela 4: Constituição das principais Hemoglobinas

As patologias associadas á Hemoglobina podem ser de natureza quantitativa, por ausência ou diminuição da síntese das cadeias α globina (α Talassémias) ou das cadeias β globina (β Talassémias), ou podem ser de natureza qualitativa, causadas por alterações genéticas em que uma ou mais mutações ou substituições de aminoácidos levam á alteração da estrutura da molécula com aparecimento de formas variantes de Hb.

A Beta-Talassémia pode ser clinicamente classificada como major ou minor, em termos bioquímicos como β^0 (ausência de síntese da cadeia) ou β^+ (redução da síntese da cadeia) ou em termos genéticos como heterozigótica, homozigótica ou compostos heterozigóticos. A detecção de HbA2 > 3,5% é suspeita de portador portador de Beta-Talassémia.

No Laboratório é utilizado o equipamento CAPILLARYS 2 para a realização da electroforese de Hemoglobinas. O método utilizado é a electroforese capilar. As amostras de sangue são introduzidas no equipamento, que procede de forma automática à adição da solução hemolizante, incubação da amostra e injeção no capilar. Os resultados surgem em software apropriado com representação gráfica das bandas obtidas.

No Laboratório existe ainda o ADAMS A1C que é um equipamento automático para determinação de Hemoglobina glicada (HbA1c) por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de troca catiónica em fase inversa. A leitura é bi-cromática a 415-500nm. O equipamento pode trabalhar com dois programas distintos, no programa HbA1c determina HbA1c, HbA1, HbF e ainda as principais variantes da Hb, no programa para rastreio de Talassémia determina HbA1c, HbA1, HbF, HbA2 e quantifica as principais variantes da Hb.

As formas variantes mais frequentes são HbS, HbC, HbD punjab, HbE. A Drepanocitose ou anemia das células falciformes caracteriza-se pela presença da HbS, podendo o portador ser heterozigótico ou homozigótico.

A **Prova da Falciformação** é uma técnica manual para pesquisa de células falciformes. O procedimento consiste em: 1) Colocar 2 gotas de Dissulfito de Sódio 2% (0,2g dissulfito com 10mL água) numa lâmina; 2) Adicionar uma gota de sangue total; 3) Cobrir com lamela e isolar os rebordos com verniz; 4) Observar ao microscópio aos 0`, 15`, 30` e 60`. Os resultados são dados para os diferentes tempos de observação, considerando que o positivo ocorre quando 30 a 40% dos eritrócitos apresentam forma de foice. A HbS só é detectada pela prova de falciformação quando está acima de 30%.

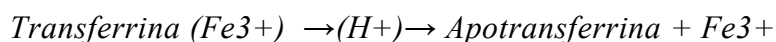
Classificação de Anemias e sua Avaliação

As anemias caracterizam-se por uma diminuição do valor da Hb ou Ht, relativamente a um valor basal individual.

As constantes globulares VGM, HGM, CHGM, RDW e PDW permitem a classificação morfológica das anemias e sua orientação etiológica.

As anemias Microcíticas podem estar associadas a alterações do metabolismo do Ferro (anemias ferropénicas), a hemoglobinopatias, a doenças crónicas ou ainda a causas raras como a anemia sideroblástica.

A determinação de Ferro é feita por reacção colorimétrica. O princípio da técnica baseia-se na dissociação em meio ácido, do Ferro férrico e da sua proteína de transporte (transferrina). Após libertação do ferro e sua redução ao estado ferroso, dá-se a complexação com a ferrozina produzindo-se um cromóforo que absorve a 571/658nm.



A transferrina é a proteína plasmática responsável pelo transporte do Ferro até aos depósitos de reserva ou tecidos onde este é necessário. Cada molécula de transferrina pode ligar dois iões Fe^{3+} . A transferrina é determinada por imunoturbidimetria intensificada por PEG. A amostra a analisar é diluída e reage com anti-soro específico para transferrina, formando um precipitado que é medido por turbidimetria a 596/694nm.

Assim, a determinação concomitante do ferro e da transferrina permite o cálculo da Taxa de Saturação da Transferrina que é expressa pela seguinte fórmula:

$\% \text{ Saturação da Transferrina} = [\text{ferro}] * 100 / [\text{transferrina}] * 1,43.$

A **ferritina** constitui uma forma de reserva de Ferro rapidamente disponível/mobilizável. A ferritina é uma proteína constituída por apoferritina e átomos de Fe^{3+} . Enquanto forma de armazenamento do ferro, a ferritina permanece nos tecidos até ser necessário fornecer ferro para a eritropoiese. No soro encontra-se em baixas concentrações e os seus valores são directamente proporcionais ao stock fisiológico de ferro.

A determinação da Ferritina é útil no diagnóstico de anemias ferropénicas, anemias por infecções crónicas, em condições de talassémia e hemocromatose associadas a sobrecarga de ferro. Apresenta particular interesse na distinção entre anemias ferropénicas causadas por carência de ferro e anemias resultantes de uso inadequado do ferro. A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

A determinação dos parâmetros associados ao metabolismo do Ferro, permite a classificação da anemia Ferropénica.

A anemia **Macrocitica** pode apresentar etiologias muito diversas como alterações megaloblásticas (deficiência em Vitamina B12 e/ou Folatos), mielodisplasias, doença hepática, alcoolismo, anemia hemolítica, hemorragias. A contagem de reticulócitos e observação de neutrófilos hipersegmentados no esfregaço são bons indicadores etiológicos. Quando temos uma contagem de reticulócitos aumentada pode indicar anemia hemolítica, ou anemia tratada por deficiência em vitamina B12 ou Folatos. Quando a contagem é normal ou diminuída e sem alterações megaloblásticas pode estar associado a mielodisplasia, alcool, drogas, doença hepática ou anemia aplástica. Quando normal ou diminuída mas com alterações megaloblásticas pode ser devida a deficiência em vitamina B12 e/ou Folatos.

A **vitamina B12** ou Cianocobalamina é fornecida ao organismo através de fontes alimentares como fígado, carnes, crustáceos, ovos ou leite, estando ausente nos vegetais, frutas e cereais. A vit B12 é libertada no estômago onde se liga à transcobalamina e ao factor intrínseco (FI). Ao nível do duodeno liberta-se da transcobalamina e formam-se complexos vit B12- FI que no íleo são fixados nos enterócitos e internalizados por endocitose graças aos receptores específicos para o FI. A vit B12 é libertada no interior dos enterócitos e transportada para o sangue. A vit B12 actua como coenzima no metabolismo dos folatos e intervém na síntese de DNA, como tal na hematopoiese e eritropoiese. Deficiências na síntese de DNA associadas à falta de vit B12 originam

anemia macrocítica. As carências em vit B12 ou folatos podem surgir por aumento das necessidades (ex: gravidez), má absorção (ex: diminuição do factor intrínseco) ou alteração do metabolismo (ex: alterações congénitas do metabolismo dos folatos).

A anemia perniciosa caracteriza-se pela falta de factor intrínseco e consequentemente deficiência em vitamina B12.

A determinação da vit B12 é feita por imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminiscência directa.

Os folatos são coenzimas das reacções de síntese de DNA, tal como a vit B12, tornando-se essenciais para a normal maturação dos eritrócitos. O folato é fornecido ao organismo frutos, vegetais, fígado. A determinação é feita por imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminiscência directa.

A **Homocisteína** é um aminoácido, cujo metabolismo é regulado por três vias enzimáticas distintas, sendo uma delas a que envolve os folatos e vit B12 para obtenção de metionina. Quando uma ou mais vias metabólicas da homocisteína são inibidas por deficiência enzimática ou vitaminica, observa-se o seu aumento. Deficiências em enzimas reguladoras da homocisteína resultam em homocisteinémia e homocisteinúria. As deficiências em folatos, vitamina B6 ou vitamina B12 também provocam homocisteinémia, que pode ser detectada mais precocemente. A determinação da homocisteína é feita por imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminiscência directa.

A anemia **Normocítica** pode estar associada a fases iniciais de anemias por deficiência de Ferro, vitamina B12 ou Folatos. Podem ainda ser provocadas por patologias que promovam o aumento da hemólise, originando as anemias hemolíticas.

Avaliação da Hemostase e Coagulação

O **BCS® XP (Dade Behring)** é um equipamento automático, de transmissão bidireccional de dados, com identificação de amostras, calibradores e controlos por código de barras. Tem capacidade para

realizar testes baseados no tempo de formação do coágulo, cromogénicos, imunológicos e de aglutinação. Destina-se à execução “in vitro” de testes funcionais para avaliação da hemostase e da coagulação, por determinação de TP, aPTT, Fibrinogénio, bem como os



Figura 4: Equipamento BCS® XP

restantes factores de coagulação. A amostra utilizada é o plasma obtido em tubo de citrato (9 volumes de sangue e 1 volume de citrato de sódio 5.5 H₂O a 3.2%). O citrato trissódico actua por remoção do Cálcio, sendo o anticoagulante mais utilizado na avaliação da hemostase e coagulação.

O equipamento é constituído por um sistema para processamento de análises coagulométricas, cromogénicas e de química imunológica. Com determinação por fotometria/turbidimetria. Utiliza uma fonte de luz intermitente de Xenon com emissão de banda larga, em que um filtro de interferência é utilizado para obter luz com o comprimento de onda desejado. A luz é canalizada em partes iguais através de um canal de medição e um canal de referência. Quando passa pela cuvete, o feixe de luz fica enfraquecido devido à difusão por partículas ou absorção na solução. Durante o processo de coagulação a preparação torna-se cada vez mais turva; a intensidade do feixe de luz que sai fica cada vez menor. Nas análises cromogénicas, um pigmento é libertado durante a reacção, reduzindo a quantidade de luz que passa pela cuvete, a luz desviada é bloqueada por um sistema de diafragma. A luz do 2º canal vai directamente para um 2º detector para que as flutuações no brilho da fonte de luz sejam niveladas. O equipamento faz dois pontos de medição por segundo, por cuvete. A intensidade da luz é convertida em sinal eléctrico por um fotodetector.

O **Tempo de Protrombina (PT)** consiste num teste funcional de medição do tempo que leva a coagular uma amostra de plasma, desprovido de plaquetas e anticoagulado com citrato. A adição de tromboplastina tecidular desencadeia a formação do coágulo de fibrina por activação da via extrínseca da coagulação, na presença de Ca²⁺. É habitualmente usado para monitorizar a terapêutica anti coagulante oral.

Uma deficiência num factor de coagulação da via extrínseca (Factores II, V, VII e X) provoca aumento do tempo de formação do coágulo. Esta deficiência pode ser associada a alterações hereditárias ou a deficiência em vitamina K. Medicamentos como a Warfarina fazem baixar a vitamina K, tendo também como consequência o aumento do PT.

Como as diferentes tromboplastinas disponíveis no mercado apresentam diferentes actividades, tornou-se essencial normalizar os resultados. Para tal, determina-se o INR (International Normalised Ratio) recomendado pela WHO (World Health Organization). Este é calculado segundo a fórmula:

$$\text{INR} = \frac{\text{PT/MNPT}}{\text{ISI}}$$

Em que, o ISI (International Sensitivity Index) é dado pelo fornecedor, para cada lote de tromboplastina. O MNPT (Mean Normal Protrombine Time) é a média geométrica do valor de PT de pelo menos 20 adultos saudáveis. O INR fornece uma escala padronizada para monitorização dos doentes submetidos a anticoagulantes orais.

O **Tempo de Tromboplastina Parcial Activada** (aPTT) é o tempo necessário para formação do coágulo de fibrina, num plasma citratado, após adição de cefalina (substituto dos fosfolípidos plaquetários de membrana), sílica e iões de cálcio que desencadeiam a formação do coágulo. O reagente do aPTT é misturado com o plasma, para produzir uma activação uniforme e optimizada da amostra, sendo a reacção iniciada pela adição de Ca^{2+} .

A sua determinação permite fazer teste de screening para detecção de anomalias do sistema intrínseco (factores II, V, VIII, IX, X, XI e XII, é insensível ao factor III plaquetário). É utilizado para monitorização da terapêutica com heparina.

O **Fibrinogénio** é uma glicoproteína sintetizada no fígado. A etapa final da coagulação consiste na conversão do fibrinogénio em fibrina, sob a influência da trombina. É determinado por adição de um excesso de trombina ao plasma diluído, sendo o tempo de formação do coágulo proporcional à concentração de fibrinogénio presente na amostra.

A determinação dos diversos factores é realizada recorrendo a reagentes isentos do factor que se pretende dosear.

A **Protrombina** (factor II) é uma proenzima sintetizada no fígado. A parte catalítica da enzima que actua na coagulação é formada com ajuda da vitamina K. A cascata fica comprometida quer por deficiência de protrombina, quer pela ausência de vitamina K.

O **Factor III** (tromboplastina tecidual) é constituído por fosfolípidos e lipoproteínas, forma um complexo com o factor VII e Ca^{2+} dando início à via extrínseca da coagulação. Este complexo corresponde ao reagente do TP.

O **Factor V** é sintetizado pelo fígado e a sua determinação é muito instável, pelo que necessita de refrigeração. É um cofactor da cascata, que participa na activação da protrombina pelo factor Xa.

O **Factor VIII** é dependente da vitamina K, apresenta semivida curta. É um cofactor da cascata, que participa na via intrínseca na activação do factor X pelo factor IXa. A Hemofilia A resulta de uma deficiência genética associada ao cromossoma X, que provoca deficiência no factor VIII.

O **Factor IX** participa na via intrínseca, é activado pelo factor XIa na presença de Ca^{2+} . A Hemofilia B resulta da deficiência no factor IX.

O **Factor von Willebrand (vWF)** é um complexo glicoproteico sintetizado nos grânulos α das plaquetas. Este complexo funciona como uma ponte entre um complexo glicoproteico à superfície das plaquetas. Funciona ainda como transportador do factor VIII.

A diminuição da resistência à proteína C activada (**ProC®AcR**), causada pelo defeito genético no factor V de Leiden, constitui um teste de rastreio baseado no veneno de víbora Russel. É um teste de coagulação funcional, que pode ser executado em doentes a fazer anticoagulantes orais. A diminuição da resistência APC é causada por uma mutação no gene do factor V. Esta mutação retarda a inactivação do factor V pela proteína C activada, provocando um aumento na tendência de coagulação. O teste baseia-se na activação da proteína C endógena através da incubação do plasma com o veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*. Com a amostra de plasma é efectuada uma determinação com diluição do Russel's Viper Venom Time (DRVVT) activador de veneno de serpente para o factor X. O DRVVT reage de forma sensível às alterações de concentração da APC. Nos indivíduos normais, devido á activação da proteína C, o resultado do teste com activador é prolongado duas a três vezes, quando comparado com o resultado do teste com tampão. Nos indivíduos com factor V de Leiden, a activação da proteína C pelo veneno provoca apenas um prolongamento insignificante, inferior a 1,5 vezes. A diminuição da resistência à proteína C pode também ser causada por outras mutações no factor V. Na avaliação dos resultados uma relação $\leq 1,5$ indica variante factor V Leiden, que pode ser confirmada por análise genética; uma relação entre 1,5 e 2,1 indica uma concentração de proteína C diminuída e pode necessitar de confirmação de resultados; um resultado $>2,1$ é negativo para a presença de resistência à APC.

Imunohematologia

O **Ortho Auto Vue** é um equipamento automático para execução de testes imunohematológicos “in vitro” de sangue humano, utiliza a tecnologia



Figura 5: Equipamento Ortho Auto Vue

de cards e processamento de imagens digitais. Executa de forma automática o processamento de testes, pipetagem de líquidos, deslocação de cards, incubação,

centrifugação, classificação e interpretação da reacção. Tem capacidade de determinar grupos sanguíneos AB0/Rh, prova directa e reversa, grupo Reverso, Fenotipagem Rh, Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) e Teste Directo de Antiglobulina. Aplica a Tecnologia de Aglutinação em Coluna (CAT), em cards com reagente e/ou diluente e esferas de vidro. Os eritrócitos transferidos para a microcoluna, são submetidos a centrifugação, sendo forçados a passar através da coluna e formando um pellet no fundo da mesma. Quando ocorre reacção de aglutinação por ligação Ag-Ac observa-se a formação de um precipitado que não atravessa a microcoluna.

À superfície dos eritrócitos, existem antigénios determinados geneticamente. As diversas categorias de antigénios eritrocitários representam cerca de 15 sistemas de grupos sanguíneos, em que os principais são o sistema AB0 e o sistema Rhésus.

Na prova directa detectamos a presença ou ausência de Ag de superfície no GV de amostras de sangue total, pela sua ligação a Ac Anti-A e Ac Anti-B em soros teste.

Na prova reversa testa-se o soro/plasma do doente com eritrócitos A₁ e B (não é obrigatório testar eritrócitos A₂ ou O), detectando-se a presença ou ausência dos respectivos Ac. O grupo AB0 do paciente é definido quando se observa concordância no resultado de ambas as provas.

Na população caucasiana a frequência dos vários grupos AB0 é de 46% grupo 0, 41% grupo A, 9% grupo B e 4% grupo AB. Relativamente ao grupo Rh, 89% da população caucasiana é Rh positiva. Esta classificação refere-se à presença ou ausência de Ag D⁺.

A PAI tem como objectivo a detecção de anticorpos anti eritrocitários clinicamente relevantes. Utilizam-se três suspensões eritrocitárias de dadores seleccionados do grupo 0, com fenótipos conhecidos caracterizados pela presença de antigénios que originem formação de Anticorpos com significado clínico. Na pool de células deve-se garantir a presença dos seguintes antigénios: D, C, c, E, e, K, k, jk^a, jk^b, Fy^a, Fy^b, M, N, S, s e Le^a. O resultado obtido é semiquantitativo com escala de 1 a 4, verificando-se que resultados de valor numérico 1 são duvidosos e devem ser confirmados. Para dar um resultado semiquantitativo devem ser executadas diversas diluições, de modo a indicar qual a diluição mais baixa para a qual o resultado se mantém positivo. Quando o resultado é positivo deve-se proceder à identificação do Ac específico.

O CQI é realizado de acordo com o plano do sector analítico, recorrendo a vários níveis de controlo (Normal, Baixo e Alto). A aceitação dos resultados é feita com base

nos limites de aceitação definidos. Os resultados são registados em cartas de registo diário e são acumulados em quadros mensais para tratamento estatístico com verificação do desempenho mensal. São calculados os seguintes parâmetros: Média, Desvio padrão (SD), Coeficiente de variação (CV), BIAS, Erro total (ET), ID (inexactidão), ICV (imprecisão).

Core Laboratorial – Química Clínica

O core laboratorial é constituído por diversos sistemas analíticos em cadeia. O processamento das amostras é feito através dos tubos primários, identificados por código de barras, sendo a sua distribuição automática pelos diversos equipamentos.

A aceitação dos resultados da série analítica e validação técnica dos resultados do Controlo de Qualidade Interno (CQI), faz-se com base no Plano de CQI. Nos ensaios são utilizados 2 ou 3 níveis de controlo por cada parâmetro analítico. As determinações efetuam-se diariamente e com determinada frequência.

No laboratório existe um programa Unity, específico para tratamento de dados de controlo interno, é aplicado aos equipamentos automáticos que se encontram ligados em rede. Para cada parâmetro encontram-se definidos o lote, matriz da amostra, teste (técnica, equipamento, condições de ensaio, método de deteção), validade e regras de rejeição.

Devem ser utilizados sempre que possível, controlos internos de uma casa comercial diferente da representante do equipamento.

Se os valores do CIQ se encontram dentro dos limites de desempenho, o sistema apresenta uma boa performance.

No Core Laboratorial – Química Clínica, o requisito adoptado é os 3SD sendo o SD determinado com base na Imprecisão do método $\times$ Factor de Limite de controlo $\times$ Média / (3 $\times$ 100). A Média e Imprecisão são determinadas mensalmente e a primeira só é ajustada quando a diferença for significativa.

Quando este critério não se cumpre, o procedimento correctivo é a recalibração do parâmetro analítico. Se ainda assim o controlo interno sair dos 3SD, a série de trabalho pode ser validada desde que o valor se encontre dentro do ET admissível (Média $\pm$ ET adoptado) visto que este leva em consideração a variabilidade clinicamente significativa.

Sobre Metodologias utilizadas

A área de bioquímica é uma área altamente automatizada envolvendo a maior parte da rotina do laboratório e por isso os métodos devem ser executados do modo mais rápido e eficiente possível. De seguida descrevo as metodologias aplicadas nos equipamentos automáticos.

1. Métodos Eletroquímicos: Potenciometria

Os métodos potenciométricos medem a força electro motriz de células galvânicas de tal modo constituídas, que o potencial de um dos componentes do par eletrolítico possa ser tomado como uma resposta às concentrações de espécies iónicas presentes na solução. Na maior parte dos métodos eletroquímicos utilizam-se dois electrodos, um indicador em cujo potencial estamos interessados e um de referência cuja função é manter um potencial reproduzível e constante. A potenciometria baseia-se então na medição do potencial dum electrodo indicador em relação a um electrodo de referência, quando não passa corrente através da solução em que estão mergulhados. Este potencial depende das actividades das espécies que entram nas reações redox correspondentes.

2. Métodos Fotométricos: Espectrofotometria

A espectrofotometria é o método óptico mais usado nas análises clínicas. O espectrofotómetro é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida da mesma substância. Todas as substâncias podem absorver energia radiante. A absorção das radiações ultravioletas, visíveis e infravermelhas dependem das estruturas das moléculas, e é característica para cada substância química.

Quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida (absorbância), parte é refletida (Reflectância) e parte é transmitida (Transmitância). A energia radiante não pode produzir nenhum efeito sem ser absorvida.

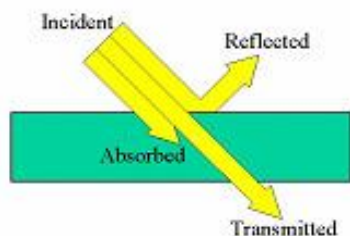


Figura 6: Esquema de Absorção, Reflexão e Transmissão da luz

O **Advia 2400 Chemistry System** é um equipamento de bioquímica clínica automatizado. Tem capacidade para incluir até 49 métodos, com sistema de detecção colorimétrica e ISE (Eléctrodos Seletivos). O fotómetro usa lâmpada de halogéneo, refrigerada com água, a 14 comprimentos de onda distintos. Realiza ensaios por determinação de ponto final, velocidade da reação, velocidade da reação a dois pontos, medição simultânea de três itens, prozone check ou de degradação do substrato.

O sistema analítico permite a determinação dos índices de hemólise (H), icterícia (I) e lipémia (L) das amostras analisadas. Estes índices são úteis para a validação analítica dos ensaios uma vez que determinados analitos sofrem a interferência da hemólise, icterícia ou lipémia em vários graus.

3. Reações de Precipitação: Imunoturbidimetria/Nefelometria

A turvação causa atenuação (diminuição) da intensidade de um feixe de luz quando este passa através de uma solução de partículas. A turbidimetria é uma medida da diminuição da intensidade da luz incidente causada pela dispersão, reflexão e absorção do feixe de luz de uma dada intensidade.

A Nefelometria mede a quantidade de material suspenso, a partir da medição da luz dispersa ou refletida para um detector, o qual não está colocado na mesma direção do feixe de luz incidente. Normalmente os nefelómetros medem a intensidade de luz dispersa em ângulos rectos, em relação ao feixe de luz incidente, i.e., medição da luz dispersa num ângulo de 90° em relação a um feixe de luz incidente. O princípio da Nefelometria baseia-se na intensidade da dispersão da luz ser proporcional à quantidade de imunocomplexo existente na amostra. A nefelometria é um dos métodos mais usados para a determinação imunoquímica de proteínas no soro, urina e outros líquidos biológicos.

O método nefelométrico com leitura da luz dispersa a 90° é vantajoso para a leitura de baixos valores de turvação. A turbidimetria é mais adequada para a leitura de valores médios ou altos de turvação, onde há uma forte dispersão da luz devido ao elevado número de partículas.

O Clinitek Atlas é um equipamento automático para análise química de urinas tipo II, com emprego de tiras reativas. A tira encontra-se impregnada com reagentes específicos, que ao reagirem com a urina provocam alteração da cor, medida por fotometria de refletância (mede a λ específico, a intensidade da luz refletida).

O equipamento **BN ProSpec** é um nefelómetro para quantificação automática de algumas proteínas no soro, urina, plasma ou LCR. As proteínas formam imunocomplexos com Ac específicos numa reação imunoquímica, que



dispersam um feixe de luz incidente. A intensidade da luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A determinação é realizada por comparação com padrão de concentração conhecida.

4. Cromatografia

Os métodos cromatográficos baseiam-se na separação dos componentes de uma mistura devido à diferente afinidade desses componentes para duas fases presentes, a fase estacionária e fase móvel. Atendendo à natureza do equilíbrio químico estabelecido

entre as fases, podemos ter diferentes tipos de cromatografias como Cromatografia de Adsorção, de Partição, de Permuta Iónica, de Afinidade, etc.

O **ADAMS A1C** é um equipamento automático para determinação de Hemoglobina glicada (Hb A1c) por cromatografia de troca catiónica em fase inversa. A leitura é bi-cromática a 415-500nm.

5. Electroforese

A eletroforese é uma técnica que permite a separação de analitos. Baseia-se no facto de os analitos migrarem com velocidade diferente, que depende da carga, tamanho do analito e do campo eléctrico aplicado no meio onde ocorre a separação. O gel de agarose é habitualmente utilizado para separação de proteínas. A electroforese capilar em gel é habitualmente utilizada para separação de fragmentos de DNA ou proteínas e a separação ocorre quando se enche o capilar com uma matriz de poliacrilamida ou outros polímeros.

O **HYDRASYS FOCUSING** é um equipamento semiautomático para realização de diferentes electroforeses em gel de agarose. Compreende a aplicação de amostras, migração, incubação, secagem, revelação (coloração e descoloração) e secagem final. A aplicação de uma diferença de potencial permite a separação de partículas com diferentes dimensões, as de menor massa migram mais rapidamente que as de maior massa. As proteínas a detectar são conjugadas com SDS (dodecil sulfato de sódio) carregado negativamente, superando a carga intrínseca da proteína e obrigando-a a migrar em direção ao polo positivo, quando se aplica a voltagem. Numa mistura de proteínas obtêm-se diferentes bandas por fracionamento, em função da massa da proteína que é retardada pela malha do gel de agarose.

O procedimento geral da técnica consiste em: 1) aplicar amostras, as urinas são aplicadas diretamente, os soros são previamente diluídos de forma automática em cuvetes no HydraPlus e aplicadas sobre os pentes; 2) colocar o gel adequado e tiras embebidas com tampão. Com papel de filtro retira-se o excesso de humidade no gel; 3) colocar os pentes sobre o gel; 4) migração electroforética da amostra sobre o gel. O programa tem voltagem, tempo e temperatura definidas; 5) pipetar antisoros específicos para os poços; 6) aplicar os Ac sobre o gel, fazendo-os rolar sobre toda a zona de migração; 7) incubar para que ocorra a ligação; 8) utilizar o papel de filtro para remover excessos; 9) secar e lavar; 10) retirar a película e colocar no suporte para corar/descorar.

Observa-se a revelação de bandas positivas; 11) secagem final. Os passos 5, 6 e 7) são realizados para técnicas de imunofixação.

A técnica tem diferentes aplicações, como a realização de electroforese de proteínas, de Imunoglobulinas, Lipidograma, pesquisa de Bence Jones, etc.

6. Imunoensaios marcados: Enzima Imuno Ensaio (EIA), Imunoensaio de Luminiscência

Os ensaios imunológicos baseiam-se na interação entre Antígeno e Anticorpo (Ag-Ac), que permite a identificação e quantificação do analito específico. A reação Ag-Ac caracteriza-se pela sensibilidade, especificidade, reações cruzadas e velocidade da reacção. Podem ser utilizados diferentes tipos de marcadores, que vão originar diferentes aplicações para os imuno ensaios, como os radioisótopos (ex:I125) para a RIA, enzimas (ex: Fosfatase alcalina, peroxidase, glucose-6-fosfato-desidrogenase) para a EIA, fluorocromos (ex: fluoresceína) para a Imunofluorescência, quimioluminiscentes (ex: luminol).

Os EIA caracterizam-se pela marcação enzimática, apresentando segurança na manipulação e um vasto campo de aplicação. Classicamente utilizam-se substratos cromogéneos para avaliação dos resultados.

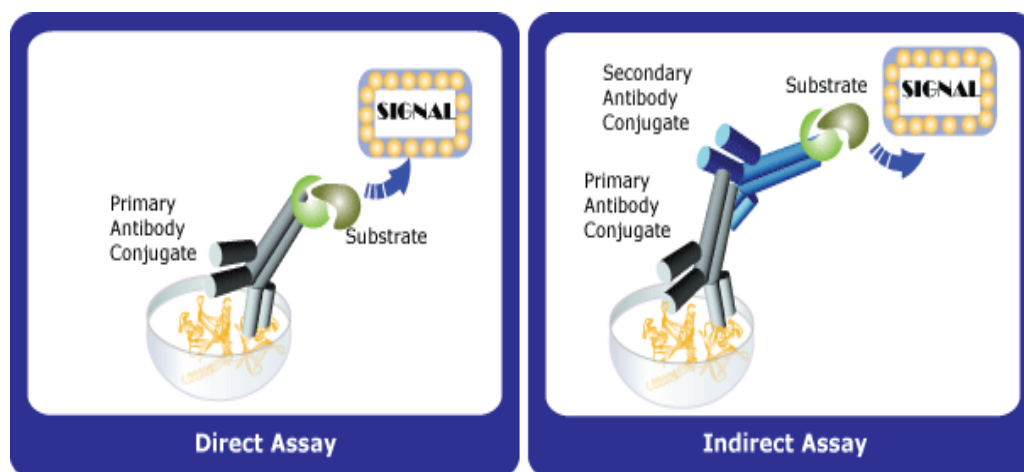


Figura 8: Esquema de ensaios imunoenzimáticos

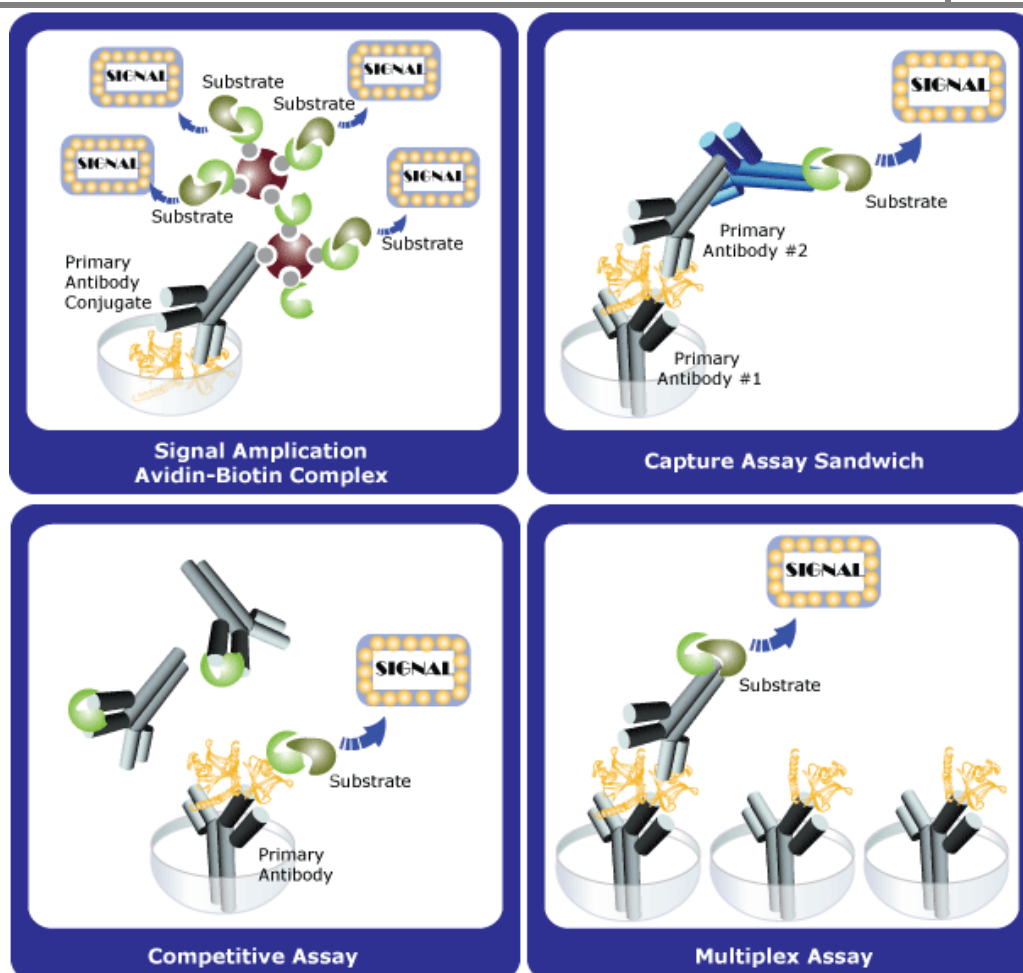


Figura 9: Esquema de ensaios imunoenzimáticos

A electroquimioluminiscência é um processo onde intervêm espécies altamente reativas, geradas a partir de precursores estáveis, à superfície de um electrodo. Estas espécies reativas reagem entre si, emitindo luz.

O **ADVIA Centaur** é um equipamento automático de técnicas imunoenzimáticas, com detecção por quimioluminiscência. A quimioluminiscência constitui uma reacção química que emite energia sob a forma de luz, quando combinada com imunoensaio, a luz produzida pela reacção é proporcional á quantidade de analito na amostra. O ADVIA utiliza éster de acridina como marcador quimiluminescente, que por acção do H_2O_2 é oxidado e é maximizada a emissão de luz pela alteração do ambiente de ácido para básico. A emissão de luz é muito rápida, tornando a técnica de quimioluminiscência mais rápida que os ensaios de RIA ou EIA (Enzyme Imuno Assay).

Nos imunoensaios utilizam-se Anticorpos marcados, produzidos para se ligarem a antígenos específicos, que correspondem ao analito a analisar. O sistema utiliza ainda partículas paramagnéticas (cristais de óxido de ferro atraídas por um campo magnético), que revestidas por anticorpos ou antígenos, constituem a fase sólida da reacção. Durante a incubação, as partículas revestidas ligam-se ao Ac ou Ag específico e quando são necessárias lavagens, a aplicação de um campo magnético através de ímanes, garante que

as partículas se mantêm na cuvete enquanto o sistema lava a amostra e o reagente não ligado. Existem vários formatos de EIA, que serão explicados na secção de imunologia, no entanto é de referir que o Centaur executa ensaios de EIA do tipo sandwich, tipo competitivo, por captura de Ac.

- 1 Compartimento de reagentes primários
- 2 Sondas dos reagentes primários
- 3 Anel de incubação
- 4 Luminómetro
- 5 Sonda de reagente de base
- 6 Sonda de resíduos
- 7 Receptáculo de colocação de cuvetes
- 8 Sondas de aspiração
- 9 Ímanes
- 10 Bloco de lavagem
- 11 Sonda de reagente ácido
- 12 Sonda auxiliar
- 13 Sonda de amostras
- 14 Fila de reagentes auxiliares
- 15 Suporte de pontas de amostras
- 16 Fila em curso
- 17 Fila de entrada de amostras
- 18 Suporte de amostras
- 19 Entrada de amostras urgentes
- 20 Fila de saída de amostras
- 21 Estação de trabalho de interface

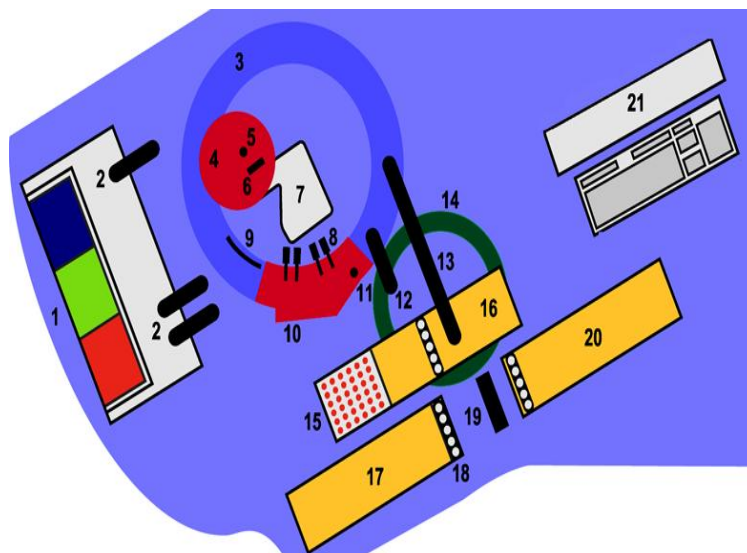


Figura 10: Esquema do interior do Advia Centaur

O **Immulate 2000** é um equipamento automático para realização de ensaios imunoenzimáticos com detecção por quimioluminiscência.

O **COBAS 411** é um equipamento automático que realiza imunoenaios por electroquimioluminiscência. A célula de leitura utiliza amplificação do sinal, para detecção de concentrações muito baixas, aumentando a sensibilidade do equipamento.



Figura 11: Equipamento Cobas 411

Metabolismo dos Hidratos de Carbono

A Glucose é o principal carbohidrato a fornecer energia ao organismo. As alterações nos valores da glicémia traduzem-se em hipoglicémias (menos frequentes) ou hiperglicemias, que servirão de apoio ao diagnóstico da Diabetes.

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) o diagnóstico da Diabetes Mellitus é garantido unicamente por processos analíticos e baseia-se na obtenção dos seguintes resultados: Glicémia em jejum $\geq 126\text{mg/dL}$ ou Sintomas clássicos e Glicémia ocasional $\geq 200\text{mg/dL}$ ou

- ✓ Glicémia $\geq 200\text{mg/dL}$ às 2h, numa **PTGO** (Prova de Tolerância Oral à Glucose) com 75g de glucose ou
- ✓ HbA1c $\geq 6,5\%$

A observação de um destes parâmetros alterados deve ser confirmada pela determinação de um dos outros ou pela repetição do mesmo, após duas semanas.

Uma anomalia de Glicémia em jejum é considerada quando se obtém um valor de Glicémia em jejum $\geq 110\text{mg/dL}$ e $< 126\text{mg/dL}$.

A tolerância diminuída à glucose ocorre quando se obtém um valor de Glicémia em jejum $\geq 140\text{mg/dL}$ e $< 200\text{mg/dL}$ às 2h na PTGO.

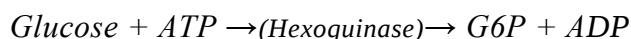
Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) o diagnóstico da **Diabetes Gestacional** é feito por determinação da glicémia em jejum na primeira consulta pré natal e pela PTGO às 24-28 semanas de gestação. Baseia-se na obtenção dos seguintes resultados:

- ✓ Glicémia em jejum $< 92\text{mg/dL}$ sugere realização de PTGO às 24-28 semanas, com carga de 75g de glucose.
- ✓ Glicémia $\geq 92\text{mg/dL}$ e $< 126\text{mg/dL}$ indica Diabetes Gestacional
- ✓ Glicémia em jejum $\geq 126\text{mg/dL}$ ou Glicémia ocasional $\geq 200\text{mg/dL}$ sugere Diabetes prévia à gestação.

A deteção de HbA1c $\geq 6,5\%$ é interpretada como critério de diagnóstico provável de diabetes prévia.

A determinação da Glucose é feita pelo método da Hexoquinase, com reação de ponto final e leitura a 340/410 nm.

O método enzimático utilizado baseia-se no facto da Glucose ser fosforilada pelo ATP na presença da hexoquinase e a glucose-6-fosfato que se forma ser oxidada na presença da glucose-6-fosfato desidrogenase, originando a redução de NAD a NADH. A absorvância do NADH formado é depois medida e proporcional á concentração de glucose presente na amostra.



Na determinação da **Hemoglobina Glicada** a amostra a utilizar é sangue total.

O interesse clínico da determinação da HbA1c está associado à monitorização de doentes diabéticos. A forma estável da HbA1c não flutua em resposta a alterações rápidas nos factores fisiológicos, por isso fornece uma medida fiável do nível médio de glicémia dos últimos 2 a 3 meses.

Quando surge um resultado no cromatograma indicativo de hemoglobinopatia, com valor de HbA1c < 4% apresenta-se o valor numérico obtido com indicação de que foram detectadas alterações, por forma a que o clínico possa investigar.

O método utilizado para a determinação da HbA1c é a cromatografia de troca catiónica em fase inversa.

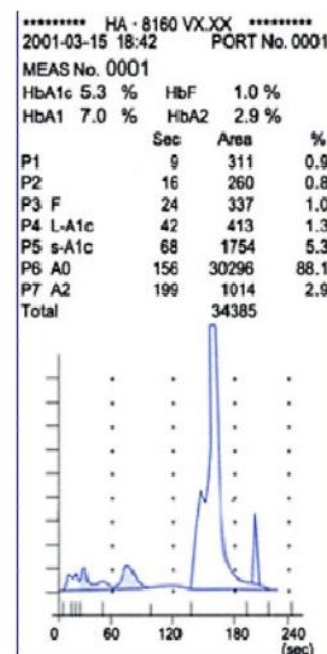


Figura 12: Gráfico do ADAMS A1c

A **Microalbuminúria** (μAlb) é utilizada como um parâmetro de avaliação e prevenção da nefropatia diabética. Corresponde à presença de pequenas quantidades de albumina na urina. Considera-se positiva quando o seu valor oscila entre 20-200mg/dL, que é o intervalo de concentração da albumina entre os valores limites de indivíduos saudáveis e os valores de doentes com nefropatia com testes positivos de proteinúria. A microalbuminúria é causada por alterações a nível glomerular, devido à diabetes.

O método baseia-se no trabalho de Fielding e Hellsing, mede níveis muito baixos de Alb em amostras de urina. A Alb é a principal proteína plasmática responsável pela força osmótica do sangue, sendo apenas uma pequena parte excretada na urina (até

20mg/L). Níveis aumentados de Alb na urina indicam problema na capacidade de filtração glomerular nos rins.

A determinação é feita por imunoturbidimetria intensificada por PEG. A amostra é diluída e reage com Anti-soro específico para formar um precipitado que é medido por turbidimetria a 340nm.

Metabolismo dos Lípidos

O Colesterol total é determinado em conjunto com outros parâmetros, como os Triglicéridos, HDL (High Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoprotein) e VLDL (Very Low Density Lipoproteins), para monitorização do perfil lipídico. É essencial ao organismo humano, sendo um componente fundamental na estrutura das biomembranas e um precursor de todas as hormonas esteróides e dos ácidos biliares. O colesterol plasmático, além de ser função do “input” (dieta e síntese endógena) e de um “output” (eliminação de sais biliares e de colesterol livre), também reflecte a capacidade de síntese das lipoproteínas transportadoras de colesterol, e a eficiência dos mecanismos da sua metabolização.

O seu doseamento tem interesse no diagnóstico e monitorização das perturbações do metabolismo lipídico e na avaliação do risco aterogénico. A diminuição do nível de colesterol no plasma reduz a incidência de doenças coronárias, além disso o colesterol está associado a perturbações de hiperlipidémia e dislipoproteinémias.

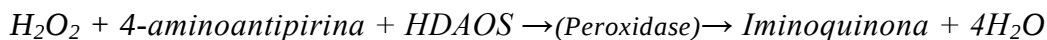
No ensaio os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colinesterase em colesterol e ácidos gordos livres. O colesterol é convertido em colesterol-3-ona pela colesterol oxidase na presença de O₂, formando H₂O₂. Um complexo corado é formado a partir do H₂O₂, da 4-aminoantipirina e do fenol sob a influência catalítica da peroxidase, sendo a Absorvância lida a 505/694nm.

O HDL é determinado por reação com duas fases. Na primeira etapa, o colesterol não HDL é libertado e eliminado por catalase. O colesterol é transportado no plasma ligado a lipoproteínas. Grande parte está ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e outra parte aparece como constituinte das lipoproteínas de alta densidade (HDL). As HDL são responsáveis pelo transporte do colesterol livre dos tecidos para o fígado, onde irá ser catabolizado. A monitorização do colesterol-HDL no soro é importante, porque existe uma relação inversa entre a sua concentração e o risco de doenças arterioscleróticas.





Numa segunda etapa é feita a quantificação específica do HDL, após a sua libertação por acção de um agente surfactante, a catalase da primeira reacção é inibida por acção de azida sódica.

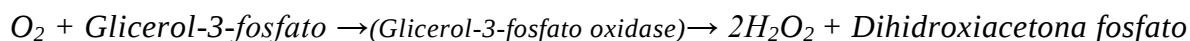
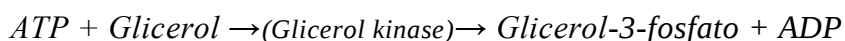
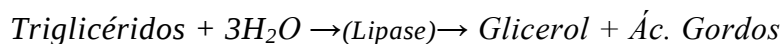


A intensidade da iminoquinona é directamente proporcional á concentração de HDL a 596nm.

O **LDL** é determinado por uma reacção de duas etapas. No primeiro passo da reacção é eliminado o colesterol associado a todas as lipoproteínas excepto a LDL. Um surfactante seletivo liberta o colesterol preferencialmente das partículas não LDL, o H_2O_2 produzido pela col. Esterase e pela col. Oxidase no 1º passo é eliminada pela catalase. O outro surfactante da 2ª etapa liberta o LDL, a azida presente inibe a catalase e o H_2O_2 formado é quantificado como ponto final da reacção.

Os **Triglicéridos** são determinados por uma reacção que utiliza um único reagente que quantifica o valor total de triglicéridos. São ésteres do glicerol com 3 cadeias de ácidos gordos de cadeia longa. São parcialmente sintetizados no fígado e outra parte é obtida pela dieta. A sua determinação tem interesse no diagnóstico e monitorização de patologias como a diabetes mellitus, doença hepática obstrutiva, síndrome nefrótico e nas alterações do metabolismo dos lípidos.

Estes são convertidos em glicerol e ácidos gordos livres pela lipase, depois o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato seguindo-se a sua conversão em H_2O_2 . Forma-se um complexo corado a partir do H_2O_2 , 4-aminofenazona e 4-clorofenol, sob a influência da peroxidase. A Absorvância do complexo é lida como ponto final da reacção a 505/694nm.



Lipidograma: análise útil no diagnóstico de hiperlipidémias, através da separação e quantificação das maiores lipoproteínas encontradas no soro. Das lipoproteínas fazem parte as quilomicron, betalipoproteínas ou LDL, pre-betalipoproteínas ou VLDL, alfa-lipoproteínas ou HDL.

As alterações das lipoproteínas estão associadas a aterosclerose e processos trombóticos. Devem ser utilizadas amostras de soro, após 12h de jejum, sem congelar nem diluir. Em todos os ensaios deve ser incluída uma amostra de referência com valores normais de colesterol e triglicéridos. A leitura por densitometria permite definir concentrações relativas (em %) de cada fracção obtida. Os valores de referência são: Beta lipoproteínas (LDL) 42,3 a 69,5%; pre-betalipoproteínas (VLDL) 2,0 a 31,2% e alfa-lipoproteínas (HDL) 15,1 a 39,9%.

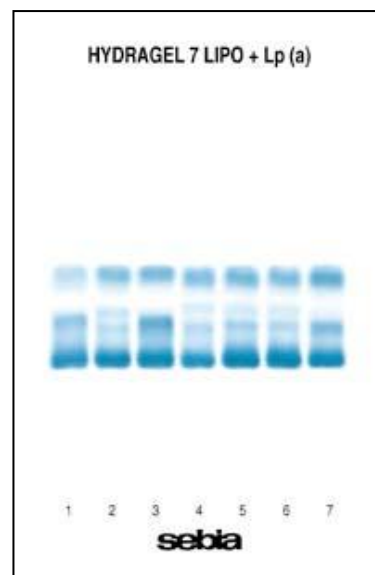


Figura 13: Lipidograma

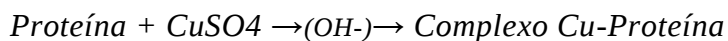
Segundo Fredrickson, as hiperdislipidémias podem ser classificadas em:

Tipo	I	IIa	IIb	III	IV	V
Colesterol total	2-4	3-10	2,8-3,5	3-5	<2,7	≤5
Trigliceridos	30-70	<1,6	2-5	2-9	2-10	≤30
Aspecto soro	leitoso	claro	Claro, pouco turvo	Claro, pouco turvo	turvo	leitoso
Quilomicra	++++	0	0	0	0	++++
LDL	- - -	+++	++	++ligado	-	- -
VLDL	N a - - -	N	++	++	+++	++
HDL	- - -	N a -	N a -	-	-	-

Tabela 5: Classificação de Hiperdislipidémias segundo Fredrickson

Metabolismo Proteico

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado. A sua determinação fornece algumas informações de carácter geral do paciente, nomeadamente no que concerne ao seu estado nutricional ou em determinadas doenças orgânicas. A determinação das Proteínas totais é feita segundo o método de Weichselbaum que utiliza o reagente de biureto (sulfato de cobre em solução alcalina). As ligações peptídicas presentes nas proteínas reagem com os iões de cobre, formando um complexo de cor púrpura que é medido numa reacção de ponto final a 545nm.



A Eletroforese de Proteínas

plasmáticas permite a separação das globulinas da albumina e determina as proteínas séricas principais em padrões que podem ser altamente específicos para algumas doenças como mieloma, síndrome nefrótica ou cirrose. As proteínas são portadoras de carga eléctrica e

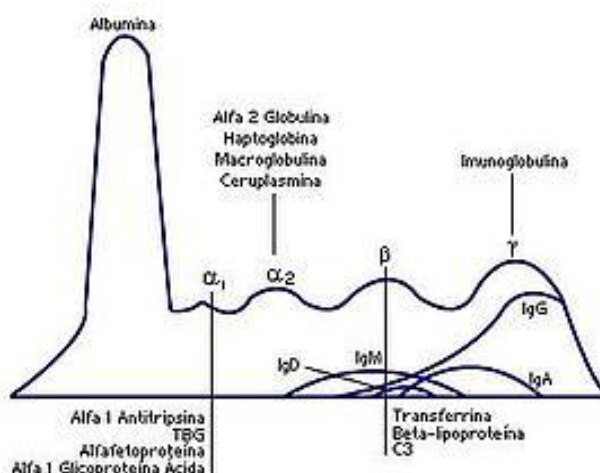


Figura 14: Gráfico de eletroforese de Proteínas

devido à sua composição, consoante o pH do tampão, podem adquirir carga positiva ou negativa. Numa solução alcalina (relativamente ao seu ponto isoeléctrico), a molécula proteica adquire carga negativa. A sua migração em direção ao eléctrodo de carga contrária constitui o princípio da electroforese, em que a migração depende da carga total e das dimensões das moléculas.

Numa electroforese convencional são detectadas 5 bandas principais, designadas de frações Albumina, Alfa 1, Alfa 2, Beta e Gama. As proteínas presentes em cada uma das frações são Albumina; α1-antitripsina, α1-glicoproteína ácida ou orosomucoide, α-Fetoproteína na fração Alfa 1; ceruloplasmina, α2-macroglobulina, haptoglobulina na fracção Alfa 2; transferrina, β2-microglobulina, β-lipoproteína e proteínas do complemento C3 e C4 na fração Beta; Imunoglobulinas A, E, M e G na fração Gama.

O soro a utilizar deve ser bem centrifugado, pois o fibrinogénio constitui um interferente que origina banda entre a fração Beta e Gama, quando presente.

Imunofixação: ensaio realizado para pesquisa de gamopatias no soro humano ou outros líquidos biológicos. Na primeira fase a amostra é separada por eletroforese, de seguida aplica-se um antisoro, que vai marcar as proteínas específicas.

A deteção de alterações na electroforese de proteínas é normalmente indicativa para o clínico solicitar análises mais específicas como a imunofixação. Quando se deteta uma gamapatia, procede-se a

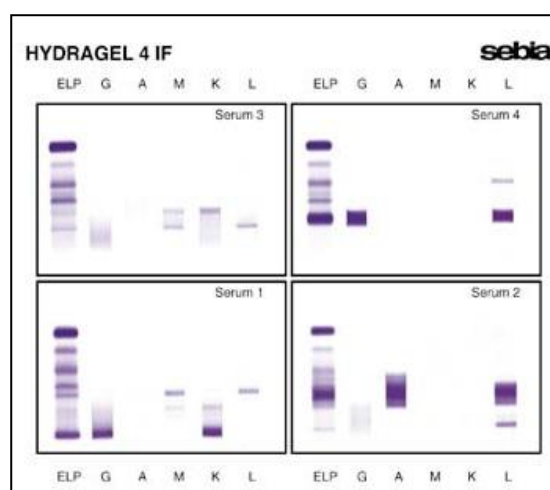


Figura 15: Imunofixação de imunoglobulinas

electroforese em gel de agarose com imunofixação de proteínas totais, imunoglobulinas G, A, M, Kappa e Lambda (PT/IgG/IgA/IgM/K/L).

Quadros clínicos de anemia, PCR aumentada, VS aumentada, Cálcio aumentado ou febre de origem desconhecida, podem originar suspeita de mielomas. Nestas situações existe interesse na realização de electroforese de proteínas e imunofixação.

Bence Jones: ensaio realizado para deteção e identificação de proteínas Bence Jones, cadeias leves livres de kappa e/ou lambda, na urina ou soro humanos, por imunofixação electroforética. A deteção de Bence Jones auxilia na identificação de gamopatias monoclonais, com separação das frações de IgG, A, M/K/L/Klivre/Llivre. Um resultado positivo para BJ implica a deteção de banda na pista do antisoro para K ou L, na pista de Klivre ou Llivre e sem banda na pista do antisoro trivalente para IgG,A,M.

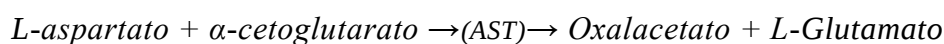
A pesquisa de Bence Jones constitui um método de monitorização de doentes com gamapatia diagnosticada, sendo um sinal de mau prognóstico.

Eletroforese de Proteínas no Liquor: faz-se a imunofixação de IgG a partir do liquor e em paralelo a partir do soro. Os resultados são apresentados com base na razão obtida entre $[IgG]_{soro}/[IgG]_{liquor}$ e ainda $[Alb]_{soro}/[Alb]_{liquor}$.

Função Hepática e Tracto Biliar

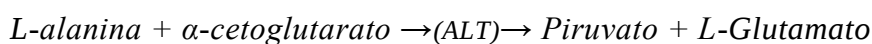
A Aspartato Aminotransferase (AST) é determinada para o diagnóstico ou acompanhamento do tratamento de doenças hepáticas e também como apoio no prognóstico de pacientes com enfarte do miocárdio. A enzima AST encontra-se amplamente distribuída nos tecidos orgânicos, principalmente nos tecidos hepático, cardíaco, muscular e renal. A reacção catalisada pela AST consiste na transferência reversível de um grupo amina do aspartato para o α -cetoglutarato, produzindo glutamato e oxaloacetato. A enzima necessita de fosfato de piridoxal como co-factor. A sua determinação tem importância na avaliação de diversas patologias, como a hepatite, alcoolismo e o enfarte do miocárdio.

O doseamento é feito utilizando o soro como amostra. A reacção é iniciada pela adição de α -cetoglutarato como segundo reagente. A concentração de NADH é medida pela Absorvância a 340/410nm e a taxa de Absorvância é proporcional à actividade da AST.



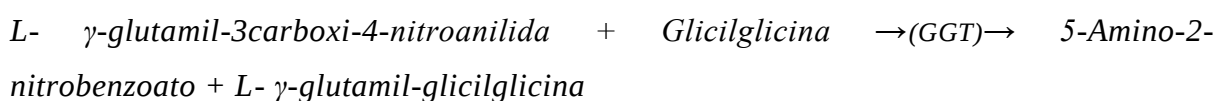
A **Alanina Aminotransferase** (ALT) é determinada para o diagnóstico ou acompanhamento do tratamento de doenças hepáticas. A ALT é encontrada maioritariamente no fígado, embora quantidades significativas possam também estar presentes nos rins. Observam-se níveis elevados de ALT na hepatite, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma hepático e alcoolismo. A ALT catalisa uma reação semelhante aquela que é catalizada pela AST, sendo que o aspartato é substituído pela alanina e o oxaloacetato pelo piruvato.

O doseamento é feito utilizando o soro como amostra. A reação é iniciada pela adição de α -cetoglutarato como segundo reagente. A concentração de NADH é medida pela Absorvância a 340/410nm e a taxa de Absorvância é proporcional à actividade da ALT.



A **Gama Glutamiltransferase** (GGT) é determinada para diagnóstico e no tratamento de doenças hepatobiliares e na avaliação de doentes com alcoolismo. A GGT predomina nos microsomas hepáticos e regula o transporte de aminoácidos através das membranas celulares. É uma das enzimas utilizadas na avaliação da função hepática, e a sua maior utilidade é na discriminação da origem da fosfatase alcalina elevada.

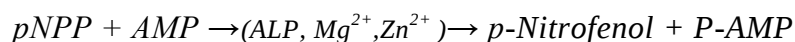
Na reacção com um substrato sintético a glicilglicina actua como receptor do resíduo γ -glutamil, sendo libertado 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB). O produto libertado tem Absorção máxima próximo dos 400nm. A taxa de formação é medida por fotometria a 410/478nm como reacção cinética de ordem 0.



A **Fosfatase alcalina** (FA) é determinada para o diagnóstico e tratamento de doenças hepatobiliares e ósseas. A fosfatase alcalina tem quatro isoenzimas: a de origem óssea, a hepática, a intestinal e a placentar. No fígado, a fosfatase alcalina é predominantemente encontrada no tracto biliar, constituindo por isso, um bom marcador para a disfunção biliar. É também muito útil no diagnóstico de patologias de origem óssea.

O princípio da reacção baseia-se no facto de a FA hidrolisar o substrato pNPP, formando proporcionalmente p-nitrofenol, detectado a 410/478nm. É utilizado um tampão de 2-Amino-2-metil-1propanol (AMP) para manter o pH 10,3-10,4, e é

necessário ainda adicionar iões Mg^{2+} e Zn^{2+} para activar e estabilizar a enzima. Soros hemolizados podem causar interferência significativa.



A Bilirrubina é o principal produto do metabolismo da hemoglobina que ocorre a nível do sistema reticuloendotelial do fígado. A bilirrubina sofre conjugação com o ácido glucorónico e, nesta forma conjugada (bilirrubina directa), pode ser excretada nos canalículos biliares. A sua determinação tem interesse no diagnóstico de hepatopatias, na detecção de anemias hemolíticas e na avaliação da gravidade da icterícia.

Bilirrubina Directa, a sua determinação é útil no rastreio de perturbações da função hepática ou diagnóstico de icterícia. É empregue o método de oxidação química que utiliza vanadato como agente oxidante. Na presença do detergente e do vanadato, a bilirrubina (directa) conjugada é oxidada, a pH 3 a biliverdina. Esta reacção provoca diminuição da densidade óptica da cor amarela, sendo a diminuição medida a 451/545nm e proporcional à concentração de bilirrubina directa presente na amostra.

Bilirrubina conjugada + $VO^{3-} \rightarrow$ Biliverdina (R1: Tampão pH 2,9 + detergente; R2: Metavanadato de Na + Tampão pH 7).

A bilirrubina é sensível à luz, sofrendo fotoxidação quando exposta, por este motivo as amostras devem ser mantidas em local escuro e fresco até serem processadas.

Bilirrubina total, a sua determinação é útil no diagnóstico e no acompanhamento de tratamento de desequilíbrios hemolíticos, biliares e hepáticos incluindo hepatite e cirrose. É empregue o método de oxidação química que utiliza vanadato, a pH 2,9 produzindo biliverdina. Na presença do detergente e do vanadato, tanto a bilirrubina conjugada como a não conjugada são oxidadas. A diminuição da densidade óptica a 451/545nm é proporcional à concentração de bilirrubina total.

Bilirrubina conjugada + Surfactante + $VO^{3-} \rightarrow$ Biliverdina (R1: Tampão pH 2,9 + detergente; R2: Metavanadato de Na + Tampão pH 7)

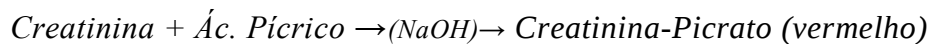
Função Renal

Os parâmetros bioquímicos a seguir descritos, avaliados na função renal, têm um grande valor no despiste de doenças renais.

A **Creatinina** é determinada para diagnóstico e acompanhamento do tratamento de doenças renais e na monitorização de diálises. A creatinina, forma cíclica da creatina e produto do metabolismo muscular (proteínas endógenas), é formada a uma taxa relativamente constante pelos músculos. A sua excreção, feita a nível renal,

essencialmente por filtração glomerular, não é afetada rotineiramente pela dieta. A sua determinação tem por objetivo o diagnóstico e a monitorização da insuficiência renal aguda e crónica e a monitorização da diálise renal.

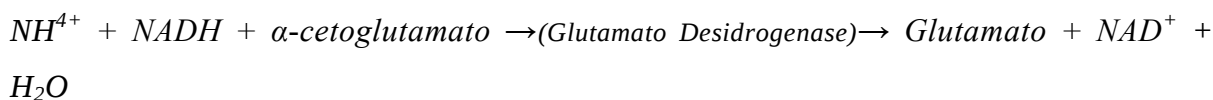
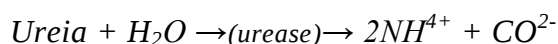
O princípio baseia-se numa modificação ao método de Jaffe que utiliza supressão da velocidade e correção da intercepção.



A supressão da velocidade é utilizada para minimizar a interferência da bilirrubina. Como se conclui que interações não específicas de proteínas do soro reagem com o reagente produzindo variação no resultado de $\pm 0,3\text{mg/dL}$, as medições são corrigidas automaticamente por subtração de $0,3\text{mg/dL}$ a cada resultado. A calibração desta técnica apresenta baixa estabilidade, sendo por isso efectuada com maior frequência.

A **Ureia** é determinada para diagnóstico ou acompanhamento do tratamento de doenças renais, obstruções do tracto urinário, Insuficiência Renal Aguda ou Crónica. É o produto final do catabolismo das proteínas exógenas e dos ácidos nucleicos, que ocorre no fígado. A produção de ureia e os seus níveis sanguíneos são afectados por diversos factores, como a dieta, necrose tecidular ou decréscimo de síntese proteica.

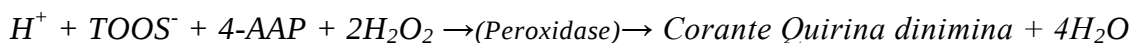
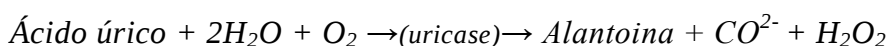
A determinação é feita segundo a reacção enzimática Roch-Ramel:



A oxidação do NADH em NAD^+ é medida como reacção de taxa inversa a 340/410nm.

O **Ácido úrico** é determinado para diagnóstico ou acompanhamento da insuficiência renal, gota e eclampsia. Deriva do catabolismo das bases púricas. Tal como a ureia e a creatinina, também pode ter alguma relevância no estudo da função renal.

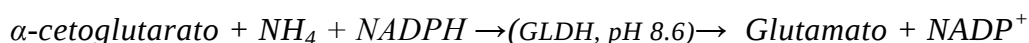
A determinação é feita segundo a reacção enzimática de Fossati, utilizando a uricase como ponto final.



O nível do complexo resultante é diretamente proporcional ao nível do ácido úrico, a absorvância é lida como ponto final a 545/694nm.

A **Amónia** é maioritariamente proveniente do tracto gastrointestinal, sendo metabolizada pelas enzimas hepáticas em ureia.

É empregue um método enzimático que utiliza glutamato desidrogenase e NADPH. A GLDH catalisa a conversão da amónia e do α -cetoglutarato em glutamato e H_2O juntamente com a conversão da NADPH em NADP. Com excesso de α -cetoglutarato e NADPH, a taxa de reacção com formação de NADP é proporcional à concentração de amónia presente na amostra. A leitura é feita a 340/694 nm.

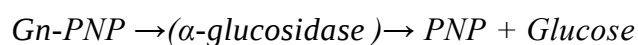


Função Pancreática

A função pancreática é avaliada pela determinação da enzima amilase, que é específica de órgão, por ser produzida apenas no pâncreas e saliva. O aumento abrupto dos níveis de amilase no plasma é indicador de pancreatite aguda. Para apoiar o diagnóstico é também avaliada a Lipase que é um marcador que permanece mais tempo em circulação, quando ocorrem episódios agudos.

A Amilase é determinada primariamente para diagnóstico e monitorização de pancreatite aguda. Catalisa a hidrólise de polímeros de hidratos de carbono como a amilopectina e o glicogénio, por clivagem de ligações 1,4- α -glicosídicas. Os seus níveis encontram-se elevados na pancreatite aguda, na parotidite e nas úlceras perfuradas (estômago, duodeno).

O método utiliza o p-nitrofenil-maltoheptósido bloqueado por etilideno como substrato. A enzima α -glucosidase é indicadora, utilizada para libertar o p-nitrofenol. A glucose terminal do substrato é quimicamente bloqueada, prevenindo a divisão pela enzima indicadora. O p-nitrofenol libertado é detectado a 410/694nm.



A Lipase é determinada para apoiar o diagnóstico e tratamento de doenças pancreáticas, tais como pancreatite aguda ou obstrução do ducto pancreático. O princípio do teste baseia-se numa reacção enzimática, em que o substrato produzido na reacção é proporcional á concentração de Lipase presente na amostra.

A reacção ocorre com o DGGMR (1,2-o-dilaúril-rac-glicero-3-ácido glutámico-(6`-metil-resorufina)-ester) que pela acção catalítica da Lipase vai originar um substrato medido por espectrofotometria.

$DGGMR \xrightarrow{(Lipase)} 1,2-o-dilauril-rac-glicerol + \acute{a}c. \text{ glutarico-(6`-metil-resorufina)-ester}$

$\acute{A}c. \text{ glutárico-(6`-metil-resorufina)-ester} \xrightarrow{(dec. espont\grave{a}nea)} Metilresorufina + \acute{a}c. \text{ glutárico}$

Equilíbrio Electrolítico e Ácido/Base

O equilíbrio electrolítico e ácido/base corresponde a um conjunto de mecanismos que são rapidamente mobilizados para manter a homeostasia fisiológica. São envolvidos neste processo diversas moléculas que contribuem para a normalidade da volémia, respiração, filtração glomerular e que interagem por mecanismos compensatórios.

Na determinação do Ionograma (Na, Cl e K), o Advia tem capacidade de fazer leituras com os três eléctrodos específicos de forma simultânea. O ionograma é determinado por potenciometria com eléctrodos seletivos para soro ou urina, com diluição automática da amostra 1:33 (22µL amostra + 700 µL de ISE Buffer). O equipamento mede a voltagem do tampão e a voltagem da amostra, a diferença entre as voltagens medidas e a temperatura dos líquidos permitem a determinação da concentração de Sódio, Potássio e Cloreto.

O Sódio é o principal catião do líquido extracelular e a principal partícula osmótica fora da célula. O sódio é filtrado livremente pelos glomérulos renais e é reabsorvido ao nível dos túbulos renais. A hiponatrémia, que é um dos distúrbios mais comumente encontrados na clínica, pode ser devida à perda excessiva de sódio ou à retenção de água (por diluição). As causas podem ser de origem renal (nefropatias depletoras de sódio, terapia com diuréticos, insuficiência adrenal) ou extra-renal (vómitos, diarreia, queimaduras). A hipernatrémia também pode ter causas renais, no caso da diabetes insipidus e da diurese osmótica. As causas extra-renais são a transpiração excessiva e a diarreia em crianças (sem reposição líquida adequada).

O Potássio é o principal catião intracelular. A sua concentração intracelular é mantida pela acção da bomba de sódio e potássio que é fundamental para a manutenção do potencial de membrana, controlo do volume celular e do transporte dos solutos. A hipocalémia pode ser devida a perdas líquidas intestinais causadas por vómitos e diarreia ou por perdas renais (terapia com diuréticos, acidose tubular renal e excesso de mineralocorticóides). A hipercalémia ocorre tipicamente na insuficiência renal aguda e crónica e na deficiência de mineralocorticóides (ex. doença de Addison).

O **Cloreto** é o principal anião extracelular. A diminuição dos seus níveis séricos está normalmente associada à hiponatremia e pode ocorrer devido a perdas gastrointestinais (HCl), excesso de mineralocorticóides e nefropatias depletoras de sal. A hipercloridemia por sua vez pode ocorrer devido a doenças como a acidose tubular renal e à deficiência de mineralocorticóides.

O **pH** do fluido extra celular determina alterações secundárias na concentração de alguns iões e depende directamente da concentração em hidrogénio (H^+). Em caso de acidose observa-se um aumento da concentração de H^+ em circulação. Em caso de alcalose observa-se uma diminuição da concentração de H^+ em circulação. Os mecanismos de compensação despoletados variam consoante a etiologia da situação clínica.

A determinação da **Gasimetria** consiste na análise dos gases, em sangue arterial, para determinar o nível de pH, do bicarbonato (HCO_3^-), pressão parcial de Oxigénio (pO_2), pressão parcial de Dióxido de Carbono (pCO_2) e a saturação de Oxigénio (sO_2).

A Gasimetria e o pH são determinados no Rapid Lab 860 da Simens, que por potenciometria avalia vários parâmetros no sangue arterial e venoso. O equipamento tem capacidade de determinar o pH, a pCO_2 , pO_2 , e ainda outros parâmetros.

O equilíbrio ácido /base é mantido tendo por base as seguintes reacções.



A manutenção do pH é garantida pela função respiratória, através da remoção de CO_2 que ocorre rapidamente (minutos), ou pela excreção renal através da eliminação de HCO_3^- que ocorre em horas ou dias.

Na tabela seguinte podemos observar de que forma se manifestam os indicadores na avaliação do equilíbrio ácido/base.

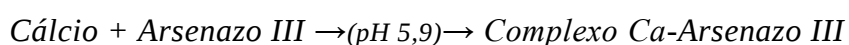
Parâmetro	Arterial	Venosa	Acidose Respiratória	Alcalose Respiratória	Acidose Metabólica	Alcalose Metabólica
pH	7,35-7,45	7,35 – 7,45	Diminui	Aumenta	Diminui	Aumenta
pO_2	80 - 100	40 – 60	Aumenta	Diminui	Normal	Normal
pCO_2	35 - 45	40 - 60	Aumenta	Diminui	N ou Diminui	N ou Aumenta
HCO_3^-	22 - 26	22 – 26	N ou Aumenta	N ou Diminui	Diminui	Aumenta
sO_2	95 - 100%	55 – 60%	N ou Alta	Diminui	Normal	Normal

Tabela 6: Variações nos indicadores do equilíbrio ácido/base

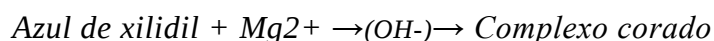
Metabolismo Fosfo/Cálcio

O Cálcio é determinado para apoio no diagnóstico e tratamento de doenças da paratiroide, várias doenças ósseas, doenças renais crónicas, entre outras. É o quinto elemento mineral mais abundante no corpo humano. O cálcio tem um papel importante na mineralização óssea, e é um elemento vital nalguns processos fisiológicos básicos como a coagulação, a contração do músculo cardíaco e esquelético e na condução neuromuscular. A maioria do cálcio está armazenada no esqueleto sob a forma de hidroxiapatite.

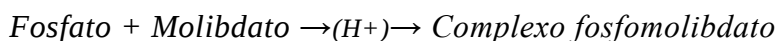
Na reacção, o Cálcio vai formar um complexo corado com o Arsenazo III, a baixo pH, permitindo o seu doseamento por leitua a 658/694nm. A concentração de Cálcio é directamente proporcional à intensidade do complexo formado.



O Magnésio (Mg^{2+}) é determinado para o diagnóstico e tratamento de hipermagnesémia e na monitorização de doentes a fazer terapêutica intravenosa sem Mg^{2+} . O princípio da técnica baseia-se na reacção dos iões Mg^{2+} com o azul xilidil em meio alcalino, para formar um complexo púrpura/vermelho solúvel em água. O aumento da Absorvância do azul de xilidil é proporcional à concentração de Mg^{2+} . O cálcio é excluído da reacção por complexação com o EDTA e a amostra é pré diluída.



O Fósforo inorgânico (H_2PO_4 , PO_4 , Fosfato inorgânico) é determinado para diagnóstico e tratamento de doenças renais, perturbações da glândula paratiroide e desequilíbrios da vitamina D. Existe combinado com o Cálcio no esqueleto, sendo os seus níveis regulados pela PTH, vitamina D e calcitonina. Os seus valores encontram-se fisiologicamente aumentados nas crianças, devido ao seu envolvimento no metabolismo da formação óssea. O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amónia na presença de ácido sulfúrico, para formar o complexo fosfomolibdato não reduzido, detectado segundo uma reacção de ponto final a 340/658nm.



A Hormona Paratiróide, PTH é produzida na glândula da paratiroide e actua na regulação dos níveis de cálcio extracelular. A hormona estimula a saída de cálcio do osso pela reabsorção óssea, a reabsorção do cálcio ao nível dos túbulos renais com aumento de produção de vitamina D. É de natureza peptídica, composta por 84 aminoácidos que sofrem modificações proteolíticas intra e extra-glandulares.

A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminescência da hormona paratiroide intacta.

Função Cardíaca

A cinética dos marcadores bioquímicos usados no diagnóstico laboratorial das lesões do miocárdio, é apresentada na tabela.

	CK total	CKMB	CKMB massa	Mioglobina	cTnI	cTnT
Especificidade			75-91%	60-92%	100%	100%
Cinética						
Início subida	3-8h	3-8h	3-12h	2-4h	4-8h	3-12h
Valor máximo	10-24h	12-24h	9-30h	9-12h	12-16h	12-48h
Normalização	2 a 4 dias	24-48h	2 a 3 dias	24-36h	5 a 9 dias	7 a 14 dias

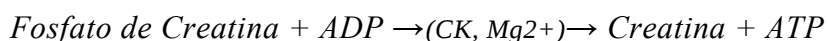
Tabela 7: Marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio

Conhecer os tempos de aparecimento, picos máximos e decaimento de cada marcador é determinante para a realização do diagnóstico diferencial da patologia cardíaca.

A **Creatina Quinase (CK)** é uma enzima dimérica composta por duas subunidades, que existe em quatro isoformas distintas encontradas no músculo esquelético, no músculo cardíaco e no cérebro. As isoenzimas apresentam o mesmo peso molecular e catalizam a mesma reacção, mas diferem na estrutura molecular e na origem. A isoforma CK-MM encontra-se maioritariamente no músculo esquelético, a CK-BB tem origem no cérebro e tracto intestinal, a forma híbrida CK-MB tem origem maioritariamente no miocárdio. A sua elevação indica lesão celular.

Os valores da CK encontram-se elevados em pacientes com infarte agudo do miocárdio, distrofia muscular progressiva, rabdomiólise e *delirium tremens*.

O princípio do teste baseia-se na reacção da CK com o fosfato de creatina e o ADP, formando ATP. Segue-se a reacção com a hexoquinase-G6PD gerando NADPH, cuja Absorvância é medida a 340/410nm.



A **CKMB** é a isoforma da creatina quinase produzida maioritariamente pelo músculo cardíaco. Os níveis de CKMB podem ser detectados num periodo de 3 a 8h após

o início dos sintomas de dor no peito. Quando as amostras são analisadas nos tempos correctos, o padrão de subida e descida, podem ser indicadores de infarto do miocárdio apoiando diagnósticos diferenciais. Por se apresentar na forma de macroenzima, quando o valor de CKMB é superior ao valor de CK total, é necessário pesquisar a presença de macrocomplexos interferentes.

A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção da actividade imunológica por quimioluminiscência directa. Mudando a técnica é possível determinar a **CKMB massa**, que apresenta maior especificidade.

A troponina constitui um complexo proteico que regula a contração do músculo estriado. É composta por três subunidades organizadas periodicamente ao longo do filamento das miofibrilas. A troponina C liga-se ao Cálcio, a troponina T liga-se à tropomiosina no filamento fino e a troponina I inibe a actomiosina ATPase.

Troponina T (TnT) é um marcador específico do músculo estriado cardíaco, com peso molecular de 39,7KD. Em situações de Enfarto Agudo do Miocárdio, observa-se um grande aumento da Troponina T, 3-4h após ocorrência dos sintomas cardíacos, mantendo-se aumentada até 14 dias seguintes.

A sua determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

A **Troponina I (TnI)** é uma proteína inibidora que existe em três isoformas distintas, a do músculo cardíaco, do músculo esquelético de contração lenta e do músculo esquelético de contração rápida. Cada isoforma apresenta uma sequência de aminoácidos específica, sendo a forma cardíaca (cTnI) a mais distinta, garantindo bons resultados enquanto marcador cardíaco para o diagnóstico do enfarto agudo do miocárdio. Pode ser detectada entre 4 a 8h após início dos sintomas, apresenta concentração máxima às 12-16h e mantém-se aumentada entre 5 a 9 dias.

A sua determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

A **Mioglobolína** é uma hemoproteína monomérica de ligação ao Oxigénio, encontrada principalmente no tecido muscular cardíaco. Em situações de lesão tecidular a mioglobina é rapidamente libertada, tornando-se um marcador de resposta rápida. Pode ser detectada 2 a 4h após ocorrência de lesão tecidular, apresenta valor máximo entre as 9 e 12h e volta ao normal entre as 24 e 36h.

A sua determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

Estudo dos Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas que podem estar no sangue ou outros fluidos biológicos e cujo aparecimento está relacionado com o aparecimento ou génese de células neoplásicas. Os marcadores tumorais são na sua maioria proteínas, pedaços de proteínas ou ainda antigénios de superfície celular, enzimas ou hormonas. O marcador ideal permite o diagnóstico precoce, é bom indicador de prognóstico e estadio da doença, permite monitorização da resposta á terapêutica e permite detecção precoce de recidiva, deve ser específico de órgão e com semivida curta, permitindo acompanhar o desenvolvimento do tumor. O marcador tumoral ideal não existe, no entanto entre os principais marcadores estão a Alfa Fetoproteína (AFP), PSA (Antigénio específico da próstata) CA 72.4, CA 125, CA 15.3, CA 19.9, CEA (Antigénio Carcinoembrionário).

Neoplasia da Mama:

O antigénio carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína oncofetal, com peso molecular de 180 kDa, sintetizada durante os primeiros seis meses de vida fetal no tracto gastro-intestinal e no pâncreas. Nos adultos, a síntese de CEA não está totalmente reduzida.

Embora o CEA seja considerado como o marcador tumoral de eleição na monitorização do cancro colo-rectal, outras doenças noutros órgãos podem provocar uma elevação dos níveis de CEA, como o ovário, mama, pulmão e estômago. Outras situações podem causar elevação dos níveis normais de CEA, como a inflamação do pulmão, fígado (cirrose) e tumores benignos. Os fumadores possuem um limite de referência superior aos não fumadores. O CEA não é um marcador de detecção nem de diagnóstico do cancro colo-rectal, mas deve ser utilizado para ajudar ao prognóstico da doença, monitorização das recidivas e avaliação da resposta terapêutica. Os níveis de CEA normalizam entre 1 a 4 meses após remoção cirúrgica do tecido neoplásico.

O método consiste num imunoensaio do tipo sandwich com detecção por quimioluminiscência directa.

O CA 15.3 é uma glicoproteína polimórfica, pertencente á família das mucinas, produto do gene MUC-1. A sua presença em circulação está associada ao cancro da mama metastásico. É utilizado como indicador de prognóstico na neoplasia da mama, para avaliação do estadio da doença, monitorizar a sua evolução e a resposta á terapêutica. Apresenta também bons resultados enquanto indicador precoce de recidivas.

O método consiste num imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

Ovário e Endométrio:

O CA 125 é uma glicoproteína semelhante á mucina de 200 a 1000kDa, antígeno de superfície associado ao cancro do ovário epitelial não mucinoso. A proteína é segregada pela superfície das células do cancro do ovário. É um marcador tumoral útil para avaliar a terapêutica e monitorizar o estadio da doença. Na fase pós-operatória os níveis de CA 125 correlacionam-se com o tamanho da neoplasia, sendo bom indicador de prognóstico, tendo também um papel importante na detecção precoce de recidivas.

O método consiste num imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por imunoquimiolescência directa.

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma enzima (protease) produzida quase exclusivamente pela glândula prostática. A sua função consiste em liquefazer o esperma após ejaculação, de modo a aumentar a mobilidade dos espermatozóides e facilitar a fecundação. O PSA está normalmente presente na corrente sanguínea em níveis muito baixos (até 4 ng/mL). A determinação do PSA não deve ser utilizada isoladamente como ferramenta diagnóstica do cancro da próstata, mas em combinação com o exame físico (toque rectal e/ou ultrasonografia). Na monitorização de pacientes pós-tratamento, uma única determinação do PSA é insuficiente para diagnosticar uma recorrência da doença, sendo necessário demonstrar um aumento da sua concentração. O mesmo sucede para doentes pós-prostatectomia, onde o aumento contínuo dos níveis de PSA indicam uma recorrência da doença.

A determinação do PSA total (PSA livre e PSA complexado) é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

As formas reactivas do PSA em circulação incluem o PSA livre e PSA complexado. Vários estudos indicam que a determinação do cPSA apresenta maior especificidade que a determinação do PSA livre. Níveis elevados de PSA estão associados quase exclusivamente a doença prostática, mas não são específicos para o cancro da próstata, podendo os valores de PSA estar também elevados na HBP (hipertrofia benigna da próstata) e/ou prostatite.

A determinação do **cPSA** é feita após tratamento da amostra com anticorpo monoclonal de rato específico de PSA livre, bloqueando-o e impedindo a interferência. O método utilizado é de imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

A determinação da fracção **PSA livre** surge na tentativa de aumentar a especificidade do PSA na detecção do cancro da próstata. A proporção de PSA livre no

soro é significativamente maior em doentes com hipertrofia benigna da próstata do que em homens com cancro da prostata. A determinação do PSA livre pode diminuir o número de biopsias desnecessárias em homens com valores de PSA entre 4 e 10 ng/mL. A percentagem de PSA livre pode ser particularmente útil na identificação de pacientes com cancro da próstata, mas com biopsia inicial negativa. Assim, a determinação do PSA livre é recomendada para a distinção entre a HBP e o cancro da próstata quando os níveis de PSA total se situam entre 4 e 10 ng/mL. A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

Colon e Recto:

O **CA 19-9** é um antígeno reactivo a um anticorpo produzido em resposta à imunização com uma linha de células de cancro do colon. Apesar do anticorpo ser derivado de uma linha celular do colon, estudos indicam que o valor de CA 19-9 se encontra elevado em neoplasias pancreáticas, demonstrando-se um marcador sensível e específico do cancro pancreático. Os níveis de CA 19-9 são bons indicadores de diferenciação entre doença benigna ou maligna, de prognóstico após cirurgia, de avaliação e monitorização da ocorrência de recidivas. A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

Pulmão:

A **Enolase Neuro Específica (NSE)**, é uma enzima glucolítica que ocorre em três subunidades imunologicamente distintas, sob a forma de isoformas diméricas. A forma α existe em vários tecidos, a β existe no coração e músculo estriado, a $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ constituem a forma neuro específica existente nos neurónios e células neuroendócrinas. É a primeira escolha como marcador na monitorização do carcinoma brônquico das células pequenas.

A **Homocisteína** apresenta interesse clínico para avaliar se existe risco de ataque cardíaco ou AVC (Acidente Vascular Cerebral), para detectar défices de folato ou vitamina B12, ou ainda para diagnosticar a doença hereditária homocisteinúria. A homocisteína é um aminoácido (aa) formado a partir da metionina, sendo o seu metabolismo regulado por três vias enzimáticas que a convertem em cisteína. A homocisteína existe livre sob a forma de dímeros de homocisteína e ligada a proteínas (> 80%). Alterações nas vias metabólicas ou deficiências enzimáticas levam ao seu aumento. É determinada por imunoensaio competitivo, após conversão das diferentes formas em homocisteína livre.

O **CA 72-4** é um marcador tumoral utilizado na monitorização terapêutica do carcinoma do estômago e ovários. Apresenta baixa especificidade, encontrando-se os

seus valores aumentados em muitas situações benignas. Técnica imunoenzimática por sandwich.

Doenças Infeciosas

Anticorpos anti-HVC (Hepatite C), Totais

O vírus da Hepatite C (HVC) pertence à família Flaviviridae e era responsável (antes de 1990) por 80 a 90% da hepatite pós-transfusional. O abuso de drogas continua a ser o factor de risco mais preponderante na infecção. A transmissão do HCV ocorre, por isso, predominantemente por via parenteral. A sua transmissão durante a gravidez e contacto sexual é menos eficiente. A infecção por HCV leva à hepatite fulminante aguda, com cerca de 50% dos casos tornados crónicos. Alguns casos desenvolvem cirrose e raramente carcinoma hepatocelular.

O método utilizado para a determinação dos Ac anti-HVC é o Imunoensaio com detecção por quimioluminiscência.

O Ac anti-HVC (total) surge entre 15 dias e 6 meses após a infecção. Quando é positivo, sugere uma infecção recente ou no passado. O Ac anti-HVC (total) persiste positivo “por tempo indeterminado” após um tratamento bem sucedido. Perante um teste positivo, deve fazer-se uma pesquisa do RNA viral.

HBV (Hepatite B)

A hepatite B é causada por um vírus da família Hepadnaviridae. O vírus da hepatite B (HBV) contém 3 antígenos proteicos virais detectados serologicamente: o antígeno de superfície (HBsAg), o antígeno do núcleo (HBcAg) e o antígeno e (HBeAg). A infecção por HBV é transmitida principalmente por contaminação sanguínea (transfusões, feridas abertas, uso de agulhas contaminadas) e também por via sexual e perinatal. O vírus é responsável por hepatites agudas e crónicas, que podem conduzir à cirrose ou hepatocarcinoma.

Os antígenos HBsAg e HBeAg e os anticorpos Anti-HBs, Anti-HBc (total), Anti-HBc IgM e Anti-HBe são determinados por imunoensaio quantitativo por electroquimioluminiscência, no ADVIA Centaur.

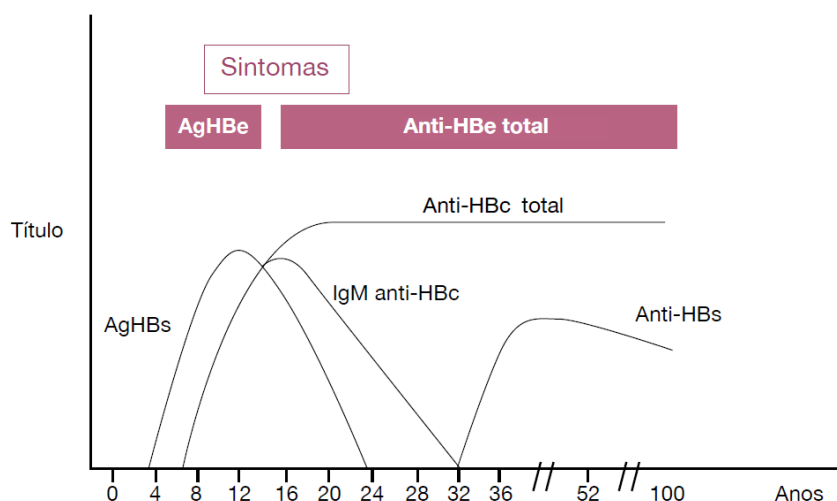


Figura 16: Gráfico da evolução dos marcadores do vírus da Hepatite B.

Para a interpretação dos resultados a figura resume a evolução da infecção por HBV. O período de incubação é de 4 a 15 semanas. O HBsAg aumenta no final do período de incubação e no início da fase aguda inicial. É nesta fase que aparece o HBeAg. Durante a fase aguda da doença o anti-HBc IgM aumenta e persiste durante cerca de 6 meses. Concomitantemente o anti-HBc IgG aumenta e persiste durante anos após a infecção. Após esse período de 6 meses, o anti-HBs aumenta, persistindo durante muitos anos. O paciente é considerado como potencialmente contagioso mesmo durante algum tempo decorrido após a elevação do anticorpo (IgG) anti-HBs.

Anticorpos Anti-HIV-1 e Anti-HIV-2

Apesar do rápido avanço no conhecimento da sua epidemiologia, do desenvolvimento de métodos de diagnóstico e da disponibilidade de terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia, a infecção HIV tem continuado a sua disseminação à escala mundial.

A determinação é feita por imunoensaio com detecção por quimioluminiscência no ADVIA Centaur, com determinação dos anticorpos HIV tipo 1, incluindo o subgrupo O, HIV tipo 2. As micropartículas são revestidas com antígenos recombinantes do envelope viral e proteínas do core. Os antígenos recombinantes incluem proteínas do envelope do HIV-1 (gp41/120), proteínas do core HIV-1 (p24), proteína do envelope HIV-2 (gp36), ainda é adicionado um peptído sintético para a detecção de anticorpos contra o subgrupo O, do HIV-1.

O diagnóstico de uma infecção por HIV-1 e HIV-2 baseia-se, na prática corrente, na detecção dos anticorpos séricos por EIA. A detecção combinada do antígeno p24 e

dos anticorpos do HIV-1 e do HIV-2 permite reduzir o período janela, compreendido entre a contaminação e o diagnóstico da infecção que só será finalizado após obtenção do resultado de técnicas de confirmação.

Rastreamento da Grávida

Toxoplasmose (IgG e IgM)

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário, parasita intracelular que infecta animais domésticos e selvagens (especialmente os carnívoros) e o Homem. O ser humano adquire a infecção através da ingestão de carne mal cozinhada, especialmente de carneiro e de porco, contendo quistos ou através da ingestão de oocistos presentes em material contaminado com fezes de gato. A infecção congénita ocorre quando a mãe desenvolve uma infecção aguda durante a gestação. A gravidade da infecção depende da data do aparecimento da infecção maternal, da virulência da estirpe e da qualidade da resposta imunológica da mãe.

O método utilizado para a determinação é o imunoensaio quantitativo com detecção por quimioluminiscência no ADVIA Centaur.

Os anticorpos aparecem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção, e os títulos atingem o máximo entre a 6^o e 8^a semanas. Um título de IgM positivo sugere a presença de infecção congénita aguda, no entanto, o conhecimento das limitações do teste, especialmente na ocorrência de reacções falso positivas aconselha a interpretação do resultado em conjunto com o título de anticorpos IgG. Existe ainda um método de ensaio imunoenzimático capaz de diferenciar infecção recente de infecção passada, com a presença de IgM residual, através da avaliação da capacidade de ligação dos anticorpos IgG. Tal capacidade de ligação, denominada avididade, é directamente proporcional ao tempo de infecção. Em quadros infecciosos com até três a quatro meses de evolução, a IgG apresenta uma baixa avididade, enquanto que, em infecções com mais de quatro meses de evolução, os anticorpos IgG apresentam alta avididade. Em algumas situações, os anticorpos IgG podem apresentar uma avididade intermediária, o que impossibilita a definição segura do tempo de infecção.

Rubéola (IgG e IgM)

A rubéola é uma doença geralmente benigna causada pelo vírus da rubéola, transmitido por via respiratória. Geralmente produz uma febre ligeira e uma erupção transitória em crianças e adultos. Quando contraída por uma mulher grávida, pode trazer

consequências graves para o feto (danos cerebrais e oculares graves, malformação cardíaca, etc.), especialmente se for contraída no 1º trimestre da gravidez.

A determinação é feita por imunoensaio com detecção por quimioluminiscência.

A detecção das IgG anti-rubéola é uma ajuda ao diagnóstico da infecção por vírus da rubéola e uma avaliação do estado imunitário dos pacientes relativamente ao vírus da rubéola. Para rastreio de infecção recente, determina-se o título de IgM.

Citomegalovírus (IgG e IgM)

O citomegalovírus (CMV) é um vírus da família dos Herpesvírus. A infecção pelo CMV ocorre, muitas vezes, pela via sexual. Nas pessoas sem transtornos imunitários, geralmente é assintomática, mas pode provocar aumento de volume do fígado e/ou do baço, erupções, irritação na garganta, dores e mal-estar generalizado de evolução autolimitada. Quando a infecção se dá ainda no útero materno, as consequências podem ser graves, podendo fazer com que o bebé apresente retardamento mental, cegueira, surdez ou paralisia cerebral. Nos indivíduos imunocomprometidos, pode provocar doença grave, o que, por sua vez, pode levar à cegueira e mesmo à morte.

A determinação é feita por imunoensaio com detecção por quimioluminiscência. A detecção dos anticorpos anti-CMV (IgG e IgM) é útil no diagnóstico das infecções primárias recentes, particularmente na mulher grávida.

Endocrinologia

Eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra Renais:

A ACTH é uma hormona sintetizada na pituitária que actua como estimulante para a produção de esteróides pelo córtex adrenal. A produção de ACTH é controlada pela CRH (Corticotrofina Releasing Hormone). A determinação desta hormona auxilia o diagnóstico diferencial da doença de Addison (hipoprodução de corticosteroides) e Síndrome de Cushing (Hiperprodução de cortisol). Os valores de ACTH apresentam variação circadiana, pelo que se torna essencial padronizar a hora da colheita. Os valores de referência encontram-se estabelecidos para colheitas às 9h. A ACTH apresenta interferência com o vidro, pelo que a colheita não deve ser feita para tubo de vidro. À temperatura ambiente a hormona vai ser inactivada pelas enzimas proteolíticas, motivo pelo qual a amostra de plasma em EDTA necessita de refrigeração antes da análise.

O **Cortisol** é uma hormona sintetizada e secretada no córtex adrenal, em resposta à ACTH. Actua na regulação do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lípidos,

tendo também um papel importante na inibição da resposta inflamatória. Os níveis hormonais de ACTH seguem um padrão circadiano e regulam as concentrações de cortisol por mecanismo de feedback negativo. Indivíduos saudáveis apresentam o pico de níveis de cortisol mais alto pela manhã e o mais baixo à noite. Distúrbios no eixo CRH-ACTH-Cortisol anulam o padrão circadiano.

Doença de Addison	Insuficiência adrenal primária, níveis de Cortisol diminuídos.
Insuficiência adrenal secundária	Destruição ou insuficiência da pituitária, níveis de ACTH e Cortisol diminuídos.
Síndrome de Cushing	Hiperfunção adrenal primária ou secundária.

Tabela 8: Patologias do eixo Hipotálamo-hipófise- supra renais

A avaliação da função hormonal do doente é feita pela determinação dos níveis de cortisol em combinação com outros testes que permitam determinar a etiologia das alterações observadas. Os testes de função dinâmica são um exemplo, sendo o teste de estímulo do ACTH utilizado para avaliar a doença de Addison ou o teste de supressão com dexametasona utilizado para diagnosticar Síndrome de Cushing. Devido ao padrão circadiano dos níveis de cortisol plasmático, a sua determinação é habitualmente feita na urina de 24h.

Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas:

Os valores de Hormona Folículo-Estimulante (FSH) circulante são controlados por mecanismos de feed-back negativo a nível do hipotálamo, através de hormonas esteróides. Na mulher fértil, a FSH promove o desenvolvimento do folículo no ovário. Durante a ovulação, o folículo sofre uma ruptura, passando a chamar-se corpo lúteo, e segrega estradiol e progesterona que vão controlar os níveis de FSH por acção no hipotálamo. No homem adulto, a FSH está associada à estimulação e manutenção da espermatogénese. A FSH é segregada pela pituitária anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) segregada pelo hipotálamo.

A sua determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por electroquimioluminiscência directa. A FSH é uma glicoproteína constituída por duas subunidades, a alfa que é semelhante à da LH, da hCG e da TSH, e a beta que é diferente e confere a especificidade bioquímica à reacção.

Os níveis de FSH encontram-se aumentados na Menopausa, em situações de hipofunção primária dos ovários nas mulheres e no hipogonadismo primário no homem. Encontram-se diminuídos quando ocorre hiperfunção primária dos ovários na mulher ou

hipergonadismo primário no homem, também podem estar diminuídos na doença poliquística dos ovários.

A **Hormona Luteinizante (LH)** é controlada pelos níveis da hormona hipotalâmica libertadora de gonadotrofina (GRH), tal como a FSH, e é produzida pelo lóbulo anterior da hipófise. Na mulher, a LH actua nos ovários, estimulando a ovulação e a formação do corpo lúteo. No homem estimula a secreção de testosterona pelas células intersticiais do testículo. A sua produção é regulada por um mecanismo de feed-back negativo através das quantidades de estradiol e de progesterona na mulher e de estradiol e testosterona no homem. Enquanto que no homem adulto, a secreção da LH é episódica, na mulher, todos os ciclos menstruais ovulatórios apresentam um padrão nos níveis de secreção de LH, com um pico de concentração que antecede a ovulação.

A sua determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por electroquimioluminiscência directa. A LH, tal como a FSH, é uma glicoproteína constituída por duas subunidades, a alfa que é semelhante à da FSH, da hCG e da TSH, e a beta que é diferente e confere a especificidade bioquímica á reacção.

Os níveis séricos da LH após a menopausa são normalmente similares ou discretamente superiores aos verificados durante o ciclo menstrual. A determinação da LH é, também útil na identificação de distúrbios do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e nomeadamente no diagnóstico e tratamento da infertilidade na mulher.

O **Estradiol** é uma hormona esteróide segregada na sua quase totalidade pelo ovário e no homem é produzido em pequenas quantidades pelos testículos. Outros estrogénios estão identificados, sendo que, na prática, apenas se utiliza a determinação do estradiol, da estrona e do estriol, sendo este último um metabolito do estradiol. A principal função do estradiol consiste em estimular o desenvolvimento dos órgãos sexuais femininos e das características sexuais secundárias.

As hormonas esteróides são segregadas em níveis variáveis durante o ciclo menstrual. As gonadotrofinas da hipófise anterior regulam a secreção das hormonas ovarianas: estradiol e progesterona. Os níveis de estradiol e progesterona por sua vez regulam o centro hipotalâmico responsável pelo controlo das gonadotrofinas hipofisárias. Este complexo sistema de feed-back resulta no fenómeno cíclico da ovulação e menstruação. Durante a gravidez, a placenta é a principal fonte de estrogénios. Na menopausa a secreção decresce, tal como no hipogonadismo feminino. Os valores estão aumentados devido a tumores secretores de estradiol (ovarianos, testiculares, adrenais) e

na puberdade precoce feminina. A determinação é feita por imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminiscência direta.

A **Progesterona** é uma hormona esteróide, produzida maioritariamente nos ovários pelo corpo lúteo e na placenta (uma pequena quantidade é produzida no córtex adrenal, quer no homem, quer na mulher). A principal função da Progesterona consiste na regulação, em conjunto com os estrogénios, do ciclo menstrual. A progesterona é essencial na preparação do endométrio para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. Na mulher, os níveis de progesterona circulante, que são normalmente baixos na fase folicular, aumentam de maneira significativa durante a fase luteínica do ciclo menstrual. Se não ocorrer a fecundação, ocorre um decréscimo dos níveis para os valores iniciais do ciclo menstrual. Este padrão constitui a explicação lógica para o uso da determinação da progesterona para a detecção da ovulação. A determinação é feita por imunoensaio competitivo, com detecção por quimioluminiscência directa.

A **gonadotrofina coriónica humana** (hCG) é uma glicoproteína constituída por duas subunidades, a subunidade α (polipeptídeo de 92 aminoácidos) e a subunidade β (polipeptídeo de 145 aminoácidos). As subunidades separadas não têm actividade biológica. Os seus níveis plasmáticos e urinários aumentam rapidamente no início da gravidez. É secretada pelo tecido placentário e tem como função apoiar manutenção da produção de progesterona pelo corpo lúteo. A hCG alcança, um mês após a concepção, níveis sanguíneos de aproximadamente 2000 mU/mL. Os valores máximos são atingidos por volta do terceiro mês, após o qual se verifica um declínio gradual. Os casos de gravidez ectópica e de aborto, tendem a possuir níveis de hCG inferiores ao normal. A β -hCG é utilizada como marcador tumoral na avaliação, diagnóstico e monitorização de pacientes com tumores de células germinativas, ovarianos e testiculares e no despiste de Síndrome de Down em conjunto com outros marcadores como estriol livre e alfa-Fetoproteína.

Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tiróide:

O estudo da Tiróide engloba a avaliação de diversas hormonas associadas à glândula. A sua função consiste na síntese, armazenamento e secreção das hormonas tiróideas (T3 e T4). A TSH exerce a sua função nas células tiróideas, desencadeando a libertação das hormonas armazenadas no colóide e promovendo a sua biossíntese. A TSH é produzida e secretada pela hipófise anterior e a sua secreção é regulada pela TRH

(hormona libertadora de tireotrofina) produzida no hipotálamo, e pelo feedback negativo das hormonas da tiróide. O hipertireoidismo é definido por uma hiperprodução de hormonas tiroideias pela tiróide. As patologias associadas à hiperfunção tiroideia incluem: doença De Graves (doença auto-imune), bócio multinodular tóxico, adenoma tóxico e tumor trofoblástico. O hipotireoidismo é um estado de hipofunção tiroideia e classifica-se em: hipotireoidismo primário, secundário e terciário. As causas mais frequentes de hipotireoidismo incluem: tiroidite crónica autoimune de Hashimoto, hipotireoidismo iatrogénico (pós-tiroidectomia), hipotireoidismo iodo-induzido, defeitos hereditários na síntese de hormonas tiroideias.

A determinação da TSH tem sido utilizada como marcador analítico individual e primário da disfunção tiroideia. Com a função hipotálamo-hipofisária normal, níveis de TSH diminuídos indicam hipertireoidismo; níveis de TSH aumentados indicam hipotireoidismo. A TSH é uma glicoproteína composta por duas subunidades, uma alfa semelhante à das hormonas FSH, LH e hCG e uma beta que confere as propriedades bioquímicas e imunológicas específicas. A determinação é feita por imunoensaio do tipo sandwich, com detecção por quimioluminiscência directa.

A Triiodotironina ou T3 é sintetizada na glândula tiróide. Para a sua síntese é necessária a captação de iodo circulante pelas células da tiróide. Os resíduos de tirosina são iodetados na tiroglobulina a mono-iodotirosina (MIT) e di-iodotirosina (DIT) e, do acoplamento entre um resíduo de MIT com um de DIT, resulta a triiodotironina (T3). Finalmente a T3 é clivada da tiroglobulina e secretada pela glândula tiróide. No entanto, a maioria da T3 encontrada no plasma resulta da conversão extratiroidal da T4. A T3 encontra-se maioritariamente ligada a proteínas como a globulina transportadora de tiroxina (TBG).

A principal aplicação desta determinação é no diagnóstico da tirotoxicose causada por concentrações de T3 anormalmente elevadas (com valores de T4 normais), responsável por cerca de 5% dos casos de hipertireoidismo. O doseamento da T3 é também uma ferramenta importante na monitorização de doentes com hipotireoidismo sob tratamento. A determinação é feita por imunoensaio competitivo, com detecção por quimioluminiscência directa.

A T3 livre constitui apenas cerca de 0,3% da T3 circulante total e corresponde à fração activa da hormona circulante. Sendo a T3 livre largamente insensível à variação da concentração das proteínas transportadoras decorrentes de situações como a gravidez, o uso de contraceptivos orais ou a terapia com estrogénios, as suas utilizações na prática

clínica no despiste da doença tiroideia assume um papel importante. A determinação é feita por imunoensaio competitivo, com detecção por quimioluminiscência directa.

A Tiroxina ou T4 é sintetizada, tal como a T3 na glândula tiróide, a partir da união de dois resíduos de DIT. Uma vez produzida, a T4 é armazenada na substância colóide ligada à tiroglobulina, sendo libertada para a corrente sanguínea conforme as necessidades do organismo. Cerca de 70% da T4 circula ligada de forma não covalente à TBG, 20% ligada à pré-albumina e 10% à albumina. Apenas uma pequena percentagem, cerca de 0,03% circula na forma livre.

Valores de T4 elevados estão presentes no hipertiroidismo e valores baixos no hipotiroidismo. No entanto outros factores podem afectar os níveis séricos da T4, relacionados com alterações séricas das proteínas de ligação à T4. Por exemplo, a porfíria aguda intermitente, os contraceptivos orais, a gravidez e alguma predisposição genética podem aumentar a capacidade de ligação das proteínas de ligação à T4 e outras causas como a síndrome nefrótica, doença hepática e salicilatos podem diminuir a capacidade de ligação das proteínas. A determinação é feita por imunoensaio competitivo, com detecção por quimioluminiscência directa.

A fracção livre da T4 constitui apenas cerca de 0,03% da T4 total. Do mesmo modo que a T3 livre, a determinação da T4 livre permite eliminar determinadas interferências no resultado da T4 total, causadas pela alteração da concentração das proteínas plasmáticas. A determinação é feita por imunoensaio competitivo, com detecção por quimioluminiscência directa.

A tiroglobulina é a proteína mais abundante da glândula tiróide. Está envolvida na síntese e armazenamento das hormonas da tiróide. O tecido da tiróide parece ser a única fonte da hormona circulante. A tiroglobulina é utilizada como marcador tumoral no carcinoma diferenciado da tiróide, é importante para o diagnóstico da tirotoxicose factícia (caracterizada por níveis de tiroglobulina quase indetectáveis), para investigar a etiologia do hipotiroidismo congénito e monitorizar a tiroidite inflamatória.

Urianálise

Os nove parâmetros avaliados na urianálise são o pH, a densidade, as proteínas, a glucose, os corpos cetónicos, os pigmentos biliares, a hemoglobina, o urobilinogénio, os nitritos e a esterase leucocitária.

Numa urina normal menos de 150mg de proteínas são excretadas por dia, ao passo que a proteinúria é caracterizada por valores superiores a 500mg por dia, o que

corresponde a um valor na tira $\geq 30\text{mg/dL}$. Os resultados positivos podem indicar proteinúria de Bence Jones, proteinúria tubular na ausência de alterações glomerulares ou proteinúria associada a infecções. O teste é mais sensível à Alb, podendo ocorrer falsos positivos em urinas alcalinas.

Os eritrócitos normalmente não são detectados na urina ($<0,01\text{mg/dL}$ ou $100\mu\text{g/l}$; $3\text{ GV}/\mu\text{L}$), no entanto podem aparecer em casos de distúrbios urológicos, nefrológico ou hemorrágico.

Um aumento dos leucócitos na urina indica piúria e observa-se em quase todas as doenças do rim e tracto urinário. A esterase leucocitária é um indicador fiável da presença de leucócitos. Elevados níveis de glucose podem diminuir o número de leucócitos tal como a toma de alguns medicamentos.

Os nitritos normalmente não são detectados, mas concentrações de bacilos gram negativos superiores a $10^5/\text{mL}$ são associados a resultados positivos. Pequenas quantidades de glucose são excretadas pelos rins, menos de 30mg/dL . Quando se ultrapassa o limiar de filtração glomerular ocorre glicosúria.

As cetonas normalmente não são detectadas (até 2mg/dL de ácido acetoacético). Na cetoacidose, inanição, distúrbios dos hidratos de carbono ou lípidos, as cetonas podem ocorrer na urina em concentração $\geq 10\text{mg/dL}$. A urina fortemente pigmentada com metabolitos de levodopa, compostos sulfidrido ou com captopril podem originar falsos positivos.

O pH pode variar entre 4,6 a 8,0 podendo estas variações auxiliar no tratamento de cálculos. O pH aumentado está associado a proliferação bacteriana.

A urina de adulto contém quantidades aproximadas de $0,02\text{mg/dL}$ de bilirrubina, o que não é detectável pelos equipamentos. Quando aumentada pode estar associada a hemólise aumentada.

O Urobilinogénio está presente em concentrações até $1,0\text{mg/dL}$ ou $16\mu\text{mol/L}$. Um resultado superior a 2mg/dL indica anomalia. Algumas substâncias interferem com o reagente de Ehalich, ex: ac. P-aminosalicilico, sulfonamidas.

Sempre que as tiras reactivas determinam a existência de parâmetros alterados, a amostra é direccionada para o citómetro de fluxo.

Citómetro de Fluxo

O citómetro de fluxo vai analisar todos os elementos celulares presentes na amostra, dando quantificação dos mesmos.

Quando os resultados do citómetro indicam a presença de alterações celulares ou elementos estranhos, o especialista não valida o resultado e procede-se à observação do sedimento urinário.

A observação do sedimento urinário é feita no microscópio óptico com objectiva de 40×, condensador em baixo e luz regulável, não muito intensa.

Os parâmetros avaliados no exame do sedimento urinário são as células epiteliais pavimentosas ou do epitélio tubular, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais, granulações, leveduras ou bactérias. São utilizadas placas padronizadas, preenchidas com volume específico de urina. Nestas placas são contabilizados o número de elementos figurados por campo em cada quadrícula, faz-se a média desse valor e multiplica-se por um factor de conversão que permite apresentar o resultado em elementos/ μ L. Algumas das alterações que podem ser observadas são:

Os Cristais são formações observadas na urina, de etiologias distintas. Os cristais de ácido úrico que surgem a pH <5,4 a 5,8, apresentam forma variável de cor âmbar e dissolvem quando aquecidos. Estão associados a um quadro clínico de hiperuricémia. Os uratos amorfos originam sedimento rosa/avermelhado que mascara os outros elementos. Surgem com urina ácida por precipitação associada a diminuição da temperatura. Deve-se aquecer a amostra e observar o sedimento sem os cristais precipitados. Os cristais de oxalato de cálcio surgem com pH <5,4 a 6,7, ou associados à ingestão de chocolate, espinafres, vitamina C, etc. Os cristais de fosfato de cálcio na urina alcalina, não apresentam significado clínico e têm o aspecto de agulhas em estrela. Os fosfatos amorfos são semelhantes aos uratos amorfos, mas estes precipitam em urina alcalina originando precipitado branco. Os cristais de triplo fosfato contêm magnésio, amónia e fosfato. São típicos de urina alcalina, têm aspecto em “forma de caixão” e estão associados a infecção bacteriana. Os cristais de cistina, apresentam forma hexagonal, sem cor, estriados até ao centro. São típicos de doentes com cisteinúria e para serem observados o pH tem de ser <4,0 e tem de se refrigerar a urina a 4°C durante a noite. Os cristais de leucina são esféricos com estrias concêntricas, típicos de doentes com falência hepática. Os cristais de tirosina com aspecto de agulhas finas, muitas vezes agregadas em rosetas, são típicos em doente com falência hepática.

As células epiteliais pavimentosas são grandes, quadrangulares a poligonais, com núcleo pequeno e central. Quando há infecção é típico encontrar bactérias ou candidas associadas à membrana destas células.

As células do epitélio tubular são redondas a ovais ou rectangulares com citoplasma denso e granuloso, núcleo bem visível com um ou dois nucléolos. Para as diferenciar é importante conhecer o contexto do sedimento. Aparecem associados a elementos indicativos de doença do parênquima renal, como filamentos, eritrócitos ou lípidos.

As células do uroepitélio na camada profunda são pequenas e ovais, nas camadas superficiais são grandes, redondas ou ovais.

Os filamentos podem ser hialinos, constituídos por proteínas de Tamm-Horfall ou complexos se contêm grânulos, células ou outras partículas. Podem ser observados na maioria das doenças renais e surgem normalmente associados a proteinúria.

A pesquisa de eosinófilos na urina apresenta interesse clínico em suspeitas de nefrite tubulo intestinal aguda causada por reacção alérgica a penicilinas, AINES, diuréticos, aminoglicosídeos ou Anfotericina B.

A pesquisa de parasitas na urina, apresenta interesse clínico na suspeita de infecção por *Schistossoma haematobium*. Este parasita surge associado a hematúria. Para a detecção do agente, o paciente deve fazer algum exercício antes da colheita para que o parasita se solte das paredes do sistema renal. Deve ser recolhida a urina de 24h que depois de concentrada é observada ao microscópio.

Imunologia

O sector é constituído pela Bioquímica Manual, Citometria de Fluxo, Espermograma, Nefelometria, Técnicas de Aglutinação, Serologia por EIA (Enzyme Immuno Assay), Serologia Infecciosa e Autoimunidade.

A diversidade de parâmetros analíticos determinados na Imunologia é muito elevada, verificando-se que a frequência de solicitações dos mesmos pode variar bastante. Os parâmetros menos frequentes não são processados diariamente, sendo feita uma gestão das amostras por forma a realizar os ensaios quando se reunir um número mínimo a processar.

Para determinar a frequência com que se realiza o controlo de determinado parâmetro, são tidas em conta as características dos sistemas analíticos, a Imprecisão (Ip) e Incerteza (Ie), recomendações de consensos, critérios clínicos, resultados de programas de AEQ e o estado da arte. A aceitação dos resultados do CQI é feita com base nos limites de aceitação definidos no plano de CQI. Os resultados são registados em cartas de registo e são acumulados em quadros mensais para tratamento estatístico, para verificar o desempenho mensal. São calculados os seguintes parâmetros: Média, Desvio padrão (SD), Coeficiente de variação (CV), BIAS, Erro total (ET), ID (inexactidão), ICV (imprecisão).

Algumas das técnicas utilizadas no sector da imunologia não possuem controlos padronizados comerciais. Nestas situações recorre-se à utilização de MRAI, controlos produzidos internamente através de amostras positivas de concentração conhecida ou através da diluição de soluções padronizadas para calibração. Este método de obtenção de controlos é utilizado como alternativa, quando não existem controlos comerciais.

Algumas determinações bioquímicas, por serem solicitadas em quantidade muito baixa ou por apresentarem outro tipo de condicionantes, não se encontram automatizadas. Nestas situações mantém-se os **métodos manuais**, que recorrem a reacções químicas e subsequente leitura por Espectrofotometria a comprimento de onda adequado.

Na espectrofotometria de UV/Visível, para as diversas técnicas deve-se seguir sempre a bula do Kit de reagentes a usar. O ensaio é feito em paralelo entre amostra, padrão e branco, e pela aplicação de uma equação apropriada obtém-se o valor do resultado. O comprimento de onda a utilizar tem de ser selecionado em função do analito. O espectrofotómetro pode ser de duplo feixe, para leitura no visível e no UV. A

primeira leitura a efectuar é do branco para acertar o zero, depois realizam-se as leituras das amostras com lavagem do acessório de aspiração entre cada uma. As lâmpadas diferem no tipo de radiação que emitem, logo variam também no comprimento de onda que abrangem. O fotómetro vai medir a absorção da luz, sendo a absorvância directamente proporcional à concentração dos analitos.

Técnicas manuais

Apresento de seguida alguns exemplos de parâmetros determinados por métodos manuais:

O **Cobre** apresenta interesse clínico na doença de Wilson e encontra-se fisiologicamente aumentado na gravidez e nas crianças. A doença de Wilson caracteriza-se por um aumento e acumulação de cobre no fígado e cérebro, com diminuição no sangue. A ceruloplasmina é a proteína responsável pelo transporte do cobre. O cobre é um componente de muitas metaloenzimas e importante para a síntese de melanina e colagénio.

Para a sua determinação realiza-se uma reacção de ponto final, com leitura do Branco de reagente, Padrão, Controlo e Amostras. A pH 4.7 o cobre ligado à ceruloplasmina é libertado por um agente redutor. Reage com anilina que é um reagente corado, para formar um quelato estável. A intensidade da coloração a 580nm, é directamente proporcional à quantidade de cobre na amostra.

A **Frutose** é determinada por reacção cinética com resposta para D-Glucose e D-Frutose. O protocolo das reacções é o seguinte: adiciona-se 1mL de Reagente 1 em cada tubo reaccional, com 100µL de água, controlo e amostras respectivamente; agita-se e incuba 3minutos à temperatura ambiente; adiciona-se o reagente 2 (Hexocinase com G6P Desidrogenase) e água; incubar mais 10 minutos à temperatura ambiente; ler as Absorvâncias; adiciona-se o reagente 3 (PGI); incubar 10 minutos à temperatura ambiente e fazer novas leituras. As reacções químicas associadas são as seguintes:

- 1) $\text{D-Gluc} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P} + \text{ADP};$
- 2) $\text{D-Frut} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{F-6-P} + \text{ADP};$
- 3) $\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{D-Gluconato-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \text{ (1ª Leitura)}$
- 4) $\text{F-6-P} \xrightleftharpoons{\text{PGI}} \text{G-6-P} \text{ (2ª Leitura).}$

O resultado é obtido pela diferença entre 1ª leitura – Branco = X; X – 2ª leitura = [Frutose].

A pesquisa de **Substâncias Redutoras de Fezes** é feita por método montado no Laboratório. O reagente de Benedict é preparado com 173g de Citrato de Sódio, 90g

Carbonato de Sódio e 600mL de água quente, prepara-se uma solução de Sulfato de Cobre a 17,3% em 100mL, mistura-se as duas preparações em balão de 1000mL e perfaz-se o volume com água. O controlo também é preparado no Laboratório e é constituído por uma solução de glucose de concentração conhecida para controlo positivo e apenas água para controlo negativo. A amostra de fezes é recolhida com zaragatoa a partir do boião contentor, retira-se 1g que é diluída em tubo com 10mL de água. Centrifuga-se 5min/3000rpm, e do sobrenadante retiram-se 500µL que são adicionados a 1000µL de reagente de Benedict. A mistura vai ao banho maria 5min/100°C. A formação de um precipitado com cor de tijolo indica resultado positivo. Nestas situações deverão ser ainda realizados testes que permitam identificar qual a substância redutora presente.

Para a pesquisa de **Zinco** a colheita é feita em tubo lavado com ácido nítrico, uma vez que o zinco interfere muito com a borracha. Apresenta interesse clínico na avaliação de anemias. É determinado por reacção de ponto final, por colorimetria. O branco é preparado com os reagentes e água, depois de adicionados os reagentes aos tubos de amostras, procede-se à leitura da absorvância a 560nm.

O ácido cítrico é um inibidor da cristalização de sais de cálcio, a pesquisa de **Citratos** na urina apresenta interesse clínico na avaliação do risco potencial para letíase renal. A amostra utilizada é a urina de 24h, a pH neutro. O ácido cítrico é transformado em oxaloacetato e acetato pela citrato liase. Esta reacção é auxiliada por uma segunda reacção, que transforma o oxaloacetato e o seu produto descarboxilado (piruvato), na presença de LDH (lactato desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), e NADH. A intensidade da coloração UV a 340nm é proporcional à concentração de ácido cítrico na amostra.

O Espectrofluorímetro é utilizado para medições de fluorescência, emitida por amostras que ao serem excitadas por radiação com comprimento de onda apropriado, emitem fluorescência. Utiliza lâmpada de Xénon, em ensaios quantitativos. É necessário estabelecer o comprimento de onda de excitação e o de emissão, fazer o auto zero com a leitura do branco e depois as amostras.

Citometria de Fluxo

A **Citometria de Fluxo** constitui um método para identificação e quantificação de populações celulares. O citómetro apresenta três componentes base, 1) fluidos, para obtenção de uma suspensão de partículas em fluxo laminar; 2) óptica, é composta pela fonte de iluminação, a captação da dispersão da luz e da fluorescência, a filtração; 3)

electrónica, para conversão do sinal em valor analógico/digital, aquisição, processamento, análise e armazenamento dos resultados. O gráfico primário dá informação acerca da complexidade (Side Scatter, SSC) através do sensor lateral que analisa a estrutura intracelular, e do tamanho (Forward Scatter, FSC) através do sensor frontal. Os fluorocromos utilizados são FITC (Fluoresceína Isothiocyanato) de cor verde com emissão a 520nm, PE (Phycoerythrin) de cor amarela com emissão a 578nm, ECD (Energy Coupled Dye) de cor laranja com emissão a 615nm, PI (Propidium Iodide) cor laranja com emissão a 620nm, PC5 (Phycoerythrin Cyanin 5) de cor vermelha com emissão a 665nm. A intensidade da fluorescência obtida é proporcional ao número de locais de ligação estabelecidos. O processo de compensação define o intervalo de comprimento de onda em que obtemos cada fluorocromo.

As principais aplicações da citometria são a monitorização de HIV, avaliação da capacidade fagocítica dos leucócitos e estudos da capacidade oxidativa dos neutrófilos, imunofenotipagem do sangue periférico para oncologia.

Existem protocolos definidos para determinadas pesquisas, mais frequentes na rotina. Quando o clínico solicita Populações Linfocitárias procede-se á pesquisa de Linf T, com os marcadores CD3/CD4/CD8, para Subpopulações Linfocitárias procede-se à pesquisa de Linf T/B/NK com painéis de marcadores CD3/CD4/CD8, CD19 e CD56/CD16. Para avaliação de linhagens B utilizam-se os marcadores CD45/CD5/CD19/K/L, de linhagem T os marcadores CD45/CD3/CD4/CD8, para linhagem Mieloide CD45/CD14/CD16/CD11b e CD15.

Na avaliação dos resultados obtidos no citómetro, deve-se confirmar se os totais das percentagens dão 100% ou próximo, verificar as contagens absolutas, confirmar que as diferenças são semelhantes, não devendo ser observada uma variação >10%. Se forem utilizados mais que um painel de marcadores, deve-se confirmar que os resultados de ambos estão em conformidade, confirmando ainda os valores com as contagens do hemograma.

Nefelometria

O equipamento BN ProSpec utiliza a metodologia de Nefelometria, que se baseia na medição da intensidade da luz dispersa a ângulo fixo de 13 a 24°.

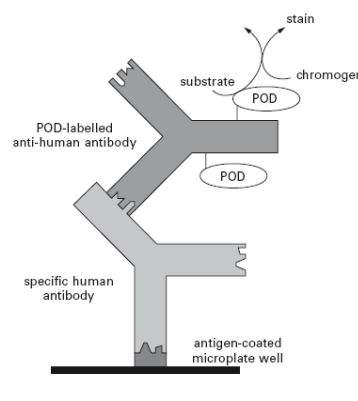
Alguns dos parâmetros determinados por nefelometria são a quantificação de cadeias leves K e L, Macroglobulina α_2 , α_1 glicoproteínas ácida, Haptoglobulina, Ceruloplasmina, Pre-Albumina, proteínas do Complemento, Imunoglobulinas G, A, M e ainda as fracções da IgG, nomeadamente G1, G2, G3 e G4. Na rotina laboratorial sempre

que se utiliza o equipamento é necessário verificar líquidos externos, substituir cuvetes reacionais, fazer os controlos das técnicas e verificar se estão dentro dos limites ou se é necessário realizar alguma calibração. O equipamento encontra-se ligado de forma bidireccional.

ELISA

Figura 17: Esquema da ligação Ag-Ac por ELISA

Técnica de ELISA: método manual para detecção e quantificação de Ac específicos. Consiste na utilização de uma fase sólida, em microplacas com strips, revestidas com Ag purificados. Quando a amostra é positiva, os Ac diluídos no soro ligam-se ao Ag fixo na placa. Adiciona-se Ac anti Ac humano marcado com peroxidase, que será no final revelado pela adição de um substrato cromogénico, que promove uma reacção com desenvolvimento de cor. A intensidade da cor obtida é proporcional à concentração do Ac presente na amostra.



Para cada série de amostras analisadas, tem de ser construída uma curva de calibração, ser feito um branco e controlos.

O procedimento geral consiste em: 1) pipetar cada um dos calibradores, controlo, amostras, para o respectivo poço; 2) incubar 30min (na serologia infecciosa a incubação é normalmente a 37°C); 3) fazer 3 lavagens sucessivas; 4) adicionar o Anti soro marcado; 5) incubar 30min; 6) fazer 3 lavagens sucessivas; 7) adicionar o substrato cromogénico; 8) incubar 15min; 9) adicionar solução Stop; 10) realizar a leitura dos poços por fotometria a comprimento de onda adequado.

Um dos parâmetros determinados por ELISA é a **Proteína S livre**. Esta é uma proteína plasmática, vitamina K dependente, que actua como cofactor da proteína C, amplificando a sua acção anticoagulante. A fracção livre corresponde a 40% da total com função de cofactor da proteína C activada. Para a determinação a proteína S livre actua como o Ag que se vai ligar ao Ac monoclonal anti S livre fixo na microplaca.

O vírus **Epteins Barr** encontra-se latente em células da garganta (doença do beijo) e no sangue. A infecção pelo vírus encontra-se associada ao aparecimento de Linfoma de Burkitt's e ao carcinoma da nasofaringe. O diagnóstico da infecção implica várias etapas, desde a presença de alterações típicas no hemograma, até ao perfil de anticorpos presentes. Nas pesquisas de anticorpos incluem-se os anticorpos heterófilos,

anticorpos anti-VCA, anti-EA e anti-EBNA, sendo ainda possível fazer a distinção entre anticorpos IgG ou IgM.

A pesquisa de Ac EBNA – IgG ou IgM também pode ser efectuada por ELISA. Neste caso os poços encontram-se revestidos com antígeno EBNA. Para a pesquisa de IgM a amostra é sujeita a um pré-tratamento, com uma solução absorvente, que remove a IgG e FR presentes.

Para a **pesquisa de HIV**, existem vários ensaios que serão realizados segundo protocolo interno e mediante os pedidos do médico na requisição. Inicia-se a pesquisa com um teste de 4ª Geração, que tem a capacidade de detectar precocemente a presença do vírus através da pesquisa de Ac Anti HIV1, incluindo o subtipo O, Ac Anti HIV2 e simultaneamente o Ag p24 do HIV1. A pesquisa combinada de Ac diversos e Ag, faz aumentar a sensibilidade do teste e possibilita a detecção precoce, diminuindo as ocorrências de falsos negativos associados ao período janela. Quando este teste tem resultado positivo, realiza-se a pesquisa de HIV com o equipamento automático VIDAS, que executa técnicas imunoenzimáticas recorrendo à metodologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Quando este ensaio dá um resultado positivo, sem que haja historial clínico do utente, é solicitada nova colheita. Sendo este resultado também positivo, na segunda colheita é realizada a técnica de confirmação por Imuno Blot. Quando o resultado de um Blot I é positivo e Blot II indefenido, ou vice-versa, faz-se o teste PeptiLav devido a existirem possíveis reações cruzadas. Este teste constitui uma técnica complementar de diferenciação dos Ac Anti HIV1 e Anti HIV2 por reacção imunoenzimática em tira, utilizando dois péptidos sintéticos que permitem detecção com monoepitopo. Quando o teste confirmatório apresenta também resultado positivo, o resultado é então apresentado como positivo ao médico que solicitou a análise.

Imunoblot

O **ImunoBlot** consiste numa técnica de confirmação. É necessário separar as proteínas constituintes da mistura antigénica a detectar, de acordo com o seu tamanho, por electroforese em gel de poliacrilamida. Depois de separadas, as proteínas são transferidas para a membrana de nitrocelulose, onde ficam inertes,

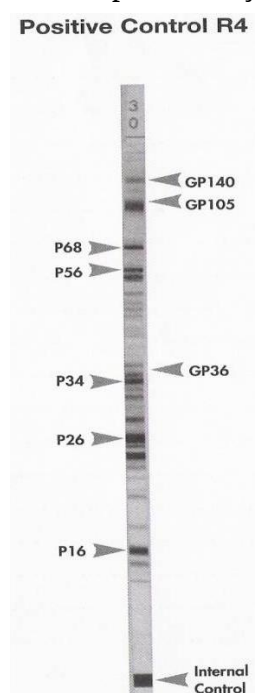


Figura 18: Imunoblot

sendo posteriormente utilizadas como suporte para a detecção da reacção Ag-Ac. Existem perfis predefinidos (membranas de nitrocelulose com perfis antigénicos conhecidos) para proteínas associadas a algumas patologias, como exemplo Scleoris Systemic profile, confirmação de infecção por HCV, confirmação de infecção por HIV 1 ou 2, entre outras.

O procedimento para a realização do IB é o seguinte: pré diluir as amostras de soro, colocar tiras num canal disponível, pipetar 1,5mL de amostra para a tira e incubar 30 minutos no agitador, lavar a tira. Pipetar 1,5mL de conjugado enzimático, incubar 30 minutos no agitador, lavar novamente. Pipetar 1,5mL de solução substrato, incubar 10 minutos no agitador. Parar a reacção, aspirar o líquido presente no canal e lavar com água. O controlo positivo do IB está incluído na tira. Na imagem encontra-se representado o controlo positivo do dispositivo de confirmação para detecção de Ac anti HIV2 no soro. Cada tira positiva confirma a presença de determinada proteína. Considerando o exemplo apresentado, as tiras GP 140, 105 e 36 caracterizam proteínas ENV (glicoproteínas de revestimento e transmembranar do vírus), as P68 e P34 caracterizam proteínas POL (Transcriptase inversa e endonuclease), as P56, 26 e 16 caracterizam proteínas GAG (proteínas internas e seu precursor). Na interpretação do resultado, um positivo segundo o critério da OMS ocorre quando se observa a presença de duas tiras de ENV, POL e GAG, um resultado negativo ocorre quando não aparece nenhuma tira e outros resultados são indeterminados.

Técnicas de Aglutinação

As **Técnicas de Aglutinação** constituem métodos rápidos de detecção serológica.

O RPR (Rapid Plasma Reagin) é um teste rápido de aglutinação para o serodiagnóstico da Sífilis. Constitui um método não treponémico. Apresenta-se como uma forma modificada do VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) clássico, que contém partículas de carvão, evitando assim a necessidade de utilização do microscópio. Quando ocorre ligação entre colesterol/ cardiolipina/ lecitina no reagente e os Ac estão presentes na amostra, o resultado positivo observa-se sob a forma de manchas pretas. É um método semiquantitativo, recorrendo-se a diluições sucessivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) das amostras positivas para se determinar o título, através da última diluição a apresentar positividade. Tem como limitação a ocorrência de falsos positivos, quando as amostras são de indivíduos portadores de outras infecções diferentes de Sífilis. O resultado positivo deve ser confirmado por teste específico, como o TPHA (*Treponema pallidum* haemagglutination).

O teste Paul e Bunnell é um teste rápido para pesquisa de Ac IgM heterófilos da Mononucleose Infecciosa (MI). Durante a fase aguda da doença, os Ac IgM heterófilos da MI aparecem em 80-90% dos casos. Tornam-se evidentes 1 a 12 semanas após o início da doença e persistem até um ano. Paul e Bunnell demonstraram que os Ac da MI aglutinavam os eritrócitos de ovelha e cavalo. No imunoensaio estes Ac são detectados por aglutinação com eritrócitos de bovinos.

Os testes de Aglutinação servem para detecção de Ac produzidos quando há infecção por diversos agentes patogénicos, por aglutinação em lâmina ou em tubo. Os reagentes são colóides e contém suspensões bacterianas inactivadas e padronizadas.

Os resultados positivos em testes de aglutinação são um apoio ao diagnóstico de algumas doenças febris. No entanto, não devem ser considerados prova de infecção por um microrganismo particular, uma vez que alguns dos testes apresentam Ag comuns. Os resultados positivos devem ser semiquantificados pelo método de diluições sucessivas. Segundo os critérios de interpretação estabelecidos, títulos superiores a 1:80 para a Salmonella e Brucella são indicativos de infecção recente, para Proteus títulos inferiores a 1:160 não devem ser considerados positivos.

Imuno Difusão Radial

A **Imuno Difusão Radial (IDR)** é uma técnica utilizada para medir a concentração de Ag solúveis (normalmente proteínas). O método envolve a difusão radial de um Ag a partir de um poço, através de um gel de agarose que contem Ac monoespecífico apropriado. Os complexos Ag-Ac formados vão originar um anel de precipitação, cujo quadrado do diâmetro médio no equilíbrio, tem relação linear com a concentração de Ag presente na amostra. É construída uma curva de calibração e com base numa tabela de referência, os valores de diâmetros obtidos são convertidos em concentrações. As amostras com baixas concentrações de Ag devem ser concentradas ou deve-se pipetar o dobro do volume para efectuar a imunodifusão. A incubação é feita em placa fechada à temperatura ambiente, durante alguns dias. Alguns dos parâmetros doseados são as Ig A secretória (amostra de saliva), Ig D, Crioglobulina, caracterização das Ig G, IgM e IgA. As amostras são aplicadas na placa após diluição do precipitado, obtido por refrigeração do soro durante 7 dias. Deve ser feito o doseamento do factor reumatóide, uma vez que este pode actuar como interferente.

Algumas das proteínas do complemento também são determinadas por imunodifusão.

A proteína do complemento C1q, é o primeiro componente envolvido na via clássica de activação do complemento e leva ao aumento da fagocitose por macrófagos e monócitos. Níveis aumentados de C1q estão relacionados com a presença de imunocomplexos, SLE (Síndrome Lupus Eritematoso) e meningites.

Concentrações reduzidas de C2 no soro resultam da activação da via clássica do complemento. A deficiência em C2 é a mais comum das deficiências hereditárias do complemento e está associada a LES, glomerulonefrites e vasculites.

A proteína C5, constitui um componente da via clássica. A deficiência em C5 está associada a maior predisposição para infecções recorrentes por *Neisseria*.

A Lisozima (muramidase) é uma enzima presente nos fluidos biológicos como a saliva, lágrimas, leite, sêmen, soro e faz parte das defesas do portador contra microrganismos diversos.

O procedimento da IDR é semelhante para qualquer dos parâmetros analisados, variando o volume de amostra aplicada e o tempo de incubação, para que ocorra a imunodifusão.

Espermograma

A avaliação do **Espermograma** é realizada segundo as indicações da WHO (World Health Organization), descritas no “Manual for the examination of Human semen and sperm-cervical mucus interaction”.

A colheita de espermatozoides deve ser realizada após 3 a 5 dias de abstinência sexual. A amostra é colocada na estufa a 37°C, é homogeneizada após liquefação e coloca-se uma gota ($\pm 50\mu\text{L}$) na câmara de contagem. Coloca-se a câmara de Makler no microscópio e observa-se na objectiva de 20 $\times$. Deve ser seleccionado um campo representativo e clica-se no “Begin” e “Start” para fazer o processamento da imagem, deve repetir-se o processo duas vezes para cada amostra. Para validar a imagem confirma-se que todos os espermatozoides estão marcados pelo pontuado colorido que indica que foi analisado.

O exame Macroscópico avalia a liquefacção da amostra, que deve surgir após 30 minutos à temperatura ambiente; o aspecto, deve ser homogéneo cor cinza-opaco; o volume deve ser $>2.0\text{mL}$; a viscosidade, deve formar uma gota de comprimento $<2\text{cm}$ com uma pipeta de 5mL; o pH, que deve encontrar-se entre 7,2 – 8,0.

O exame Microscópico é realizado com HTMC (Autoanalisador de Esperma), que consiste num microscópio específico associado a um computador com software e monitor, com capacidade de avaliar a velocidade e o movimento da amostra. Permite avaliar os espermatozoides segundo a concentração, contagem total, motilidade (motilidade progressiva rápida, motilidade progressiva lenta, motilidade não progressiva, imóveis), vitalidade e morfologia. Devem ser observados no mínimo 10 campos alternados.

A contagem total considerada deve ser a do observador, uma vez que o equipamento pode contar interferentes.

Relativamente à morfologia, esta deve apresentar uma Cabeça oval com 4–5 μ m no eixo maior, 2,5–3,5 μ m no eixo menor, a razão deve ser de 1,50 a 1,75, o acrossoma deve corresponder a 40-70% da cabeça. A Peça intermédia deve apresentar uma largura de 1 μ m, o comprimento deve ser 1,5x o da cabeça. A Cauda deve ser direita, uniforme, desenrolada com um comprimento de 45 μ m. As alterações de morfologia habitualmente observadas são descritas na tabela apresentada.

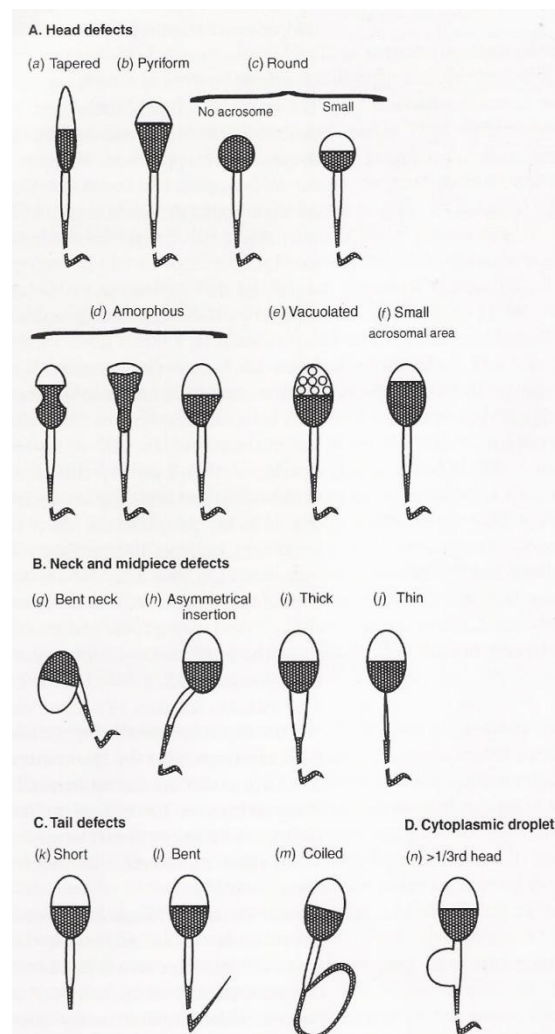


Figura 19: Esquema das alterações morfológicas dos espermatozoides

O espermograma apresenta interesse clínico como teste de rastreio para avaliação da fertilidade masculina, para avaliar a eficácia de uma vasectomia, em casos de homens jovens submetidos a terapêuticas intensas e agressivas, como quimioterapias.

Na apresentação de resultados deve ter-se em atenção que um resultado de Azoospermia não deve ser dado, sem confirmação do mesmo.

O **teste do Suor** é realizado para diagnóstico e avaliação da fibrose cística. A fibrose cística é uma doença genética autossómica recessiva, que causa um distúrbio na secreção de algumas glândulas, nomeadamente as produtoras de muco, sendo englobada nas DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica). A alteração genética afecta a produção da proteína que regula a passagem de cloro e sódio pelas membranas celulares,

levando assim a uma alteração na produção de suor, utilizada para avaliar indirectamente a doença.

Existe um suporte próprio para efectuar a recolha de suor. A recolha é feita durante 30 minutos, após estimulação das glândulas sebáceas da pele. O suor sobe por capilaridade para a pulseira colectora, que contém um corante no interior. Utilizando um aparelho apropriado, vai-se medir a condutividade e assim determinar a quantidade de NaCl presente na amostra de suor recolhida.

Serologia Infecciosa

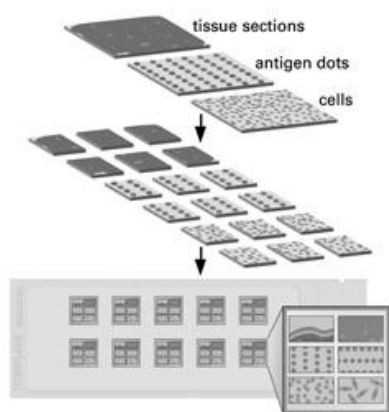


Figura 20: Placa de Imunofluorescência

A **Serologia Infecciosa** compreende métodos de detecção de Ac específicos contra diversos agentes infecciosos, empregando habitualmente técnicas de imunofluorescência indirecta. Para a determinação de Ac contra agentes infecciosos, utilizam-se células, secções de tecidos ou substâncias purificadas que actuam como substrato antigénico. Se as amostras forem positivas, os Ac específicos presentes no soro ligam-se ao Ag fixo

Ac Anti Ac humano marcado com uma substância fluorescente. A técnica apresenta elevada especificidade e permite a detecção simultânea de diferentes Ac pela utilização de placas com múltiplos substratos.

O procedimento implica diferentes passos, nomeadamente:

- Preparar o material, deixando as lâminas atingir a temperatura ambiente e marcar cada lâmina com caneta impermeável.
- Diluir o soro da amostra.
- Pipetar as amostras diluídas para campos de reacção numa lâmina vazia.
- Incubar 30 minutos à temperatura ambiente, por colocação da lâmina com substrato sobre a lâmina com amostras.
- Lavar a lâmina com substrato, por imersão

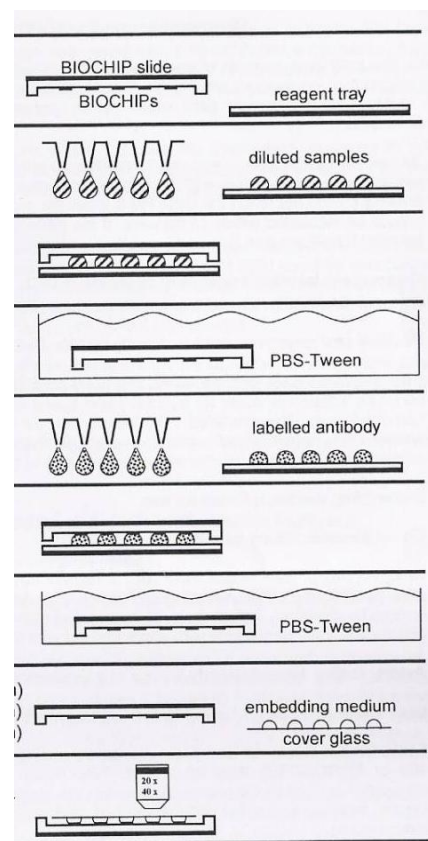


Figura 21: Técnica de IFI

em solução de PBS-Tween.

- f. Aplicar o Ac anti Ac humano marcado com fluoresceína (conjugado) em cada campo de reacção e incubar novamente.
- g. Lavar a lâmina com substrato, por imersão em solução de PBS-Tween.
- h. Secar os bordos da lâmina, colocar umas gotas de glicerol sobre a lâmina preparada e cobrir a mesma com lamela. Proteger da luz.
- i. A lâmina está pronta a ser visualizada no microscópio de fluorescência.

Na serologia infecciosa pode-se pesquisar diversos tipos de Ac, nomeadamente IgA, IgG, IgM ou até pesquisas combinadas de Ig A/G/M. Entre os diversos protocolos variam as diluições do soro a utilizar. Normalmente a pesquisa de IgM apresenta tempos de incubação mais longos e o soro deve ser pré tratado por imunoadsorção, para remover a IgG existente na amostra, que pode actuar como interferente da pesquisa.

Alguns dos microrganismos observados em lâminas de IFI foram: *Rickettsia conorii*, EBV- CA/EA (Eptsein Barr Virus), *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*.

As *Chlamydia psittaci* são bactérias gram negativas intracelulares que se alojam no cérvix do útero. Estão associadas a doenças sexualmente transmissíveis, que podem causar infertilidade.

Com o CMV (Citomegalovirus) a infecção no adulto é subclínica ou assintomática, mas na grávida pode originar infecções congénitas danificando fígado, baço e SNC do recém nascido, este vírus também pertence à família Herpesvirus.

A *Bartonella henselae* é um bacilo gram negativo aeróbio, intracelular facultativo, com duas variantes, a I e a II que provocam a “Cat Scratch Disease”. *Bartonella quintana* é da mesma família que a anterior, associada a más condições de higiene, transmitida por “*Pediculus humanus corporis*” causando a febre dos 5 dias ou “Urban Trench Fever”.

A *Bordetella parapertussis/ pertussis* é um cocobacilo transmitido por aerossóis altamente contagiosos. É o agente causal da tosse e apresenta um tempo de incubação de 7 a 14 dias, iniciando-se depois a tosse com expectoração que dura 1 a 2 semanas.

A *Borrelia burgdorferi* pertence à família das espiroquetas, é o agente da doença de Lyme, transmitida por pequenas mordeduras de carraça. A expressão clínica da doença caracteriza-se por três fases distintas, nomeadamente a fase I do eritema, a fase II que dura semanas ou meses com sintomatologia variada e a fase III onde se observa grande aumento da Ig G.

O vírus Coxsackie tem vários serotipos, nomeadamente A7/B2/B3/A9/B1/B4/A16/A24/B5, causa gastroenterites, síndrome gripal ou outras sintomatologias, mais frequentes no Verão e em crianças com menos de 10 anos. A transmissão ocorre pela comida, água e aerossóis.

Existem lâminas montadas que permitem pesquisas simultâneas, como exemplo disso temos a pesquisa de doenças transmitidas por vectores, com pesquisa de vários Arbovirus, WEE (Western Equine Encefalite - Alphavirus), CE (La Crosse Encefalite – Bunyavirus), SLE (St. Louis Encefalite – Flavivirus) e EEE (Eastern Equine Encefalite – Alphavirus).

A imunofluorescência indirecta aplicada à serologia infecciosa exige ao observador experiência, para reconhecimento de padrões específicos de fluorescência e quantificação dos mesmos.

Autoimunidade

A **Autoimunidade** surge quando o organismo reage de forma estranha, por produção de anticorpos contra células ou órgãos do próprio, ou por perda de tolerância face a antigénios do próprio. Na autoimunidade podem ser avaliadas doenças específicas de órgão, ex: Ac anti ilhéus de Langerhans, ou doenças não específicas de órgão onde se verifica que os Ac produzidos actuam contra elementos celulares, ex: LES (Lupus Eritematoso Sistémico), normalmente enquadram-se nas doenças reumáticas sistémicas. São empregues técnicas de Imunofluorescência indirecta, ELISA e ImunoBlot. A pesquisa de autoanticorpos por IFI emprega lâminas fixadas com secções de tecidos, para doenças específicas de órgão ou lâminas com Células Hep2, que permitem estabelecer padrões de fluorescência associados a determinadas doenças.

A pesquisa de ANA (Anti-Nuclear Ac) é muito frequente para iniciar a pesquisa de doenças autoimunes, constitui um parâmetro pouco específico, mas que dá orientação pelos padrões observados, para testes confirmatórios mais específicos.

A pesquisa de ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Ac) está associada a diversas doenças sistémicas. O substrato fixo na lâmina é constituído por Neutrófilos, fixados em etanol e em formol, existe ainda um campo com células Hep2 que permite excluir positivities devidas a ANA. A detecção de ANCA exige ainda uma sub classificação em cANCA (citoplasmático) e pANCA (periférico). A sua diferenciação é obtida pelo padrão de fluorescência observado com os neutrófilos fixados em etanol ou formol, nomeadamente:

- MPO^+ = p-ANCA positivo em etanol + c-ANCA positivo em formol.

- PR_3^+ = c-ANCA positivo em etanol e em formol.

As células HEP2 são células epiteliais humanas que expressam a maioria dos antígenos de importância clínica, contra os componentes celulares. Nestas células é possível visualizar diferentes padrões de imunofluorescência, que variam em função do componente celular contra o qual estão a ser produzidos autoanticorpos. Os padrões observados não são na sua maioria, específicos de doença, no entanto podem ser associados a determinadas patologias auxiliando no seu diagnóstico.

Os padrões observáveis com as Células Hep2 são:

1) Padrões Nucleares:

- Homogéneo, sugere confirmação de dsDNA por IFI com *Crithidia luciliae* e EIA ou de Histonas/Nucleossoma por IB (ANA profile 3);
- Finamente Granular, sugere confirmação de SSA/SSB por FEIA ou IB (ANA profile 3), ou de K μ por IB (Myosite Profile 3), ou de Mi-2 por IB (Myosite Profile 3);
- Mosqueado, sugere confirmação de RNP por FEIA ou IB (ANA profile 3);
- Membrana Nuclear, não tem confirmação associada;
- Complexo Poro nuclear, sugere confirmação de Gp-120 por IB (Liver Disease Profile);
- Múltiplos Pontos Nucleares, sugere confirmação de Sp 100 por IB (Liver Disease Profile);

2) Padrões Nucleolares:

- Scl70 (DNA topoisomerase I, localizada no nucleoplasma e nucléolo) sugere confirmação por FEIA ou IB (ANA profile 3 ou Systemic Sclerosis profile);
- PM-Scl100/75, sugere confirmação por IB (ANA profile 3);
- Fibrilharina (nucléolos em malha, mitose positiva), sugere confirmação por IB (Systemic Sclerosis profile);
- NOR (Nucleolar Organising Regions), sugere confirmação por IB (Systemic Sclerosis profile);

3) Padrões Mitóticos:

- Centrómero, sugere confirmação por FEIA ou IB (Systemic Sclerosis profile);
- Centríolo, apresenta 2 pontos frente a frente nas células em Metafase, sem confirmação;
- Fuso Mitótico, sem confirmação;
- Midbody, sem confirmação;

4) Padrões Citoplasmáticos:

- a) Mitocôndria, sugere confirmação por IFI (CT3, lâminas de 3 tecidos como 1ª linha) ou EIA (M2) associada a Cirrose Biliar Primária;
- b) Actina, sugere confirmação por IFI (CT3, lâminas de 3 tecidos como 1ª linha) e EIA (Actina), associada à Hepatite autoimune tipo I;
- c) Jo1, sugere confirmação por FEIA e IB (ANA profile e Myosite profile)
- d) Ribossoma, sugere confirmação por IFI (CT3, lâminas de 3 tecidos como 1ª linha) ou IB (ANA profile 3 ou DOT citoplasmático).

Considerando algumas das patologias Autoimunes e quais os padrões de imunofluorescência que lhes são associados, posso referir como exemplo:

- Cirrose Biliar Primária: AMA (Anti-Mitochondrial antibody)
- Hepatite Autoimune: ASMA (Antibody Against Smooth Muscle)
- Diabetes Mellitus: ICA (Islet Cell Antibody) e GAD2 (Glutamic Acid Decarboxylase)

Nas doenças não específicas de órgãos, alguns dos padrões associados são:

- LES: dsDNA, Sm, Histonas, nucleossomas
- Artrite Reumatóide: CCP (Péptido Cíclico Citrulado)
- Esclerose Sistémica: Scl70, centrómero
- Síndrome Sjogren: SSA (Ro), SSB (La)

RIA (Rádio Imuno Ensaio)

O sector da RIA, engloba todas as técnicas que utilizem radioactividade e técnicas de alergologia com determinação de IgE total e específica, RAST (radioallergosorbent test).

Tal como na Imunologia, os parâmetros menos frequentes para determinar por RIA não são processados diariamente, sendo feita uma gestão das amostras por forma a realizar os ensaios quando se reunir um número mínimo a processar. O **controlo interno** é realizado por cada conjunto de amostras processadas, segundo os critérios estabelecidos no plano de CQI.

A aceitação dos resultados do CQI é feita com base nos limites de aceitação definidos. Os resultados são registados em cartas de registo e são acumulados em quadros mensais para tratamento estatístico, para verificar o desempenho mensal. São calculados os seguintes parâmetros: Média, Desvio padrão (SD), Coeficiente de variação (CV), BIAS, Erro total (ET), ID (inexactidão), ICV (imprecisão).

Relativamente à utilização de substâncias radioactivas, refiro algumas questões de segurança que devem ser asseguradas.

Todos os elementos do sector deverão ser portadores de equipamento doseador de radioactividade. Estes possibilitam o registo da quantidade cumulativa de radioactividade a que os trabalhadores estão sujeitos.

Relativamente aos ensaios, é de referir que a RIA constitui uma metodologia em desuso, devido aos condicionalismos que se colocam a nível de infra-estruturas e segurança para manipulação de substâncias radioactivas. No entanto, continua a ser o método de referência para determinação de alguns parâmetros analíticos. Muitos dos analitos determinados por técnicas de RIA são parâmetros cuja frequência de determinação é baixa e logo com pouco interesse para automatizar com os métodos mais recentes.

Os princípios básicos da radioactividade estão associados à utilização de isótopos, que são núclídeos com o mesmo número atómico e diferente número de massa. Os núclídeos instáveis sofrem transformações espontâneas de perda de massa, ganhando assim estabilidade por processo de decaimento radioactivo. A perda de massa espontânea, é responsável pela emissão de energia sob a forma de radiações. A detecção da radiação produzida é feita por um detector de cintilação, com cristais de iodeto de sódio. A absorção da radiação produz excitação e ionização, esta energia por sua vez

produz luz (cintilação). O equipamento detector é um contador gama, constituído por um cristal cilíndrico de iodeto de sódio, com orifício para colocação das amostras. Os fotões de I^{125} penetram no tubo da amostra e no revestimento de alumínio, entrando no cristal, onde são absorvidas as cintilações a 420nm. A detecção de radioactividade apresenta boas performances de sensibilidade e especificidade.

Relativamente ao princípio da reacção analítica, pode desenvolver-se por diferentes processos, nomeadamente:

- **RIA Competitivo:** a amostra vai competir com um análogo marcado com I^{125} , pela ligação ao Ac Anti analito que reveste as paredes do tubo de reacção. O sinal detectado é indirectamente proporcional à concentração do analito presente na amostra.
- **RIA por Precipitação:** a amostra vai competir com um análogo marcado com I^{125} , pela ligação ao Ac anti analito em solução, a adição de um agente precipitante contendo Ac anti 1º anticorpo leva á precipitação do complexo formado. O sinal detectado é indirectamente proporcional à concentração do analito presente na amostra.
- **IRMA:** a amostra liga-se ao Ac anti analito que reveste as paredes do tubo de reacção e ao conjugado de Ac marcado com I^{125} . O sinal detectado é directamente proporcional à concentração do analito presente na amostra.

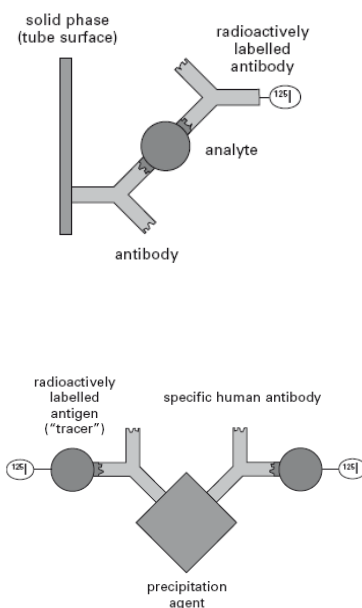


Figura 22: Esquema de ligações Ag-Ac para RIA

Alguns dos parâmetros analíticos determinados por RIA são a Aldosterona, a 17-OH-progesterona, a Testosterona livre, a Renina activa, a ARP, a DHT, a Glucagina, a ADH, a Alfa-subunidade, a DHEA, o Androstenediol, o Estriol, a Melatonina, o TPA, o 11-Desoxi-Cortisol, a Estrona, o cAMP.

Na manutenção do equipamento de leitura de radiação, uma das operações consiste na leitura semanal dos tubos de suporte para as contagens, por forma a verificar que os valores de radiações residuais não ultrapassam determinado valor, a partir do qual os tubos são retirados para lavagem.

Apresento de seguida o interesse clínico e a técnica para alguns dos parâmetros determinados, a título de exemplo.

A quantificação de **Metanefrinas** é realizada por radioimunoensaio competitivo para Metanefrinas livres e Normetanefrinas livres no plasma. O doseamento das metanefrinas apresenta interesse clínico no diagnóstico do feocromocitoma, tal como a determinação das catecolaminas ou o ácido vanilmandélico (VMA).

A amostra deve ser colhida em tubo de EDTA ou citratado, refrigerada a 2-8°C até às 6h após colheita e a -20°C para períodos superiores. As amostras hemolisadas ou lipémicas devem ser rejeitadas.

A técnica envolve duas etapas, 1) Precipitação: pipetar calibradores, controlos e amostras para tubos de reacção; adicionar reagente equalizador a todos os tubos; adicionar standard A aos tubos com amostras (actua como padrão interno, remove efeito matriz); misturar em vortéx e centrifugar. Do sobrenadante recolher amostras separadas para doseamento de Metanefrinas e de Normetanefrinas. 2) RIA Metanefrinas: pipetar água para tubos marcados; adicionar dos sobrenadantes obtidos os respectivos calibradores, controlos e amostras; adicionar Buffer; adicionar solução de acetilação; misturar e incubar à temperatura ambiente por 15'; adicionar o antisoro metanefrina a todos os tubos, misturar em vortéx e incubar 1h/TA; adicionar Metanefrina-I¹²⁵ a todos os tubos e adicionar um que leva apenas o marcador. Misturar, tapar e incubar 2h/TA em agitador. Adicionar reagente de precipitação a todos os tubos excepto o Total marcado; incubar entre 2 a 8°C/15min, centrifugar, decantar e fazer contagem durante 1min em contador gama.

A curva de calibração para cada um dos parâmetros é construída com 6 pontos a partir da percentagem obtida (B-NSB)/(B0-NSB), sendo o gráfico semi-logaritmico (Y-linear vs X- logaritmica). A recta é obtida por regressão não linear, sendo as concentrações de controlos e amostras obtidas directamente por extrapolação a partir da recta. As amostras com concentrações superiores ao último ponto da curva, não devem ser considerados, nestes casos procede-se à diluição da amostra até que o valor obtido se encontre dentro da curva.

Os valores de referência no plasma são de Metanefrina<90pg/mL e Normetanefrina<180pg/mL. O café, alimentos com catecolaminas ou a realização de exercício podem interferir com os resultados.

A **aldosterona** é produzida nas glândulas supra renais e é a hormona responsável pela regulação dos níveis de sódio e potássio no sangue.

A técnica utiliza anticorpos específicos da aldosterona imobilizados na parede do tubo de reacção. A aldosterona marcada com I¹²⁵ compete durante um período de tempo

com a aldosterona na amostra, por locais de fixação aos anticorpos. O tubo é decantado de forma a separar a aldosterona livre da ligada, sendo depois feita a leitura no contador gama. A concentração de aldosterona no sangue é inversamente proporcional à radiação medida. A determinação pode ser feita em amostras de soro ou na urina de 24h.

A utilização da urina implica um pré-tratamento da amostra. Procede-se à hidrólise da amostra por adição de ácido clorídrico e incubação por 24h à temperatura ambiente no escuro. De seguida faz-se uma extracção com acetato de etilo, que fica na fase superior do tubo com a aldosterona. Retira-se um volume específico da camada superior para um tubo não revestido e procede-se à evaporação sob fluxo de azoto a 37°C. O precipitado obtido é ressuspendido e as amostras estão prontas para o procedimento de radioimunoensaio.

Ao resultado obtido através da curva de calibração, tem de se multiplicar pelo factor de diluição e ainda pelo volume total de urina, de forma a apresentar o resultado em µg/24h. Os valores de referência variam em função da posição de colheita e em função do tipo de dieta, sendo mais elevados para quem se encontra de pé, ou em indivíduos com dietas com baixo teor de sal.

A **Dehidroepiandrosterona** é um importante esteróide. Existe no soro sob duas formas distintas, a DHEA que é produzida nas gónadas ou no córtex da supra-renal e a DHEA-S forma sulfatada que apenas é produzida na supra-renal. A forma não sulfatada é determinada por radioimunoensaio competitivo. A determinação da DHEA tem interesse clínico para diagnóstico de Síndrome de Cushing, Síndrome adrenogenital, hirsutismo ou ainda tumores adrenais virilizantes.

O **VIP** (Peptido Intestinal Vasoactivo) é um polipeptido linear com 28 aminoácidos. Está associado à regulação da motilidade gástrica e à regulação do transporte iónico e da água no intestino. É determinado por radioimunoensaio competitivo, utilizando Ac contra um conjugado de VIP-Albumina. O VIP presente nas amostras, controlos e standards, compete com o VIP-I¹²⁵ para se ligar aos Ac específicos. Utilizando anticorpo anti Ac humano ligado a polietilenoglicol (anti Ac-PEG), consegue-se separar a fracção de VIP-I¹²⁵ ligada, da fracção não ligada, obtendo-se um precipitado. A radiação medida no precipitado é inversamente proporcional à concentração de VIP na amostra. A colheita da amostra é feita em tubo de EDTA e o plasma deve ser congelado de imediato.

A **melatonina** é uma hormona produzida pela glândula pineal, e a sua principal função é a regulação do ciclo sono/vigília. Um ambiente calmo e escuro promove o aumento da melatonina, provocando sono.

A colheita é feita na saliva e com recolhas sucessivas de hora a hora, perfazendo um total de 5 horas desde o início do sono até à hora de sono profundo. Pretende-se com isto conhecer o perfil de produção de melatonina do doente, para avaliar patologias do sono. A saliva é recolhida para tubo estéril com um algodão no interior. Procede-se à centrifugação do tubo e a saliva é filtrada através do algodão, sendo depois utilizado o filtrado no fundo do tubo. A técnica é por radioimunoensaio competitivo com formação de precipitado, semelhante à determinação de VIP.

Alergologia

Na **alergologia**, utiliza-se o equipamento ImunoCap da Phadia, que permite avaliar “in vitro” variadíssimos alergenos associados a reacção alérgica mediada por IgE (todos os ensaios “in vivo” implicam a realização de testes cutâneos). A vantagem dos testes “in vitro” consiste na possibilidade de se determinar a sensibilidade para vários alergenos com apenas uma amostra. No entanto, só testa sensibilidades mediadas por IgE. Por este motivo, quando o resultado dá negativo não se pode assumir que não existe reacção alérgica, uma vez que outros mecanismos podem estar associados ao desenvolvimento da hipersensibilidade.

As reacções de hipersensibilidade podem apresentar-se como não alérgicas ou alérgicas. Dentro das reacções alérgicas, estas podem ser não mediadas por IgE, como a doença celíaca ou dermatite de contacto mediadas por células T, mediadas por eosinófilos, por IgG ou outros mecanismos. As reacções mediadas por IgE podem classificar-se em atópicas como a asma, a rinite ou o eczema ou como não atópicas como picadas de insecto, hipersensibilidade a helmintas, fármacos ou outras.

Para estudos de alergologia existem protocolos estabelecidos. É importante conhecer a idade do doente, uma vez que enquanto os bebés têm muitos eczemas cutâneos, as crianças têm maior prevalência de alergias gastrointestinais. Estas informações são importantes para estabelecer o protocolo a utilizar. Em qualquer avaliação deve-se começar por determinar a IgE total que indica se a reacção alérgica é mediada por IgE ou não.

calibradores Os testes de Phadiotop® e Phadiotop infant® constituem testes de rastreio para avaliar o grau de atopia, classificando o doente como atópico quando são detectados níveis mensuráveis IgE específica de alergenos inalantes para adultos ou

alimentares para crianças. Quando os testes de rastreio dão negativo, indicam que os sintomas não estão associados aos alergenicos comuns e deve-se estudar outras possibilidades. O resultado é avaliado em conjunto com a sintomatologia e a estação do ano em que ocorrem. Confirmando que se trata de processo alérgico e reunindo toda a informação necessária, o clínico opta por conjuntos de alergenicos a estudar, por forma a determinar qual o responsável pela reacção de hipersensibilidade.

O equipamento automático realiza um imunoensaio fluorimétrico tipo sandwich. A fase sólida do Immunocap consiste num derivado de celulose fechado numa cápsula. Esta fase sólida encontra-se revestida pelo alérgico de interesse, que reage com a IgE



Figura 23: Equipamento Phadia

específica presente na amostra. Depois de lavada a IgE não específica, são adicionados Ac anti-IgE marcados por uma enzima. É feita nova lavagem para remover o excesso de Ac anti-IgE e adiciona-se ao complexo formado o substrato, para incubação. Após paragem da reacção, mede-se a fluorescência produzida, sendo esta directamente proporcional à concentração de IgE específica presente na amostra.

Em algumas situações como a doença do criador de pombas, a hipersensibilidade é mediada por IgG e não por IgE, nestas situações é importante a determinação da IgG específica.

Outras determinações de interesse na alergologia incluem o doseamento da proteína catiónica do eosinófilo (ECP), ou da triptase. (Para o doseamento da ECP a colheita deve ser feita em tubo de soro, com agitação após a recolha e repouso durante 60 a 120 minutos para que ocorra coagulação. O tubo é centrifugado a 1250g/10 min, sendo o soro aliquoteado e armazenado a 2-8°C). Esta determinação é importante porque asmáticos com inflamação eosinofílica apresentam níveis de ECP aumentados, que surgem primeiro que os sintomas.

A triptase é um marcador da activação dos mastócitos, constituindo-se como um indicador do risco de choque anafilático, e como marcador de mastocitose sistémica. A primeira colheita é feita entre 15 minutos e as 3 primeiras horas após início dos sintomas, a segunda entre as 3h e as 6h e a terceira entre as 24 e 48h seguintes, para observar o retorno ao nível basal.

Química Analítica

O sector da Química Analítica constitui uma área de processos não automatizados. Os métodos empregues apresentam diferentes etapas, nomeadamente, o tratamento das amostras, purificação ou extracção do analito e a sua detecção. Existem diferentes metodologias implicadas.

Potenciometria

A **Potenciometria** directa determina a concentração de analitos, através do volume gasto numa solução padronizada (titulante) necessário para atingir uma medida de potencial que representa o ponto de equivalência da reacção. A técnica é utilizada para determinar Lítio, utilizando um eléctrodo de ião selectivo. Diariamente é realizado o controlo, processado em conjunto com as amostras e correlacionados com a curva de calibração.

HPLC

O **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) é uma técnica cromatográfica que emprega equipamentos sofisticados para separar os componentes de uma amostra, pela interação entre a fase estacionária e a fase móvel líquida. A amostra tem de ser solúvel na fase móvel. A eluição corresponde ao movimento da amostra através do sistema cromatográfico, podendo ser isocrática ou por gradiente de solventes.

A existência de pré-colunas entre o sistema de injeção e a coluna, previne a entrada de partículas indesejáveis, aumentando a duração da coluna. A pré-coluna deve ter a mesma constituição da coluna.

Os detectores podem ser diversos e examinam de forma continua a amostra eluída, originando sinal há passagem dos compostos. Cada um dos compostos presentes na amostra deve originar um pico, e a combinação desses picos origina o cromatograma. No laboratório existem detectores de Absorção no UV-Visível, de Emissão de Fluorescência e Eletroquímico.

O HPLC constitui uma técnica para doseamento de conjuntos de substâncias que são separadas durante a eluição, originando um cromatograma. Em cada corrida cromatográfica devem ser ajustados, segundo o programa estabelecido, o fluxo, a pressão, a temperatura do forno, o comprimento de onda (excitação/emissão para o detector de fluorescência) ou potencial eléctrico, o tempo da corrida e o tempo de retenção dos picos. As condições óptimas de realização do ensaio são específicas para cada técnica. Em algumas situações é necessário adicionar dois padrões internos. Isto

acontece porque a determinação de vários parâmetros em simultâneo, que podem ter comportamentos diferentes na presença dos reagentes da reacção, assim o justifica. Durante a análise do cromatograma é importante tratar de forma semelhante os controlos e amostras para que se mantenham comparáveis.

Para cada técnica existe uma coluna própria e devem ser realizadas purgas ao sistema, sempre que se troca a técnica e conseqüentemente a coluna. Alguns dos parâmetros analisados por HPLC são as metanefrinas, porfirinas, carotenos.

De forma geral, para HPLC a fase inicial de trabalho implica purificação da amostra por extração em coluna de cromatografia preparativa SPE (Solid Phase Extration, existem Kit's comerciais específicos para cada parâmetro), que implicam aplicação da amostra, lavagens e eluição. Só depois deste tratamento é que se pode injectar a amostra no HPLC.

Para determinação das metanefrinas urinárias a preparação da amostra inicia-se por hidrólise ácida a 100°C durante 30 minutos para libertação das metanefrinas. A amostra a utilizar é a urina de 24h recolhida com 10mL de HCl 6N. A amostra resultante é purificada e extraída por eluição em colunas de resina. Passa por uma coluna inicial, onde o producto eluido é transferido para uma segunda coluna, sendo o eluente aqui utilizado para recolha da amostra. Esta técnica inclui uma hidrólise, dupla extração em coluna, seguida de HPLC com doseamento da amostra por comparação directa com o pico do padrão interno.

Para determinação de β -carotenos, a amostra utilizada é o plasma em EDTA. O pré-tratamento das amostras, controlos e calibradores são comuns e implicam pipetar 100 μ L de cada um com adição de 50 μ L de padrão interno. Adiciona-se 50 μ L de reagente de precipitação, seguida de agitação em vortex. Adiciona-se 200 μ L de tampão de extração, agita-se em vortex, centrifuga-se durante 10 minutos a 13000rpm e do sobrenadante injetam-se 50 μ L no equipamento.

A determinação de Porfirinas pode ser feita a partir de amostras de plasma, urina de 24h ou fezes. O sistema de HPLC tem de ser bem lavado sem colunas antes de se iniciar a técnica e no decorrer da análise deve ser efectuado um ciclo de lavagem entre cada injeção. Quando a amostra utilizada é o plasma o resultado é apresentado em μ L/L, para a urina em μ g/24h e para as fezes em μ g/g.

Absorção Atómica

A **Absorção Atómica** (AA) baseia-se na absorção específica e quantitativa, de um elemento mantido no estado de vapor atómico, por meio de energia calorífica (chama

ou câmara de grafite), de uma radiação proveniente de uma lâmpada cujo cátodo emissor contém o mesmo elemento a dosear. Tem interesse no doseamento de metais, que absorvem radiação. O método utilizado para determinação de Cobre urinário, Selénio, Cádmio, Chumbo e Alumínio. A determinação de metais por AA apresenta interesse clínico na medicina do trabalho, para monitorização de pessoal que trabalha em metalúrgicas, na pintura, em minas, etc. Intoxicações por metais como o Mercúrio, Cádmio, Chumbo entre outros, provocam deposição sobre tecidos profundos como o SNC, osso, tecido adiposo entre outros. Por este motivo, o melhor material biológico para fazer pesquisa de intoxicações crónicas é o cabelo ou unha. A pesquisa de Cobalto, Titânio e Crómio surge muitas vezes associada a pessoas que colocaram próteses.

Para cada parâmetro é necessário uma lâmpada de cátodo oco específica. Para cada parâmetro são feitas leituras em duplicado ou triplicado, sendo o valor final obtido o resultado da média dos dois valores que apresentem menor variação entre resultados.

Para a pesquisa de Cádmio é necessário efectuar um pré-tratamento da amostra. O elemento encontra-se no interior dos eritrócitos, deste modo para o dosear é necessário hidrolisar os mesmos. A 100µL de sangue total, adiciona-se 400µL de solução de ácido fosfórico 75mm para libertar o cádmio, o produto da hidrólise será depois analisado. A avaliação do Cádmio no sangue normalmente indica intoxicação aguda.

O Chumbo é um elemento maioritariamente intracelular, logo a amostra utilizada para a sua determinação é o sangue total. O pré-tratamento da amostra implica hemolisar o sangue com ácido fosfórico 0,75mmol. O produto obtido quando é colocado no equipamento ainda é diluído com solução de paládio. A curva de calibração é obtida a partir de uma amostra à qual são adicionadas concentrações crescentes de padrão. Com a adição do padrão eliminam-se as interferências da matriz da amostra, e a concentração do analito é obtida pela intercepção da recta no eixo do xx. O programa de aquecimento tem várias fases, sendo optimizado para cada elemento. A lâmpada de cátodo oco faz a leitura do sinal da amostra, a lâmpada de deutério faz a correcção do efeito matriz. A concentração final é obtida pelo diferencial da Absorção. O volume de amostra aspirado é de 3µL, constituindo uma vantagem da AA o facto de necessitar de volumes muito baixos de amostra.

A determinação do Cobre na urina exige diluição da amostra devido à elevada concentração do analito. Quando é feita a sua determinação analisa-se a amostra numa diluição de 1:4 e uma diluição de 1:8, em simultâneo. Estas diluições são necessárias, porque para concentrações aumentadas a linearidade da resposta diminui.

ICP

O **ICP** (Inductively Coupled Plasma) é um método de emissão com plasma de Argon, onde o plasma actua como mistura gasosa condutora de electricidade. A atomização ocorre num dispositivo designado de TOCHA onde é produzido o plasma, onde se dá a excitação e a emissão da radiação. A detecção é feita com espectrofotómetro sequencial, que permite a detecção de vários elementos em simultâneo. O equipamento pode apresentar uma câmara clássica que não concentra a amostra e logo confere menor sensibilidade, ou pode ter uma câmara ultra sónica que consegue concentrar a amostra.

Quando a amostra é sugada, passa por uma serpentina de aquecimento/arrefecimento sendo no final vaporizada com plasma. É feita quantificação da radiação emitida e por varrimento do espectro são obtidos os vários compostos presentes na amostra. Com o equipamento é possível seleccionar o comprimento de onda específico em que se quer detectar determinada substância.

O método constitui uma opção para a detecção de elementos para os quais não se possui cátodo oco, ou para determinação de vários parâmetros de uma só amostra.

A calibração do equipamento é feita com calibradores a multi-elementos, sendo por vezes necessário adicionar monoelementos que não estejam contemplados, como a prata. O iodo necessita de um calibrador específico. As diferentes concentrações do calibrador, são obtidas por diluições sucessivas até obtenção de quatro pontos.

Para realização do controlo de qualidade são utilizados MRAI. A partir de uma solução de concentração intermédia dos calibradores, prepara-se uma outra solução com concentração conhecida que é processada como amostra. Sendo conhecida a concentração desta solução, bem como a sua composição em elementos químicos, esta pode actuar como controlo interno.

O volume de amostra utilizado para aspiração é de aproximadamente 2mL. As amostras de urina de 24h são pré-tratadas, para hidrólise ácida com HCl e HNO₃ a 100°C. Quando a amostra é soro, deve ser previamente diluída. Para as diluições é utilizado o ácido nítrico a 1%, porque o plasma de Árgon é mais estável a pH ácido. É necessário ter cuidado com as tubagens do equipamento, pois a passagem de soros liberta muitas proteínas que se acumulam levando à necessidade de substituição. O método também é utilizado para determinar os metais presentes em amostras de água.

Espectrometria IV

Na **Espectrometria de IV**, com o equipamento Perkin Elmer, o resultado é apresentado por espectro de IV, com um gráfico que representa o conjunto das frequências de radiação absorvidas pela molécula. O número de onda (cm^{-1}) é directamente proporcional à frequência e à energia da radiação. São detectadas as vibrações de alongamento e de deformação das moléculas.

Continua a ser o método utilizado para determinação de cálculos urinários. Para avaliação dos cálculos, analisa-se o seu peso, dimensões, forma, cor e uniformidade de superfície.

Depois da avaliação macroscópica, prepara-se a pastilha com brometo de potássio (300mg BrK + 1mg Cálculo), em almofariz. A mistura é prensada, até obtenção de uma pastilha homogénea que é colocada no suporte para leitura no espectrofotómetro de IV.

GC-MS

A **GC-MS** Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa é o método utilizado para identificar compostos com base nas massas dos átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas, após a formação de iões na fase gasosa e posterior separação de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), seguidas de detecção.

Os passos essenciais da metodologia implicam: gerar os iões, o processo de ionização implica energia suficiente para se formarem os vários fragmentos; separar os iões, os iões são submetidos a um campo eléctrico ou magnético sob vácuo, e depois são separados de acordo com o valor de m/z ; detecção de iões; obtenção de um espectro de massa.

No laboratório o método é empregue na confirmação qualitativa da presença de drogas de abuso detectadas por imunoenzimoensaios, nomeadamente anfetaminas, opiáceos e cocaína.

Helicobacter pylori

O diagnóstico de infecção gástrica por *Helicobacter pylori* recorre muitas vezes a técnicas invasivas como a endoscopia. Por forma a minimizar os efeitos indesejados das técnicas invasivas foram desenvolvidas novas metodologias para confirmar o diagnóstico.

Pela utilização do isótopo de carbono, ^{13}C marcado com ureia, é possível detectar a presença de *Helicobacter pylori* no estômago. O utente é submetido a um teste respiratório, onde lhe é solicitado que ingira uma refeição teste, seguida da recolha de 3 amostras do ar que expira, para dosear a quantidade normal de ^{13}C que existe no CO_2 expirado. De seguida, o utente ingere a solução de ureia- ^{13}C Pylobactel, aguarda 30

minutos e efectua-se nova recolha de 3 amostras do ar expirado. Quando a bactéria *H. pylori* está presente e activa vai decompor a ureia- ^{13}C , o que será detectado no CO_2 expirado. O aumento significativo de ^{13}C nestas amostras, quando comparadas com o nível normal, sugerem que o *H. pylori* está presente e activo.

No laboratório, através do equipamento HeliFAN, é feita a medição de ^{13}C presente nas amostras. Quando a diferença entre os doseamentos das amostras pré-ureia e pós-ureia é $\geq 3,5$ o resultado é positivo, e quando $< 3,5$ o resultado é considerado negativo.

Biologia Molecular

A realização de técnicas de biologia molecular no laboratório clínico implica determinadas condições físicas e estruturais de organização do espaço. As amostras devem seguir um fluxo direccional de marcha em frente, de forma a minimizar a contaminação dos produtos. Neste sentido, a área de trabalho é composta por:

1. Sala de Pré-PCR, onde se encontram as câmaras de segurança biológica, de fluxo vertical classe II-A, sendo uma utilizada na manipulação das amostras e outra na manipulação de reagentes;
2. Sala de PCR, onde se encontram os termocicladores clássicos de PCR;
3. Sala de Pós-PCR, onde se encontram equipamentos de detecção dos produtos amplificados;
4. Área comum, onde se encontram equipamentos fechados para PCR-Tempo Real, os extractores, entre outros.

Os produtos e materiais devem manter o fluxo direccional da sala 1, para a 2 e para a 3, sem que ocorram retornos.

No laboratório de biologia molecular deve-se trabalhar com pontas com filtro, porque estas evitam o “carry-over” e constituem uma barreira à formação de aerossóis, a temperatura das salas deve encontrar-se entre 18 a 22°C para evitar a temperatura óptima da enzima Taq polimerase. Para a limpeza geral das salas e bancadas utiliza-se um produto especial “DNA Cleaner” que elimina os ácidos nucleicos presentes sobre as superfícies.

O procedimento geral dos métodos de biologia molecular implica as seguintes etapas: 1º Extracção; 2º Amplificação; 3º Detecção do amplificado. Existem diferentes formas e equipamentos para realizar cada um destes processos, de forma individual ou conjunta, semi-automática ou totalmente automatizada, motivo pelo qual darei uma breve explicação dos processos, exemplificando.

As amostras para pesquisa de DNA, de uma forma geral apresentam requisitos pre analíticos simplificados devido à maior estabilidade do DNA quando comparado com amostras para pesquisa de RNA, que é um produto mais instável e logo facilmente degradado.

Existem no Laboratório diversos equipamentos extractores, o Magna Pure LC é um exemplo em que para cada série de trabalho, o próprio indica qual o material de que vai necessitar. É muito intuitivo e permite trabalhar com diferentes tipos de amostras

como sangue, soro, urina, fezes, entre outras. O processo de extracção é o único que pode ser executado de forma não sequencial durante a análise. Após chegada da amostra ao laboratório, deve-se realizar a extracção dos ácidos nucleicos a pesquisar e o produto obtido pode ser imediatamente analisado ou ser congelado para processamento posterior.

O Magna Pure LC utiliza esferas magnéticas para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos. Escolhe-se o protocolo, volume de amostra e eluido, cria-se a lista de trabalho para a série a efectuar. Na câmara de fluxo laminar pipetam-se as amostras para a rack que é colocada no equipamento. Depois de verificados os reagentes e consumíveis do equipamento dá-se início à extracção. No final do dia de trabalho, procede-se à descontaminação do aparelho com UV.

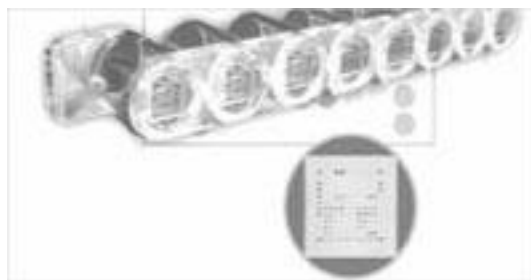
O Versant kPCR da Siemens é um sistema automático que combina extracção das amostras, o isolamento e purificação de ácidos nucleicos, com a distribuição da mistura reaccional e dos extractos para a placa de amplificação.

Protocolo genérico de Amplificação em tempo real (Ex: *Acantamoeba*)

- i. Desnaturação: Temperatura 95°C; Tempo 10 minutos; Ciclos 1
- ii. Amplificação do 1º PCR: Temperatura 95°/68°/72°C; Tempo 0, 5 e 12 segundos; nº de ciclos 45; com aquisição de fluorescência aos 72°C.
- iii. Análise de Dissociação (Melting): Temperatura 95°/78°/95°C; Tempo 0, 30, 0 segundos; Ciclos 1; com aquisição contínua de fluorescência. A temperatura de dissociação é específica para determinada sequência conhecida, permitindo assim a sua caracterização.
- iv. Arrefecimento.

Devido á especificidade do tipo de ensaios realizados na biologia molecular e ao tipo de tecnologia associados, muitos dos pedidos de análises são acompanhados de inquéritos, historial clínico ou termo de responsabilidade por parte do Hospital ou clínico que solicita, como exemplo temos a genotipagem ou perfil de resistência ao HIV.

Na pesquisa de **Papiloma Vírus Humano** (HPV), é utilizada uma amostra do exsudado do colo uterino. Depois da extracção do DNA de cadeia dupla do vírus, retiram-se 5µL do extracto para um eppendorf de reacção e este é processado no termociclador clássico.



Ocorrem ciclos de desnaturação, hibridação e replicação. Para a genotipagem é utilizado o produto da reacção de PCR, que é desnaturado por aquecimento para a posterior

hibridização em placa. A aplicação da tecnologia de microarray, possibilita a combinação da PCR com a hibridização em fase sólida revestida por sondas específicas. Na placa existem diversos poços com chip no fundo, onde se encontram as sondas correspondentes aos vários genótipos. Procede-se à incubação, lavagens, adiciona-se substrato e faz-se a leitura num equipamento próprio e específico para revelação dos sinais positivos no chip. Através da análise dos chips com hibridização positiva, por comparação com o controlo positivo é possível caracterizar quais os genótipos presentes em cada amostra.

Para os diversos Kits de PCR, existem controlo positivo, controlo negativo e padrão interno. O padrão interno é normalmente constituído por um fragmento de DNA de uma proteína ubíqua endógena, como a β -globina, que permita garantir a eficácia do processo de replicação em amostras negativas para as pesquisas em causa, observando-se sempre a presença do padrão interno nessas mesmas amostras.

Quando se aplicam técnicas em Tempo Real, existem pelo menos 2 comprimentos de onda distintos para as leituras, sendo um para ler amostras, controlos e calibradores e o outro para ler os padrões internos. Para avaliar o ciclo de PCR-TR, também se deve observar a temperatura de melting dos controlos positivos, uma vez que esta é específica de cada “amplicon”.

O meio de Simple Prep é um meio líquido para recolha de células do exsudado vaginal, sendo o dacron utilizado na citologia colocado no seu interior, apresentando assim estabilidade prolongada entre 2 a 3 meses. A partir deste tubo pode-se realizar diversas pesquisas.

O equipamento m2000 RT-PCR da Abbott constitui um sistema totalmente automatizado para extracção, amplificação e detecção de *Chlamydia trachomatis*, a partir do tubo primário. A colheita para pesquisa de Chlamydia é realizada em tubo apropriado, contendo uma solução tampão e a zaragatoa de recolha. Os tubos de colheita são colocados no equipamento que, com a presença de um control e 2 calibradores define o “cut off” de positividade da amostra para PCR e faz automaticamente a extracção. Os controlos e calibradores são sujeitos ao mesmo processo extractivo que as amostras. Depois de obtidos os ácidos nucleicos, as amostras são transferidas para o amplificador para PCR em tempo real.



Figura 25: Equipamento m2000

Para a pesquisa de DNA de **Micoplasmas** é realizada extracção seguida de preparação da mistura reaccional com utilização de 3 primers. É utilizado um protocolo clássico com ciclos de desnaturação a 95°C/10 minutos, amplificação com temperaturas de 94°, 55°, 72°C/ 30, 30, 60 segundos com 50 ciclos, extensão a 72°C/420 segundos, seguido de arrefecimento. A detecção é efectuada por electroforese em gel de agarose. Caso se observe a presença de banda positiva, a identificação da espécie é efectuada por reacção imunoenzimática.

Para determinar a **carga viral de HIV**, a amostra utilizada é o plasma, uma vez que é neste fluido que se encontram vírus em circulação e em replicação. Não existe interesse clínico em determinar a carga viral presente no interior dos Linfócitos, uma vez que obteríamos resultados muito elevados, mas pouco significativos relativamente ao nível de replicação activa no organismo. Na determinação da carga viral, pesquisamos a presença de RNA. Quando é solicitada a determinação de carga pro-viral passamos a pesquisar DNA, e utiliza-se como amostra o sangue total. A pesquisa de carga pro-viral tem interesse clínico em recém nascidos de mães HIV positivas, de forma a determinar precocemente se os filhos também estão infectados e se apresentam replicação activa. Nestas situações a detecção de RNA viral poderia ser consequência de transmissão vertical, mas a detecção de RNA pro-viral (DNA) será indicativa de que a replicação activa ocorre já no recém nascido, confirmando infecção por HIV.

A determinação de Genótipos por Hibridação Reversa inicia-se com a extracção da amostra, seguido de PCR e a detecção final é realizada por Hibridação a partir do DNA biotinilado resultante da PCR. A strip de nitrocelulose encontra-se marcada com bandas específicas de cada genótipo, possuindo uma cauda Poly (dt) para iniciação da hibridação em cada banda. Serão hibridizadas as zonas específicas de DNA que permitem a diferenciação dos genótipos. Após incubação da strip com o produto da PCR, nas zonas de ligação específica ocorre hibridização. São efectuadas lavagens para remoção de excessos de produto. Adiciona-se Fosfatase Alcalina marcada com estreptavidina (conjugado) que ao reagir com o complexo (FA-Streptavidina-Biotina) dá coloração ao precipitado, resultando na formação de uma banda. O padrão de bandas formadas na tira, por comparação com a carta de interpretação, permite determinar o genótipo. Cada tira tem 3 tipos de control, o 1º é control do conjugado que monitoriza o desenvolvimento da cor ao longo da reacção, o 2º é control de amplificação 1 que contém “probes” universais que hibridam com o produto de PCR, o 3º é o control de

amplificação 2 na linha 23 (final da zona de eluição) que contém “probes” universais que hibridam com outra zona do produto de PCR.

Agentes infecciosos que apresentem material genético composto por RNA, são sujeitos a processos de PCR-TR (Polymerase Chain Reaction - Reverse Transcriptase) a enzima da transcriptase reversa actua na síntese do cDNA a partir do RNA, para depois se proceder ao ciclo de PCR. Para estes agentes os protocolos laboratoriais contém uma etapa adicional para a síntese do cDNA, que pode ser feita automaticamente no equipamento com um protocolo único ou por protocolos de amplificação com 2 ciclos de PCR. Como exemplo deste tipo de agentes temos a *Leptospira*.

A **Calprotectina** é uma proteína de ligação do Ca^{2+} , que pertence á família S100, derivada da fracção citosólica dos Neutrófilos maioritariamente, mas também dos Monócitos e Macrófagos activados. A concentração desta proteína aumenta muito nas fezes, comparativamente com o plasma quando existe Doença Inflamatória do Intestino, encontrando-se em níveis normais na doença funcional vegetativa do tracto gastrointestinal ou no Síndrome do intestino irritável. É um bom parâmetro de rastreio para o diagnóstico diferencial destas patologias, uma vez que a terapêutica para cada uma delas é bastante distinta.

Existem muitos microrganismos para os quais não existem Kits de PCR-TR disponíveis no mercado. Nestes casos é possível criar protocolos internos, mediante pesquisa bibliográfica científica, que referencie qual o primer a utilizar para o agente específico. Conhecendo a sequência específica para o primer, é possível solicitar a sua síntese a empresas reconhecidas para tal. Depois de obtido o primer, monta-se a técnica de preparação do MIX reaccional no laboratório de forma a obter novos protocolos de PCR em tempo real. A empresa responsável pela síntese do primer, fornece também todas as indicações relativas às temperaturas de melting, com e sem mutações.

A detecção do **Poliovírus** (DNA) é feita em duas etapas, sendo realizado um 1º PCR para obtenção de DNA viral e depois desdobra-se o produto obtido para duas pesquisas simultâneas na 2ª etapa, com pesquisa de Polioma-BK e Polioma-JC. A amostra a utilizar na fase inicial de extracção pode ser sangue total ou urina, observando-se melhores resultados com a urina. Quando uma amostra tem resultado positivo é novamente processada, com realização de curva de calibração para obtenção de resultado quantitativo.

O Ligth cyclor da Roche é um equipamento totalmente automatizado para PCR em tempo real, com determinação da curva de dissociação (melting) ou quantificação do alvo de ácidos nucleicos (amplicon). Os resultados são tratados de forma diferente quer se trate de ensaio qualitativo por curva de dissociação ou ensaio quantitativo por curva de calibração.



Figura 26: Equipamento Ligth Cyclor

Microbiologia

A actividade do sector inicia-se com uma triagem local dos produtos biológicos. Estes são muito diversos e apresentam características próprias de acondicionamento. A organização do espaço nesta área de actividade é importante, verificando-se que as amostras quando chegam ao sector passam inicialmente pela triagem, depois seguem para a sala de sementeiras onde se encontram as câmaras de segurança biológica com fluxo vertical, sendo os produtos cultivados e incubados em estufas apropriadas. Os produtos desse crescimento são processados na sala central onde se realizam as provas para identificação e TSA (teste de sensibilidade a antibióticos). O fluxo de trabalho organiza-se de forma a respeitar o princípio da “marcha em frente”.

As amostras em microbiologia são muito diversas, sendo o processamento e valorização clínica efectuados em função disso. Para a avaliação dos exames culturais temos de conhecer a flora saprófita do respectivo produto biológico, bem como quais os microrganismos habitualmente responsáveis por infecções, diferenciar culturas puras e quantitativamente significativas, de culturas mistas, resultado de contaminação ou não valorizáveis por outros factores.

Exsudado Nasal

A colheita é feita com zaragatoa em meio de Stuart. É realizado apenas exame cultural, sendo semeado o meio de Gelose Columbia e Manitol/ Chapman. Numa amostra com *Staphylococcus aureus* deve-se realizar sempre o TSA, para pesquisa de MSRA (*Staphylococcus aureus* Metilcilina Resistente). Se o quadro clínico não for indicativo de processo infeccioso, pode-se adicionar nas observações alguma informação como “flora de colonização”.

Exsudado Faringeo

A colheita é feita com zaragatoa em meio de Stuart. É realizado apenas exame cultural, após enriquecimento em caldo de Todd Hewit, com incubação a 37°/24h, seguido de repicagem para Gelose Columbia que incuba em atmosfera de 5% de CO₂. O enriquecimento é efectuado para conseguir a recuperação de agentes mais exigentes. Após o período de incubação, de acordo com o crescimento observado, procede-se a outras provas de identificação como a catalase, coagulase, teste da bacitracina para *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A, teste da optoquina para *Streptococcus pneumoniae*. Nos resultados patológicos e valorizáveis a identificação e TSA são realizados no Vitek.

Expectoração

A colheita é feita por tosse forçada com recolha do produto para boião estéril, após gargarejamento e lavagem da boca com água. Uma boa amostra, representativa de processo infeccioso, será aquela em que se observem muitos leucócitos no Gram e onde se verifique crescimento isolado do agente no exame cultural. O diagnóstico das infecções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita.

É realizado exame directo. Duma porção purulenta da amostra, efectua-se o esfregaço por estiramento e cora-se pelo método de Gram.

No exame cultural efectua-se sementeira em Gelose Columbia, MacConkey e Chocolate Haemophilus. A sementeira deve ser executada por quadrantes, por forma a garantir uma boa distribuição do produto, que permita observar a distribuição e predomínio da flora saprófita e a presença de microrganismos patogénicos. Para pesquisa de Haemophilus a sementeira é feita com incubação em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C/ 24 a 48h.

A presença de *Moraxella catharralis* é valorizável, devendo ser realizada identificação e TSA em Muller-Hinton com sangue, testando em disco os antibióticos Amoxicilina, Amoxicilina com Clavulâmico, Cefuroxima, Cefixima, Ciprofloxacina, Trimetropim com Sulfametoxazol e Eritromicina. Este agente tem como característica deslizar sobre o meio quando se empurra a colónia com a ansa.

Pesquisa de BK

A pesquisa pode ser efectuada a partir de produtos biológicos distintos, no entanto a amostra mais frequente é a expectoração e deve ser recolhida em triplicado em dias sucessivos, com processamento das três amostras.

É realizado o exame directo a partir do esfregaço por estiramento em lâmina, feito em duplicado, com coloração de uma das lâmina por Ziel-Neelsen, sendo a outra armazenada. No microscópio pesquisa-se a presença de bacilos álcool-ácido resistentes. Para o exame cultural a amostra deve ser sujeita a tratamento de descontaminação prévio. Para tal, misturam-se iguais volumes de amostra e NaOH, para liquefazer a amostra. Agita-se e adiciona-se a Fenolftaleína (indicador) para depois se neutralizar a amostra com HCl. A amostra é transferida para tubo de Lowenstein Joensen que incuba a 37°C em posição inclinada, com rolha não totalmente fechada, durante as primeiras 24h, ao fim das quais se remove o produto em excesso e coloca-se o tubo na vertical, até perfazer os 60 dias de incubação.

A pesquisa também pode ser realizada na urina, apresentando relevância clínica a presença de elevada leucocitúria.

Urina Asséptica

A colheita é feita em boião estéril, após limpeza da região genital e rejeição do 1º jacto. Os cuidados a ter durante a recolha, visam evitar a contaminação pela flora saprófita. Quando a amostra não é processada até uma hora após colheita, deve-se refrigerar a mesma ou fazer a recolha em tubo contendo ácido bórico.

a. Exame Citobacteriológico: A amostra é inicialmente processada pelo citómetro de fluxo, que faz a contagem de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias, cristais, leveduras e espermatozóides. A valorização dos resultados segue os critérios estabelecidos internamente, nomeadamente a presença de $> 20 \text{ WBC}/\mu\text{L}$ e /ou $> 30 \text{ Bact}/\mu\text{L}$, ou amostra de criança com menos de 6 anos de idade. Estes achados são indicativos de realização de exame cultural.

b. Exame do Sedimento Urinário: Amostras que se apresentem muito baças ou mucosas, não são processadas automaticamente e o seu sedimento é observado ao m.o. A observação é feita com objectiva de $40\times$, quantifica-se por campo e multiplica-se por um factor de 5 que converte o resultado em unidades/ μL .

c. Exame Cultural: É utilizado o meio de CLED, com incubação a $37^\circ\text{C}/24\text{h}$. A valorização do resultado obtido é feita em função do nº de células epiteliais, Leucócitos, contagem de ufc ($10 \text{ col} = 10^3 \text{ ufc/ml}$; $100 \text{ col} = 10^4 \text{ ufc/ml}$; $1000 \text{ col} = 10^5 \text{ ufc/ml}$), em conjugação com o perfil clínico do doente.

d. Identificação e TSA: Quando o crescimento é valorizado, realiza-se a identificação e TSA. Para a identificação presuntiva da *E.coli*, utiliza-se o meio de CPS que permite a produção da β -Glucoronidase, enzima específica deste agente. Para outros microrganismos recorre-se normalmente à identificação por cartas Vitek.

Quando surgem bactérias de *E. coli* ou *Klebsiella* com elevados padrões de resistências às Cefalosporinas, deve-se fazer o despiste de ESBL (Extended Septum Beta Lactamase). Para tal, em meio de Muller Hinton colocam-se discos de Ceftriaxone, Cefotaxima, Ceftazidima e Astreonam com Amoxicilina/ Clavulâmico no centro a 20 mm de distância dos restantes. Em função do halo de inibição obtido, determina-se se a bactéria é ESBL positiva/negativa, segundo as recomendações estabelecidas (ex: CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute).

Quando surgem colónias amarelas secas, suspeitas de *Enterococcus faecalis* realiza-se a serologia para Strep. D em látex. Um resultado positivo confirma a suspeita

e sugere realização de TSA com discos de Amoxicilina, Furadantina, Ciprofloxacina, Norfloxacina e Tetraciclina.

Exsudado vaginal/uretral

A amostra é colhida para tubo de Stuart e deve ser mantida a 37°C.

e. Exame Cultural: A zaragatoa é primeiro utilizada para a sementeira dos meios de Gelose de Sangue, Chocolate Polivitex, Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol e Strepto B quando solicitam a pesquisa de *Streptococcus* grupo B.

f. Exame Citológico: preparação de lâmina para observação do fresco, entre lâmina e lamela. Deve-se pesquisar a presença de Células, Leucócitos, Eritrócitos, Leveduras e Parasitas que são semi-quantificados com objectiva de 40×. A classificação é dada tendo por base que 0-5/campo = raros, 6-14/campo = alguns e >15/campo = muitos. É durante a observação do fresco que se pesquisa a *Trichomonas vaginalis*, parasita genital com forma de pequena célula redonda tipo pêra, com flagelos que se mexem muito, tornando o parasita visível.

g. Exame Directo Corado: preparação de lâmina para coloração por Gram. Deve-se pesquisar a presença de bactérias e leveduras e semi-quantificar com objectiva de 100×. A classificação é dada tendo por base que 0-5/campo = raros, 6-29/campo = alguns e >30/campo = muitos. É através do exame corado que devemos retirar algumas conclusões relativamente ao tipo de flora presente, nomeadamente se estamos perante uma flora normal e mista, referir a presença ou ausência de Bacilos de Dodderlein, a observação de cocobacilos sugestivos de *Gardnerella sp.*.

A pesquisa de *Neisseria* é realizada com o meio de VCA (Gelose com Vancomicina e Colistina). Quando se efectua TSA para *Neisseria gonorrhoeae* os antibióticos a pesquisar são a Penicilina, Cefotaxime ou Ceftriaxona, Cefoxitina ou Cefuroxima, Tetraciclina, Ciprofloxacina ou Ofloxacina. Quando o teste da Beta Lactamase é positivo, é indicativo de resistência a Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina.

Um exsudado uretral masculino, infectado com *Neisseria*, terá como agente infectante a *Neisseria gonorrhoeae*, uma vez que o homem só tem receptores específicos nas suas mucosas para esta espécie. A observação de Gram com muitos neutrófilos e diplococos gram negativos no interior/exterior dos mesmos é suficiente para diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*. Deve ser feita a identificação.

A pesquisa de *Streptococcus* grupo B apresenta interesse clínico na grávida durante a 35 e 37 semanas de gravidez, próximo do parto, uma vez que é durante este período que ocorre o risco de transmissão ao feto. Durante as fases iniciais da gravidez

não apresenta interesse, porque a presença de Strepto B pode representar apenas colonização, que não deverá ser tratada. Numa mulher não grávida com cultura pura de Strepto B na 1ª sementeira, não se deve valorizar. Não existe interesse em tratar parte da flora comensal, sem significado clínico para a utente. A pesquisa é feita em meio específico, com incubação a 37°C/ 24 a 48h em atmosfera de CO₂. Quando se pretende reisolar uma colónia do meio de STREPT B para trabalhar em cultura pura, podemos semear para Gelose de Sangue, não é necessário utilizar ANC porque o meio inicial já inibiu os Gram negativos. Quando é necessário realizar TSA para Strepto B, os antibióticos a utilizar em discos são a Eritromicina, Amoxicilina.

Ainda na grávida pode realizar-se pesquisa orientada para *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*.

A pesquisa de *Gardnerella vaginalis* é efectuada pela combinação da observação do fresco, exame corado e ainda se pode confirmar por exame cultural. No exame directo pelo fresco observam-se “Clue Cells”, que são aglomerados de células epiteliais envolvidos no seu rebordo por muitas bactérias. Na observação do Gram, estão presentes muitos cocobacilos gram negativos. No exame cultural podemos observar a presença de crescimento muito ligeiro tipo penugem branco/cinza na Gelose de sangue, ou podemos semear o meio de Gardnerella, que é específico para este microrganismo. O meio de Gardnerella contém sangue humano, a β -hemólise só ocorre com eritrócitos humanos. Este meio possui ainda antibiótico e antifúngico para inibir o crescimento de Gram negativos e leveduras. A incubação é feita a 37°C/24h em anaerobiose.

Numa mulher que apresente Candidas e Gardnerella no seu exsudado vaginal, devemos concentrarmo-nos no tratamento da Candida. A ocorrência de vaginose é favorecida pela ausência de Bacilos de Dodderlein, pH aumentado e predomínio de bacilos anaeróbios como a Gardnerella, Mobiluncus, Bacteroides ou Actinobium.

O antifungigrama só é realizado mediante pedido específico do clínico. A pesquisa de leveduras é efectuada com o meio de Sabouraud com Cloranfenicol e Gentamicina. Nas amostras positivas, procede-se á repicagem para meio de Candida ID, que origina coloração azul para as colónias de *Candida albicans* e de cor rosa para *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e *Candida kefyr*, todas as outras espécies são designadas como Candida não albicans. Durante a observação do Gram, a presença de colónias a filamentar é indicativa de infecciosidade pela Candida. A forma filamentosa é

a infectante, a observação apenas de formas leveduriformes pode representar colonização.

Ferida ou Exsudado purulento

Antes de efectuar a colheita, deve-se fazer uma boa limpeza da zona, para depois recolher apenas o produto em profundidade. Os meios a semear são Manitol/Chapman, Gelose de Sangue, MacConkey. Perante a diversidade de situações clínicas e de agentes microbianos que podem estar associados à formação de um exsudado purulento, a interpretação dos resultados obtidos deve ter em consideração o local de infecção, a história clínica, o tipo de infecção e modo de colheita.

Hemocultura

A colheita é efectuada por punção venosa, antes do pico febril ou da toma de antibióticos. Devem ser recolhidas sempre que possível 2 a 3 hemoculturas em intervalos de 30 a 60 minutos. Não se deve recolher amostras através de cateteres. Os volumes recomendados são de 20mL de sangue para aero e anaerobiose nos adultos e de 1 a 5mL para os recém nascidos. Deve-se proceder a uma correcta desinfecção da garrafa de hemocultura e do local a puncionar. Sem mudar a agulha depois da punção, transfere-se a amostra para os 2 frascos de hemocultura, de aerobiose e de anaerobiose. As garrafas são identificadas e mantidas á temperatura ambiente, não se deve refrigerar. No laboratório, os frascos são colocados no equipamento automático Bact Alert, que vai permitir uma agitação e incubação simultânea, com monitorização contínua e detecção precoce do crescimento bacteriano. As amostras positivas vão ser trabalhadas em câmara de segurança biológica. É realizado exame corado por Gram e cultural com sementeira de Gelose de Sangue para aeróbios e de Schaedler para anaeróbios, com incubação a 37°C/24 a 48h. A valorização dos resultados tem de ter em consideração os indicadores de contaminação, através da identificação do agente, clínica do doente, número de hemoculturas efectuada e consonância dos resultados, tempo requerido para detecção do agente, quantificação do agente. Os microrganismos mais frequentes são o *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*.

As amostras que não apresentem crescimento durante a incubação no equipamento, são classificadas como estéreis.

Coprocultura

A amostra é colhida em recipiente estéril. O exame cultural é feito em meio de Hektoen, Sabouraud, *Campylobacter* e Selenito. As três placas iniciais ficam na estufa

por 48h, e o meio Selenito de enriquecimento para Salmonella/Shigella é repicado às 24h para novo meio de Hektoen. Os resultados do cultural são observados ao final das 48h.

Quando se observa crescimento em Hektoen suspeito de Salmonella colónias verdes escuras com produção de coloração preta ou Shigella colónias verdes, pode-se realizar o teste da ureia em tubo. Um resultado negativo caracterizado pela coloração amarela, é representativo de Salmonella e implica a identificação e TSA. Este teste permite determinar a presença da enzima urease, utilizada na decomposição de compostos orgânicos. É positivo para agentes como Proteus, Morganella, Providencia, que também podem reduzir o H₂S responsável pela coloração preta no meio de cultura, permitindo assim diferenciá-los da Salmonella/ Shigella. A identificação é feita por carta GN (Gram Negativos) e o TSA com discos de Amoxicilina, Amoxicilina com Clavulâmico e Trimetropim com Sulfametoxazol.

Para a pesquisa de Campylobacter utiliza-se um meio específico, com incubação em microaerofilia a 44°C. A colónia suspeita é pequena e brilhante, para a sua identificação presuntiva realizam-se as provas de Oxidase, Catalase e Gram. A bactéria é oxidase e catalase positiva, bacilo gram negativo curvo e delgado. Se os resultados forem compatíveis com a presença de Campylobacter, faz-se a identificação e TSA.

A pesquisa de Yersinia é feita com meio selectivo, este tem na sua composição manitol e vermelho neutro que permitem a diferenciação das Yersinias pela coloração rosa escuro/vermelho que estas adquirem. A presença de colato, desoxicolato, cristal violeta, Irgasan e antibiótico, inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e negativas.

Pesquisa de sangue oculto

A quantidade de sangue presente nas fezes aumenta com o agravamento da doença que implica lesões hemorrágicas, principalmente associadas com o tracto digestivo inferior. Desta forma a pesquisa de sangue nas fezes é um meio efectivo de detecção precoce e monitorização de doenças digestivas ou intestinais hemorrágicas. O princípio do método baseia-se na utilização de medição óptica através de um analisador automático e uma reacção de aglutinação em látex. O reagente é preparado por sensibilização de Ac anti HbAO em partículas de poliestireno em látex. Quando o reagente é misturado com a amostra, vai reagir com a Hb que esteja presente por ligação ao Ac anti HbAO, resultando uma reacção de aglutinação. O analisador vai depois detectar a variação na densidade óptica e por correlação com uma curva de calibração, apresenta resultados quantitativos.

Exame parasitológico nas fezes

Para concentração de ovos e quistos de parasitas em amostras de fezes, utilizam-se métodos difásicos. O fundamento da técnica baseia-se na separação dos constituintes das fezes, pela acção da emulsão de ácido-éter, dos elementos parasitários, com observação dos mesmos após sedimentação. De um modo geral o método baseia-se na dissolução das gorduras e ácidos gordos por acção do éter e na destruição da matéria orgânica, muco e sais minerais por acção do ácido. A observação microscópica deve ser feita com objectiva de 10* correndo todos os campos da lamela. Para identificação das estruturas faz-se observação a 40*. O sedimento pode ser corado com Lugol para observação das estruturas ao microscópio. Alguns dos parasitas observados foram quistos de *Ascaris lumbricoides*, *Giardia lamblia*, entre outros.

Pesquisa directa de Strepto grupo A (pyogenes)

A colheita é realizada com zaragatoa seca. A pesquisa é feita por teste rápido de aglutinação em placa. Adicionam-se 4 gotas de reagente A (Nitrito de Sódio 4M) com 4 gotas de reagente B (Ácido acético 0.2M), mistura de extracção do Antigénio. A zaragatoa é colocada dentro do tubo, em contacto com a solução durante 1 minuto e depois transfere-se 2 gotas sobre a placa de leitura. Ocorre a eluição sobre o suporte revestido com Ac específicos anti-Streptococcus grupo A e é efectuada a leitura do resultado. O *Streptococcus* do grupo A, beta-hemolíticos é um dos principais responsáveis pela Faringite.

O **Vitek**, equipamento da Biomerieux, permite a identificação de bactérias e leveduras e realização de testes de sensibilidade aos antibióticos mediante a utilização de cartas (cassetes que contêm os reagentes sob a forma liofilizada). O equipamento tem capacidade para incubar várias cartas num carrossel, a temperatura média de 35,5°C, sendo estas submetidas a leituras ópticas a cada 15min. O sistema óptico funciona de forma contínua, utilizando LEDs (Díodos Emissores de Luz) que detectam a luz transmitida a comprimento de onda apropriado. As cartas disponíveis são pequenas placas de plástico compostas por poços que contém substratos bioquímicos liofilizados para reacções de identificação ou concentrações variáveis de antibióticos para teste de sensibilidade.

Os **TSA** (testes de sensibilidade aos antibióticos) podem ser realizados segundo diversas metodologias, sendo as praticadas no laboratório os métodos manuais de Kirby

Bauer, difusão por discos, E-teste e ainda o método automático com cartas Vitek. Os antibióticos a reportar encontram-se de acordo com as regras estabelecidas pela CLSI.

Relativamente aos métodos manuais é importante referir alguns dos antibióticos seleccionados em função do agente patogénico e da origem da amostra.

Para um *Enterococcus* presente na urina o TSA deve ser realizado em Muller Hinton com sangue, tal como para outros microrganismos fastidiosos e devem ser utilizados discos de Amoxicilina, Nitrofurantoina, Ciprofloxacina, Norfloxacina e Tetraciclina.

Para o *Staphylococcus* na urina, devemos utilizar a Amoxicilina, Cefoxitina, Gentamicina, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Trimetoprim com sulfametoxazol.

O teste da Optoquina é semelhante ao anterior, mas neste caso o halo de inibição superior a 15mm indica eventual presença de *Streptococcus pneumoniae*.

A pesquisa de *E. coli* enteropatogénica é feita por identificação serológica. Numa placa coloca-se uma gota de soro aglutinante anti-*E.coli* nonavalente e uma colónia da bactéria suspeita. A aglutinação imediata indica reacção positiva.

Os antifungogramas são realizados segundo o método de Kirby Bauer, difusão por discos a duas concentrações distintas sendo aplicados o 5-Fluorocitosina, Anfotericina B, Miconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol.

No plano de CQI do sector, existem parâmetros controlados com frequência diária/ semanal/ mensal. As principais formas de garantir a qualidade no laboratório de microbiologia é através do controlo das condições de ensaio ou controlo dos pontos críticos, ou através do controlo da execução dos ensaios.

Para realização do CQI são utilizadas estirpes de referência comercial, que são reconstituídas periodicamente e utilizadas para controlar as técnicas ou reagentes de que dispõe a microbiologia. A conservação e reconstituição destas estirpes é feita em conformidade com as exigências do fabricante e varia consoante a sua origem. As estirpes bacterianas são comercializadas na forma liofilizada e devem ser reconstituídas com meio líquido de BHI (Brain Heart Infusion) antes de serem utilizadas. Até à sua utilização os liofilizados devem ser conservados entre 2 a 5 °C ou a -20 °C, dependendo da estirpe em questão.

A biblioteca de estirpes disponíveis cobre as principais exigências impostas pela literatura e pelos fabricantes dos reagentes utilizados.

Adicionalmente, o sistema api NH e os testes serológicos incluem na sua lista de componentes, controlos positivo e negativo que são processados em cada série de testes. O

Colorímetro do equipamento Vitek é controlado periodicamente por uma escala de turvação do próprio fabricante. O equipamento Sysmex UF-1000i é controlado diariamente, sendo as cartas controlo elaboradas automaticamente. A pesquisa de sangue oculto também tem controlo diário com 2 níveis. Diariamente é preparada uma lâmina com estirpes conhecidas de *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, de forma a controlar os exames corados por Gram.

Para monitorizar as condições da Área de Microbiologia, está implementado um programa de Controlo de Qualidade Ambiental. Este controlo cobre várias vertentes, nomeadamente a contagem de patógenos no ar e nas superfícies de trabalho, e a temperatura dentro das estufas e frigoríficos.

A periodicidade do controlo de temperaturas é diária, o controlo ambiental do ar é semanal e o controlo ambiental das superfícies é mensal. Para o controlo do ar, são aleatoriamente colocadas placas de gelose de sangue, durante um intervalo de tempo definido, em pontos chave diferentes. À semelhança, para o controlo de superfícies, placas de Count-Tact são inoculadas por contacto, a pressão e tempo definido, também em pontos chave diferentes. As placas de Count-Tact são muito semelhantes às placas de cultura comum, excepto na forma da placa de Petri. Os bordos da placa são reduzidos, de forma a permitir o contacto directo do meio de cultura com a superfície em estudo. O meio do qual é composto o Count-Tact é polivalente e permite cultivar bactérias, leveduras e bolores. A área média da placa é de 25 cm² o que permite calcular a contagem por 100 cm², permitindo a comparação dos resultados obtidos, com os valores máximos permitidos de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) para um laboratório de Microbiologia.

A placa de Gelose de Sangue é incubada durante 48 horas na estufa a 35 °C e as placas de Count-Tact durante 3 dias a 30 °C. As colónias que se desenvolvem nestes meios são identificadas recorrendo aos sistemas automáticos e manuais.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que deram um pouco do seu tempo de trabalho para contribuir para a minha formação, nomeadamente os responsáveis de cada sector laboratorial, outros especialistas e aos técnicos de análises que constituem as equipas de trabalho do Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

X

Sara Batalha
Farmacêutica