

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
**“GRAVIDEZ E PRÉ-ECLÂMPسيا: DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO”**

Adriana Cristina Ferreira da Graça

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Maria Cristina Crespo Ferreira da  
Silva Marques e coorientado pelo Doutor Luís Manuel Dias Fialho de Moraes.

Mestrado em Análises Clínicas

2021

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
**“GRAVIDEZ E PRÉ-ECLÂMPسيا: DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO”**

Adriana Cristina Ferreira da Graça

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Maria Cristina Crespo Ferreira da  
Silva Marques e coorientado pelo Doutor Luís Manuel Dias Fialho de Moraes.

Mestrado em Análises Clínicas

2021

À minha mãe, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deu durante toda a minha vida e por nunca me deixar desistir.

Ao Sérgio, cuja ajuda, apoio e paciência foram fundamentais.

À minha irmã, pelas palavras de incentivo.

## Agradecimentos

Para a concretização do presente trabalho, contei com a disponibilidade, sabedoria, motivação e orientação de pessoas que assumiram um papel fundamental. Por isso, gostaria de deixar expresso o meu agradecimento:

- À orientadora deste Relatório de Estágio, a Professora Doutora Maria Cristina Crespo Ferreira da Silva Marques, pela sugestão de tema, disponibilidade e orientação.
- Ao coorientador, Doutor Luís Manuel Dias Fialho de Moraes, pela disponibilidade, pela atenção e paciência com que me auxiliou e supervisionou durante todo o estágio curricular e elaboração do relatório.
- Ao Doutor Carlos Cortes, pela oportunidade de integrar a sua equipa de trabalho no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E.: e de poder participar, ainda que em número reduzido devido à pandemia, nas sessões técnico-científicas realizadas.
- Aos Doutores Arminda Gonçalves, Eduarda Campos, Sandra Monteiro, Mohsen Rostami, Ana Nascimento, Rita Coelho e Hélder Alves, por me auxiliarem durante os meses de estágio, transmitindo ensinamentos e motivando através da sua paixão pelo que fazem.
- À Ana Paula Augusto, à Daniela Marques e à Sandra Sá, em representação de toda a equipa, pela ajuda, companheirismo, dedicação, paciência e por tudo o que me ensinaram desde o primeiro dia.
- Aos professores do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela excelência e qualidade técnica de cada um, e com os quais pude absorver o máximo de conhecimento sobre esta área.
- A todos os outros que, por medo da memória me faltar, não foram mencionados anteriormente, mas que contribuíram para a conclusão deste ciclo e de mais uma etapa na vida académica, através do enriquecimento do meu intelecto e despertando a minha capacidade crítica e de resiliência.

A todos o meu sincero e profundo agradecimento.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

## **Sinopse**

O trabalho a seguir apresentado constitui o resultado de dois anos de aprendizagem sobre Análises Clínicas e representa um elemento essencial para a avaliação final do Mestrado em Análises Clínicas, ministrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Este relatório estará dividido em duas partes fundamentais: o Relatório de Estágio e a Monografia. Na primeira parte (Parte I), são descritas todas as aprendizagens adquiridas através da realização do estágio curricular no Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E., que incluem a perceção da dinâmica de um laboratório de análises clínicas em contexto hospitalar, execução de técnicas e metodologias na determinação de parâmetros analíticos, aplicação de conceitos sobre gestão e qualidade laboratorial e também observação da validação biopatológica de resultados nos diferentes setores do laboratório. Na segunda parte (Parte II), é apresentada a Monografia, com o tema “Gravidez e Pré-eclâmpsia: Diagnóstico e Prevenção”, onde são desenvolvidos todos os aspetos relacionados com a evolução desta doença durante a gestação, nomeadamente, a definição e caracterização clínica da doença, a importância do laboratório de análises clínicas no seu diagnóstico precoce e de que forma a mulher grávida pode prevenir complicações prejudiciais para a saúde materno-fetal.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

# Índice Geral

Parte I: Relatório de estágio .....	1
1. Introdução .....	7
2. Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. ....	8
2.1. Serviço de Patologia Clínica .....	9
2.2. Sistema informático do laboratório ( <i>modulab</i> ) .....	10
3. Fase Pré-Analítica .....	11
3.1. Requisição das análises .....	11
3.2. Marcação das análises .....	12
3.2.1. Avaliação da conformidade da requisição .....	12
3.2.2. Preparação do utente .....	12
3.3. Admissão do utente .....	13
3.4. Colheita e identificação da amostra .....	13
3.4.1. Preparação para a colheita .....	13
3.4.2. Material laboratorial utilizado .....	14
3.4.3. Colheita e conservação da amostra .....	15
3.4.4. Segurança .....	27
3.5. Registo da colheita .....	28
3.6. Envio da amostra ao SPC .....	28
3.7. Receção e triagem da amostra no SPC .....	30
3.7.1. Avaliação da conformidade da amostra .....	31
3.7.2. Receção/ponto de controlo .....	32
3.7.3. Tratamento da amostra .....	32
3.7.4. Triagem da amostra .....	34
3.7.5. Envio de amostras para laboratório externo .....	34
4. Fase Analítica .....	36
4.1. Hematologia .....	36
4.1.1. Equipamentos .....	36
4.1.2. Análises Hematologia .....	39
4.1.3. Análises Hemóstase .....	55
4.1.4. Outros testes .....	65
4.1.5. Caso Clínico .....	76
4.2. Microbiologia .....	80
4.2.1. Equipamentos .....	80

4.2.2. Preparação da amostra.....	83
4.2.3. Exame direto .....	84
4.2.4. Exame cultural.....	86
4.2.5. Identificação de microrganismos .....	88
4.2.6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	89
4.2.7. Controlo da Qualidade .....	93
4.2.8. Testes rápidos .....	94
4.2.9. Interpretação dos resultados .....	107
4.3. Bioquímica.....	124
4.3.1. Equipamentos .....	124
4.3.2. Análises Bioquímica .....	126
4.3.3. Fármacos .....	162
4.3.4. Toxicologia.....	172
4.3.5. Outros testes .....	175
4.4. Imunologia .....	180
4.4.1. Equipamentos .....	180
4.4.2. Marcadores Tumorais.....	181
4.4.3. Análises Tiroide .....	190
4.4.4. Análises Endocrinologia .....	197
4.4.5. Análises Imunologia.....	216
4.4.6. Análises Sorologia.....	227
4.4.7. Análises Alergologia .....	238
4.4.8. Outros testes .....	240
5. Fase Pós-Analítica .....	242
5.1. Processamento pós-analítico de amostras biológicas .....	242
5.2. Comunicação/Entrega de resultados .....	243
6. Sistema de Gestão da Qualidade .....	245
6.1. Sistema de Gestão de Qualidade no SPC.....	245
6.2. Controlo da Qualidade Interno (CQI) .....	246
6.3. Controlo da Qualidade Externo (CQE).....	247
Conclusão .....	248
Apêndices .....	249
Parte II: Monografia .....	257
1. Metodologias .....	263
2. Introdução .....	265

3. Definição clínica.....	266
4. Epidemiologia.....	267
5. Fatores de risco.....	268
6. Fisiopatologia .....	270
6.1. Formação da placenta .....	270
6.2. A importância do sistema imunológico .....	275
6.3. Modificações fisiopatológicas na pré-eclâmpsia .....	276
6.3.1. Estadio 1: Placentação anormal.....	276
6.3.2. Estadio 2: Desenvolvimento da síndrome materna .....	279
7. Complicações sistêmicas .....	282
7.1. Complicações perinatais .....	282
7.1.1. Maternas .....	282
7.1.2. Fetais .....	284
7.2. Complicações a longo prazo .....	284
7.2.1. Maternas .....	284
7.2.2. Na prole .....	285
8. Diagnóstico.....	287
8.1. Diagnóstico Laboratorial .....	287
8.1.1. Proteinúria .....	287
8.1.2. Marcadores angiogênicos .....	288
8.1.3. Outros marcadores.....	290
8.2. Diagnóstico clínico .....	291
8.3. Vigilância materno-fetal .....	292
9. Tratamento clínico.....	294
9.1. Parto .....	294
9.2. Terapêuticas utilizadas na clínica .....	295
9.2.1. Terapia pré-natal com corticosteroides .....	296
9.2.2. Terapia anticonvulsivante .....	296
9.2.3. Terapia anti-hipertensiva.....	297
9.3. Novas terapêuticas .....	297
9.3.1. Terapias com fatores pró-angiogênicos.....	297
9.3.2. Terapias baseadas em RNA de interferência <sup>334,335</sup> .....	298
9.3.3. Aférese .....	298
9.3.4. Terapia com antioxidantes .....	299
9.3.5. Terapia com estatinas .....	299

9.3.6. Terapia com antidiabéticos.....	299
10. Prevenção.....	300
Conclusões, limitações e perspectivas futuras .....	303
Referências bibliográficas .....	305

# Índice de abreviaturas

## Parte I: Relatório de estágio

ACJ	Anomalia da Glicemia em Jejum
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADH	Hormona antidiurética
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AFP	$\alpha$ -fetoproteína
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AO	Assistente Operacional
APTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Assistente Técnico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BA	Basófilos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BNP	Péptido natriurético do tipo B
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>
CA	<i>Cancer Antigen</i>
CAMPY	Gelose <i>Campyloset</i>
CAN	Gelose <i>Candida</i>
CEA	Antigénio carcinoembrionário
CHMT	Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E.
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CK	Creatina Quinase
CLED	Gelose <i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMV	Citomegalovírus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

CQE	Controlo da Qualidade Externo
CQI	Controlo da Qualidade Interno
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina
DGS	Direção Geral de Saúde
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr.	Doutor
E.P.E.	Entidade Pública Empresarial
EA	<i>Early Antigen</i>
EBNA	Antigénio nuclear de Epstein-Barr
EBV	Vírus de Epstein-Barr
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMIT	<i>Enzyme Multiplied Immunoassay Technique</i>
EO	Eosinófilos
ERT	Eritrócitos
ESBL	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i> ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido)
FSH	Hormona folículo-estimulante
FVW	Fator de von Willebrand
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GDH	Desidrogenase de glutamato
GH	Hormona do crescimento
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropina
GOT	Glutamato Oxaloacetato Transaminase
GPT	Glutamato Piruvato Transaminase
GRF	Fator de libertação da somatotrofina
GS	Gelose de Sangue
HAE	Gelose seletiva para bactérias do género <i>Haemophilus</i>
Hb ou HBG	Hemoglobina
hCG	Gonadotropina Coriónica humana
HCl	Ácido clorídrico

HCT	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEKT	Gelose <i>Hektoen</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Complexo do antígeno leucocitário humano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSV	Vírus Herpes <i>simplex</i>
IAA	Anticorpo anti-insulina
IFA	<i>ImmunoFluorescent Assay</i>
Ig	Imunoglobulina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormona Luteinizante
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LY	Linfócitos
MAC	Gelose <i>MacConkey</i>
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MHC	Complemento de histocompatibilidade
MO	Monócitos
MPC	Médico especialista em Patologia Clínica
MRSA	Meio para a deteção de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NE	Neutrófilos
NK	<i>Natural killer</i>
nmPCR	Reação em Cadeia da Polimerase <i>multiplex nested</i>
NSE	Enolase específica do neurónio

O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PCT	Plaquetócrito
PDW	<i>Platelet Distribution Width</i>
P-LCR	<i>Platelet Large Cell Ratio</i>
PLT	Plaquetas
PLT-F	Método de fluorescência para determinação das plaquetas
PLT-I	Método de impedância para determinação das plaquetas
PLT-O	Método ótico para determinação das plaquetas
PO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
PSA	Antigênio específico da próstata
PTH	Paratormona
PTOG	Prova de Tolerância Oral à Glucose
PVX	Gelose de chocolate enriquecida com <i>PolyViteX</i>
RBC	Eritrócitos
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RET	Reticulócitos
RET#	Contagem de reticulócitos
RET%	Rácio de reticulócitos
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Real Time Polimerase Chain Reaction</i>
S.A.	Sociedade Anónima
SAB	Gelose de Sabouraud com cloranfenicol
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SCC	Carcinoma de células escamosas
SCCA	Antigênio do carcinoma das células escamosas
SFL	Luz fluorescente detetada lateralmente
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
SHBG	Globulina de ligação de hormonas sexuais
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLS	Laurissulfato de sódio

SONHO	Sistema integrado de informação hospitalar
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SSC	Luz dispersa para o lado
STRB	Meio para o rastreio de <i>Streptococcus</i> do grupo B
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAG	Triglicéridos
TASO	Anticorpo anti-estreptolisina-O
TDG	Tolerância Diminuída à Glucose
TGB	Globulina de ligação de tiroxina
TP	Tempo de Protrombina
TPOAb	Anticorpo anti-peroxidase tiroideia
TRAb	Anticorpo anti-recetor da tirotropina
TRH	Hormona libertadora de tirotropina
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSDT	Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica e Técnico superior do regime geral
TSH	Hormona estimulante da tiroide ou tirotropina
TSS	Técnico Superior de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VCA	Antigénios virais da cápside
VCAT	Gelose chocolate com vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
VZV	Vírus <i>Varicella zoster</i>
WBC	Leucócitos
$\gamma$ -GT	Gama-glutamilttransferase

## Parte II: Monografia

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT1-AA	Autoanticorpo do recetor I da angiotensina II
AVC	Acidente Vascular Cerebral
DCV	Doença Cardiovascular
DSA	Dextrassulfano
HbF	Hemoglobina fetal
hCG	Gonadotropina Coriónica humana
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count</i>
HLA	Complexo do antígeno leucocitário humano
HO	Hemoxigenase
HO1	Isoforma induzível da hemoxigenase
HO2	Isoforma constitutiva da hemoxigenase
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INF $\gamma$	Interferão gama
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M-CSF	Fator estimulador de colónias dos monócitos
MHC	Complemento de histocompatibilidade
NICE	<i>National Institute for Health and Care Excellence</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIFG	Fator de crescimento placentário ( <i>Placental Growth Factor</i> )
PRES	Síndrome de Encefalopatia Posterior Reversível
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rPIFG	Fator de crescimento placentário recombinante
sEndoglina	Endoglina solúvel

sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosin kinase 1</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Tissue growth factor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

Esta página foi deixada propositadamente em branco

# Índice de símbolos

## Parte I: Relatório de estágio

G	<i>Birmingham Wire Gauge</i>
ml	Mililitro
cm	Centímetro
°	Grau
°C	Grau Celsius
%	Percentagem
g	Unidade de aceleração não-Sistema Internacional definida como exatamente 9,80665 m/s <sup>2</sup>
min	Minuto
μl	Micro litro
fl	Fentolitro
pg	Picograma
L	Litro
UI	Unidade Internacional
g	Gramma
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mg	Miligrama
dl	Decilitro
ng	Nanograma
M	Molaridade ou concentração molar
kg	Quilograma
nm	Nanómetro
mmol	Milimol

## Parte II: Monografia

mmHg	Milímetro de mercúrio
mg	Miligrama
cm	Centímetro
%	Porcentagem
kg	Quilograma
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
g	Gramma
μl	Microlitro
dl	Decilitro

## Índice de figuras

Figura 1: Área de abrangência do CHMT. ....	8
Figura 2: Logotipo do programa de gestão de laboratórios, <i>modulab</i> . ....	10
Figura 3: Sistema de colheita constituído por corpo de extração e tubo de colheita. ....	14
Figura 4: Método de aplicação da fita adesiva para pesquisa de oxiúros. ....	19
Figura 5: <i>AutoMate™ 2550</i> da <i>BECKMAN COULTER</i> . ....	34
Figura 6: <i>XN-1000</i> da <i>SYSMEX</i> . ....	37
Figura 7: <i>TEST 1 - THL</i> da <i>ALIFAX</i> . ....	37
Figura 8: <i>ADAMS A1c HA-8160</i> da <i>ARKRAY</i> . ....	37
Figura 9: <i>RAL STAINER</i> da <i>RAL DIAGNOSTICS</i> . ....	38
Figura 10: <i>ACL TOP® 300 (A)</i> e <i>ACL TOP® 500 (B)</i> da <i>WERFEN</i> . ....	38
Figura 11: Citómetro de fluxo <i>FACSCalibur</i> da <i>BD DIAGNOSTICS</i> . ....	38
Figura 12: Equipamento <i>HYDRASYS®</i> da <i>SEBIA</i> . ....	39
Figura 13: Diagrama bidimensional SFL em função de SSC. ....	46
Figura 14: Cascata da coagulação. ....	56
Figura 15: Resultado negativo obtido no teste de solubilidade à HbS. ....	68
Figura 16: Cromatograma obtido no equipamento <i>ADAMS HA-8160</i> da <i>ARKRAY</i> . ....	71
Figura 17: Hemograma do caso em estudo, obtido através da análise de sangue total no equipamento <i>XN-1000</i> da <i>SYSMEX</i> . ....	76
Figura 18: Eletroforese das hemoglobinas realizada no dia 16 de junho de 2020, no equipamento <i>HYDRASYS®</i> da <i>SEBIA</i> . ....	77
Figura 19: Perfil eletroforético obtido após scanner do gel de migração das hemoglobinas e respetivo comentário realizado pelo MPC/TSS. ....	77
Figura 20: Resultados do doseamento das hemoglobinas realizado no equipamento <i>ADAMS HA-8160</i> da <i>ARKRAY</i> . ....	77
Figura 21: Teste de solubilidade à HbS. ....	78
Figura 22: Equipamento <i>FilmArray®</i> da <i>BIOFIRE – BIOMÉRIEUX</i> . ....	80
Figura 23: <i>GeneXpert®</i> da <i>CEPHEID</i> . ....	80
Figura 24: Equipamento <i>VITEK® 2</i> da <i>BIOMÉRIEUX</i> . ....	81
Figura 25: Equipamento <i>MALDI-TOF microflex LT</i> da <i>BRUKER</i> . ....	81
Figura 26: <i>BACTEC™ 9120™</i> da <i>BD DIAGNOSTICS</i> . ....	81
Figura 27: <i>Aerospray® Gram Series 2</i> da <i>ELITECHGROUP</i> . ....	82

Figura 28: <i>PolyStainer</i> da <i>IUL INSTRUMENTS</i> .....	82
Figura 29: Algoritmo de diagnóstico laboratorial de <i>Clostridium difficile</i> .....	101
Figura 30: <i>DxC 700 AU</i> da <i>BECKMAN COULTER</i> .....	124
Figura 31: <i>UniCel DxI</i> da <i>BECKMAN COULTER</i> .....	124
Figura 32: Equipamento <i>Access 2</i> da <i>BECKMAN COULTER</i> .....	125
Figura 33: <i>VIDAS®</i> da <i>BIOMÉRIEUX</i> .....	125
Figura 34: <i>GEM® Premier™ 3000</i> da <i>WERFEN</i> .....	125
Figura 35: <i>Multi-Drug One Step Multi-line Screen Test Device (urina)</i> realizado durante o estágio.....	174
Figura 36: Equipamento <i>IMAGE® 800</i> da <i>BECKMN COULTER</i> .....	180
Figura 37: Equipamento <i>MAGLUMI® 800</i> da <i>SNIBE DIAGNOSTICS</i> .....	180
Figura 38: Equipamento <i>Phadia® 250</i> da <i>THERMOFISHER SCIENTIFIC</i> .....	181
Figura 39: Formação da placenta - implantação do blastocisto e invasão trofoblástica. ....	271
Figura 40: Estrutura da placenta madura.....	275

## Índice de tabelas

Tabela 1: Descrição, conteúdo e cor da tampa dos tubos utilizados para colheita. ....	15
Tabela 2: Quadro resumo dos valores específicos para a força centrífuga relativa (FCR) em g, velocidade de centrifugação em rotações por minuto (rpm) e tempo de centrifugação em minutos, indicados para o processamento de amostras biológicas.....	33
Tabela 3: Estirpes ATCC utilizadas para controlo da qualidade interno no setor de Microbiologia.....	93
Tabela 4: Interpretação dos resultados do ensaio <i>Xpert® C. difficile BT</i> . ....	102
Tabela 5: Microrganismos identificados através do <i>FilmArray® Gastrointestinal Panel</i> . ....	104
Tabela 6: Microrganismos identificados pelo <i>FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel</i> ...	104
Tabela 7: Vírus e bactérias identificados através do <i>FilmArray® Respiratory Panel 2 plus</i> .	105
Tabela 8: Microrganismos e genes de resistência identificados através do <i>FilmArray® Blood Culture Identification Panel</i> .....	105
Tabela 9: Agentes etiológicos de meningite consoante a idade ou condição do indivíduo infetado.....	111
Tabela 10: Membranas serosas e respetivos fluídos serosos.....	112
Tabela 11: Intervalos de referência para os níveis de risco de doença cardiovascular. ....	145
Tabela 12: Níveis de álcool no sangue e consequentes complicações em indivíduos consumidores esporádicos ou consumidores crónicos. ....	173
Tabela 13: Critérios de classificação de anomalias no metabolismo dos hidratos de carbono, segundo a OMS e DGS. ....	176
Tabela 14: Critérios de diagnóstico de diabetes gestacional.....	177
Tabela 15: As principais frações do perfil eletroforético e proteínas séricas que migram em cada uma delas.....	217
Tabela 16: Interpretação clínica dos resultados sorológicos para EBV. ....	234
Tabela 17: Testes IgG específicos realizados no CHMT. ....	239
Tabela 18: Período de armazenamento de amostras biológicas de acordo com o setor de processamento. ....	242
Tabela 19: Resultados críticos.....	244
Tabela 20: Material de colheita de produtos biológicos utilizados no CHMT. ....	249
Tabela 21: Descrição dos meios de cultura utilizados no CHMT.....	251

Tabela 22: Antimicrobianos em disco usados para TSA manual no setor de Microbiologia do CHMT. ....	253
Tabela 23: Testes <i>ImmunoCAP</i> <sup>®</sup> para detecção de anticorpos IgE específicos realizados no CHMT. ....	255
Tabela 24: Complicações perinatais da pré-eclâmpsia. ....	283

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



## **Parte I: Relatório de estágio**



Coorientador: Doutor Luís Manuel Dias Fialho de Morais.

Mestrado em Análises Clínicas



## **Resumo**

A primeira parte deste trabalho, o Relatório de Estágio, é o resultado do estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. (CHMT), que teve a duração de novecentas e setenta horas. Neste relatório serão descritas todas as fases do processo analítico (Fase Pré-Analítica, Fase Analítica e Fase Pós-Analítica) e o modo como cada uma decorre no local do estágio.

A Fase Pré-Analítica começa com a requisição das análises por parte do clínico e a avaliação da conformidade da requisição por parte do assistente técnico, que efetua o registo do utente no sistema informático do laboratório. Neste capítulo serão ainda abordados o modo de preparação do utente para cada tipo de análise e o modo como se efetua a colheita dos vários tipos de produtos biológicos. Esta fase termina com a receção das amostras no laboratório e a sua triagem para os respetivos setores analíticos.

Na Fase Analítica são abordadas e descritas todas as análises e técnicas de análise realizadas nos diferentes setores do Serviço de Patologia Clínica (Hematologia, Microbiologia e Imunoquímica [Bioquímica e Imunologia]). Para cada análise realizada serão descritos o tipo de amostra utilizada, a metodologia, as limitações/interferências e a interpretação clínica em casos de resultados fora dos intervalos de referência.

A Fase Pós-Analítica compreende o processamento das amostras depois da sua análise, mas também a entrega de resultados ao clínico. Neste capítulo serão descritos o modo e duração do armazenamento das amostras analisadas e as diferentes formas de comunicação de resultados, críticos ou não, ao clínico.

O último capítulo deste relatório será um capítulo dedicado ao Sistema de Gestão da Qualidade, onde serão descritas todas as formas de controlo da qualidade adotadas pelo laboratório, como por exemplo, o controlo da qualidade interno dos respetivos setores analíticos, mas também a participação do mesmo em programas de avaliação externa da qualidade. Este capítulo torna-se fundamental para entender como funciona um laboratório certificado e como se torna importante ter um Sistema de Gestão da Qualidade controlado para que os serviços de análises clínicas prestados no Centro Hospitalar sejam efetuados com a máxima qualidade possível.

**Palavras-chave:** Análises, Patologia, CHMT, Qualidade



## **Abstract**

The first part of this Internship Report is relative to the curricular internship completed at the Clinical Pathology Service of Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. (CHMT), for the duration of nine hundred and seventy hours. We shall describe every phase of the testing process (Pre-Analytical Phase, Analytical Phase and Post-Analytical Phase) and the way in which each phase takes place at this specific internship location.

The Pre-Analytical Phase begins with an analysis requisition issued by the practitioner and a subsequent conformity assessment of that same requisition by a technical assistant who then registers the user in the laboratory computer system. In this chapter, we shall discuss the user preparation methods employed for each analysis typology and how the various sorts of biological products are harvested. This phase is concluded by receiving the samples at the laboratory and their assortment for subsequent distribution to each designated analytical sector.

In the Analytical Phase, all analysis and analysis techniques performed in the different sectors of the Clinical Pathology Service (Hematology, Microbiology and Immunochemistry [Biochemistry and Immunology]) are addressed and described. For each analysis performed, the sample type used, the methodology, the limitations / interferences and the clinical interpretation in cases of results outside the reference ranges will be described.

The Post-Analytical Phase is comprised of sample processing after analysis as well as the delivery of results to the practitioner. In this chapter, the process and duration of storage of the analyzed samples as well as the different ways of communicating results to the practitioner, critical or not, will be described.

The last chapter of this report will regard to the Quality Management System, where all forms of quality control adopted by the laboratory will be described, for example, the internal quality control of each individual analytical sector as well as their role in external quality assessment programs. This chapter is essential to understand the manner in which a certified laboratory works and the importance of having a controlled Quality Management System so that the clinical analysis services provided within the Hospital Center are carried out with the highest possible quality.

**Keywords:** Analysis, Pathology, CHMT, Quality



# 1. Introdução

O plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa contempla um estágio curricular, o qual será descrito no presente relatório. Este estágio constitui o espaço adequado de aplicação dos conhecimentos ministrados ao longo da componente curricular, onde o mestrando adquire a capacidade de conduzir corretamente a análise de um determinado produto biológico por forma a obter resultados exatos e, conseqüentemente, fiáveis. Foram traçados, portanto, os seguintes objetivos:

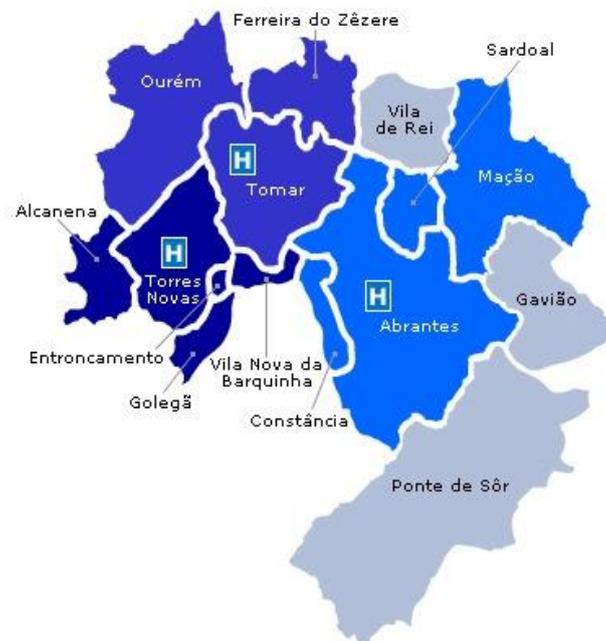
- Aplicar as técnicas de colheita adequadas a cada determinação;
- Identificar problemas e apresentar soluções;
- Aplicar os conhecimentos relacionados com a planificação e organização das atividades diárias do laboratório de Análises Clínicas;
- Integrar os conhecimentos ministrados ao longo da formação teórica;
- Adquirir capacidade crítica e de autocrítica no âmbito da atividade profissional das Análises Clínicas;
- Demonstrar capacidade para exercer a atividade em equipas multidisciplinares;
- Adquirir conhecimentos que permitam a compreensão e aplicação dos princípios do controlo e garantia da qualidade;
- Adquirir capacidade para desenvolver trabalho autónomo associado ao diagnóstico laboratorial;
- Promover o contacto com os doentes aplicando princípios éticos e deontológicos.

Para a realização deste estágio foi escolhido o Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. (CHMT) por ser constituído por várias Unidades Hospitalares. Tal facto, possibilitou o acompanhamento da atividade de um laboratório de maior dimensão num contexto, tanto de rotina, como de urgência (prestação de cuidados de saúde durante vinte e quatro horas). Com a realização do estágio no laboratório central do CHMT, em Tomar, foi possível a passagem pelas valências: Fase Pré-Analítica, Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. Deste modo, o estágio teve a duração de aproximadamente novecentas e setenta horas e foi orientado pelo Doutor Luís Morais, Farmacêutico Assessor Sénior no CHMT.

## 2. Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E.

O CHMT é constituído por três Unidades Hospitalares, sendo elas o Hospital Doutor Manoel Constâncio, em Abrantes, o Hospital Nossa Senhora da Graça, em Tomar, e o Hospital Rainha Santa Isabel, em Torres Novas<sup>1</sup>.

Este centro hospitalar foi criado através do Decreto-Lei nº 93/2005, de 7 de junho, que transformou as Sociedades Anónimas (S.A.) em Entidades Públicas Empresariais (E.P.E.) e, atualmente, a sua área de abrangência contempla uma população de mais de 265 mil habitantes, distribuídos por cerca de quinze concelhos do distrito de Santarém<sup>2</sup>.



*Figura 1: Área de abrangência do CHMT.*

Fonte: Plano de Prevenção de Riscos de Gestão – Revisão 3<sup>3</sup>.

O CHMT pretende ser reconhecido como um Centro Hospitalar de referência na prestação de cuidados de saúde à população por ele abrangida, com especialidades diferenciadas, apostando no desenvolvimento de serviços eficientes e inovadores com uma gestão adequada dos recursos, sempre com o objetivo do tratamento e da reabilitação, em tempo clinicamente adequado, dos doentes, em condições ótimas de qualidade e humanidade dos serviços prestados, de modo a atingir a satisfação dos mesmos<sup>1</sup>.

É importante referir ainda que o CHMT se rege pelo princípio de acesso ao Serviço Nacional de Saúde, de acordo com as regras de organização e as redes de cuidados de saúde<sup>4</sup>.

## 2.1. Serviço de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) do CHMT está inserido no departamento de meios de diagnóstico e terapêutica e tem um papel fundamental no diagnóstico e na orientação terapêutica dos doentes deste Centro Hospitalar. Este serviço tem como diretor o Dr. Carlos Cortes e a sua missão é<sup>5</sup>:

- Colaborar com os Serviços Clínicos e com as Unidades de Saúde externas que o solicitem;
- Fornecer resultados analíticos requisitados pelo médico;
- Colher produtos biológicos e processar amostras;
- Dar apoio e aconselhar, técnica e cientificamente, os Serviços Clínicos na orientação diagnóstica e terapêutica.

O SPC está dividido em três laboratórios, sendo que cada um deles está sediado numa Unidade Hospitalar do CHMT. Tendo em conta as valências realizadas em cada um destes laboratórios, a sua divisão é feita do seguinte modo<sup>5</sup>:

- Atendimento ao público;
- Colheitas de produtos biológicos;
- Receção de produtos biológicos;
- Processamento analítico;
- Validação de resultados.

Assim, o Laboratório Central está sediado em Tomar, e engloba os seguintes setores: Hematologia; Imunoquímica (Bioquímica e Imunologia); Microbiologia; colheitas de produtos biológicos e envio de resultados analíticos e Consulta de Hipocoagulação Oral. Por outro lado, os laboratórios das Unidades Hospitalares de Torres Novas e Abrantes, de menores dimensões, apenas realizam colheitas de produtos biológicos e fazem a receção e o processamento de amostras urgentes provenientes dos Serviços Clínicos do respetivo hospital, assim como o envio de resultados analíticos e a Consulta de Hipocoagulação Oral.

Para que todos estes processos estejam a funcionar, o SPC é dotado de profissionais com competências específicas na vertente laboratorial, técnica e analítica, sendo composto por uma equipa interdisciplinar de Médicos especialistas em Patologia Clínica (MPC), Técnicos Superiores de Saúde (TSS), Técnicos Superiores do Regime Geral, Técnicos de Diagnóstico e

Terapêutica - Ramo de Análises Clínica e Saúde Pública (TSDT), Assistentes Operacionais (AO) e Assistentes Técnicos (AT)<sup>5</sup>.

## 2.2. Sistema informático do laboratório (*modulab*)

O *modulab* é um programa de gestão de laboratórios da empresa *WERFEN*. Este programa foi pensado para proporcionar a melhoria contínua da qualidade e rapidez dos serviços, tanto em hospitais, como em laboratórios de análises clínicas, pois para além de garantir o acesso seguro à informação laboratorial a todo o momento e em qualquer lugar, também une todas as fases do processo de gestão num só programa (desde as solicitações analíticas até à emissão dos resultados)<sup>6</sup>.



Figura 2: Logotipo do programa de gestão de laboratórios, *modulab*.  
Fonte: Modulab | Werfen em Portugal<sup>6</sup>.

A junção deste sistema de gestão com os sistemas pré-analíticos e analíticos robotizados, através da capacidade de integração e conectividade do *modulab* com qualquer outro sistema de informação e com os diferentes equipamentos do laboratório, traz uma mais valia à realização dos processos de forma eletrónica, o que resulta no aumento da produtividade e eficiência do laboratório, assim como, a minimização de erros grosseiros de cariz humano, proporcionando um aumento da qualidade assistencial ao utente<sup>6</sup>.

### 3. Fase Pré-Analítica

O laboratório fornece informação crucial para o diagnóstico e tratamento de doenças suspeitas, bem como monitorização de doenças já confirmadas. No entanto, só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas de informação clínica pertinente e informação da terapêutica em curso<sup>7</sup>. Deste modo, é essencial que toda a fase pré-analítica, desde a requisição da análise até à triagem da amostra para o devido setor analítico, decorra sem interferentes que possam levar a erros.

Neste capítulo serão descritas todas as fases do processo para a realização de uma análise laboratorial, desde a requisição da análise, por parte do médico, até à colheita e, finalmente, a passagem da amostra na receção do SPC de modo a que seja feita a sua triagem para o respetivo setor analítico.

#### 3.1. Requisição das análises

As análises são requisitadas pelos médicos do CHMT, em internamento, ambulatório, consulta externa ou urgência<sup>8</sup>, ou por médicos externos<sup>9</sup>.

Caso a requisição seja interna, é efetuada no Sistema Integrado de Informação Hospitalar (SONHO), ou seja, no sistema informático do hospital ou, diretamente, no sistema informático do laboratório, o *modulab*<sup>9</sup>, conforme o funcionamento do serviço. É de salientar que, no serviço de urgência, as etiquetas que vêm são as do SONHO, portanto, sempre que possível, as requisições devem chegar ao laboratório para serem registadas no seu sistema informático, com o objetivo de se utilizar apenas as etiquetas do *modulab*<sup>8</sup>. Em relação aos restantes serviços, os recipientes/tubos de amostra vêm devidamente etiquetados do serviço requisitante, isto é, com as etiquetas utilizadas no laboratório.

Se a requisição da análise é externa, esta deve vir em papel e ser entregue no SPC, pelo utente, no momento da marcação das análises<sup>9</sup>.

## 3.2. Marcação das análises

A marcação das análises é feita pelo AT aquando da receção da requisição dos utentes externos. Esta marcação é feita através do registo do utente no SONHO e no *modulab*. No mesmo momento, o AT deve proceder à avaliação da conformidade da requisição assim como informar o utente de como se deve preparar para a colheita, de acordo com as especificidades das análises requisitadas<sup>9</sup>.

### 3.2.1. Avaliação da conformidade da requisição

O AT é então responsável por, durante o seu período de trabalho, verificar se a requisição vem conforme. No entanto, fora desse período e apenas nos casos de utentes internos, esta função passa a ser do TSDT.

Se a requisição se encontra não conforme, o médico prescriptor deve ser contactado para que possa proceder à retificação da mesma<sup>8</sup>, e deve ser registado no *modulab* que a requisição se encontrava não conforme<sup>10</sup>.

Assim, rejeita-se a requisição se um dos critérios abaixo estiver presente<sup>10</sup>:

- Preenchimento incorreto da requisição;
- Requisição em impressos não controlados ou obsoletos;
- Requisição rasurada ou alterada.

### 3.2.2. Preparação do utente

Os parâmetros biológicos a determinar em laboratório são influenciados por múltiplos fatores e sofrem variações fisiológicas ao longo do dia e/ou em função do estado de repouso, atividade física, postura, ingestão de alimentos ou inalação de fumo. Por conseguinte, a colheita de amostras biológicas para análise deve ser efetuada em condições padronizadas e, para que isso aconteça, o utente deve cumprir alguns requisitos analíticos como, por exemplo, o jejum ou dieta prévia<sup>7</sup>. No caso de determinações do perfil lipídico, o utente deverá ser alertado para que seja feito um jejum de cerca de dez a catorze horas, enquanto que, uma colheita de sangue, para outras determinações, é suficiente um jejum de oito a dez horas<sup>7</sup>.

É também essencial ter uma conversa com o utente de forma a avaliar e eliminar possíveis causas de interferência nos resultados analíticos. Portanto, para que a preparação do

mesmo para a colheita seja mais eficiente, na altura da marcação das análises, o AT deve transmitir as condições de preparação a serem cumpridas<sup>7</sup>.

Se a colheita é para ser feita em ambulatório, deve também ser entregue ao utente o recipiente/contentor ou o *kit* apropriado para a colheita, juntamente com o respetivo procedimento escrito, em função do exame a realizar. Nessa ocasião, o utente deve ainda ser alertado para a boa utilização do recipiente/contentor e ser informado da importância de apenas o abrir na altura da colheita, de modo a não verter ou sujar/conspurcar o exterior<sup>11</sup>. É de referir ainda que as colheitas feitas em ambulatório devem ser realizadas, preferencialmente, entre as sete e as oito horas da manhã, ou seja, logo após levantar e que, para realização de análises microbiológicas, as colheitas devem ser efetuadas, sempre que possível, antes de qualquer antibioterapia.

### **3.3. Admissão do utente**

O AT efetiva a marcação do utente e, no dia da colheita, realiza a sua admissão<sup>9</sup>.

### **3.4. Colheita e identificação da amostra**

A colheita da amostra biológica pode ser realizada em dois sítios distintos, na sala de colheitas da Unidade Hospitalar ou em ambulatório.

No dia marcado para a realização das análises o utente é chamado à sala de colheitas por ordem de chegada ou por prioridade.

#### **3.4.1. Preparação para a colheita**

Antes de iniciar a colheita o TSDT deve verificar as seguintes condições<sup>7</sup>:

- Requisição devidamente preenchida pelo médico, ou registada previamente pelo AT, com informação clínica relevante, terapêutica em curso ou outras informações relevantes;
- Identificação do utente, perguntando o nome e verificando a idade e o género<sup>9</sup>. Se o utente for colaborante, deve ser ele a responder, se não for colaborante

solicitar a identificação do mesmo ao seu acompanhante, de forma a verificar se está de acordo com a identificação da requisição<sup>12</sup>;

- Preparação do utente, questionando se esta foi bem feita, nomeadamente, o jejum, a dieta e outras restrições;
- Escolha do recipiente apropriado para a amostra, tendo em conta o volume necessário assim como eventuais aditivos (anticoagulantes ou outros reagentes que sejam necessários);
- Identificação dos tubos/recipientes, a qual deve ser feita antes da colheita para minimizar eventuais erros grosseiros por má etiquetagem. Esta identificação é feita com as etiquetas do *modulab* tendo em atenção o seu correto posicionamento no recipiente de colheita<sup>9</sup>.

### 3.4.2. Material laboratorial utilizado

O material laboratorial utilizado para efetuar a colheita e o acondicionamento das amostras depende das análises solicitadas. O material apresentado a seguir é utilizado pelo SPC do CHMT, bem como por todos os serviços que lhe enviem amostras biológicas:

#### Material de colheita de sangue venoso

O material de colheita de sangue venoso utilizado no CHMT é formado pelo corpo de extração e pelos tubos de colheita.

O corpo de extração é constituído por agulha e adaptador. As agulhas usadas têm um calibre entre 20 G a 23 G, o qual deverá ser escolhido de acordo com o calibre da veia a puncionar, e são revestidas por um mecanismo de segurança. Podem ainda ser usados como corpos de extração o mecanismo *Butterfly*, para veias de menor calibre, como mostra a Figura 3.



Figura 3: Sistema de colheita constituído por corpo de extração e tubo de colheita.

À direita encontra-se o corpo de extração designado de *Butterfly*.

Fonte: Sarstedt<sup>13</sup>.

Os tubos de colheita são tubos adequados à colheita e transporte de amostras para determinações em soro, plasma e sangue total<sup>7</sup>. Estes tubos possuem cores diferentes consoante o seu conteúdo e utilização, como é demonstrado na tabela seguinte.

*Tabela 1:* Descrição, conteúdo e cor da tampa dos tubos utilizados para colheita.

Cor da tampa		Conteúdo	Descrição
Castanha-amarelada		Serum Gel	Tubo com gel separador e ativador da coagulação para obtenção de soro. Utilização: Bioquímica e Imunologia
Verde		Citrato	Tubo com citrato de sódio para testes realizados em plasma. Utilização: Coagulação/Hemóstase
Laranja		Heparina	Tubo com heparina de lítio para determinações em sangue total ou plasma. Utilização: Bioquímica
Vermelha		EDTA	Tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para testes em sangue total e/ou plasma. Utilização: Hematologia

### Outro material

Existem ainda outros recipientes para colheita e transporte de amostras biológicas que se encontram discriminados em detalhe no Apêndice I. O recipiente de colheita deve estar sempre corretamente identificado, com o nome do utente, número de processo, natureza do produto, data e hora da colheita<sup>7</sup>.

### 3.4.3. Colheita e conservação da amostra

A qualidade da amostra para análise depende sobretudo de como é realizada a sua colheita, assim como da sua conservação até ao processamento, pelo que é fundamental que todo este processo seja feito, na medida do possível, da mesma forma. Ao padronizar alguns dos passos deste processo é possível evitar erros que possam surgir daí e, assim, garantir que as amostras que chegam ao laboratório foram sujeitas a um processo de colheita semelhante. Para que isso aconteça, o SPC do CHMT dispõe de, para além do Manual de Colheitas, alguns Protocolos e Instruções de Trabalho que referem os métodos de colheita de todas as amostras que chegam ao laboratório para análise<sup>9</sup>.

Contudo, caso a amostra seja para análise em laboratório externo, a sua colheita deve respeitar as indicações do Manual de Colheitas do respetivo laboratório<sup>9</sup>.

## COLHEITA EM AMBULATÓRIO

Algumas amostras biológicas podem ser colhidas noutros locais, que não a Unidade Hospitalar, de forma a permitir um maior conforto e privacidade ao utente na hora da colheita. No entanto, é importante que este siga rigorosamente as instruções de colheita e conservação da amostra até que esta seja entregue ao laboratório.

Os tipos de colheita que poderão ser realizados em ambulatório, assim como, as instruções que devem ser dadas para a realização das mesmas serão descritos de seguida.

### Colheita de urina

- Urina ocasional/aleatória

O utente deve colher, de preferência, a primeira urina da manhã, pois geralmente é a mais concentrada e com o pH mais baixo, o que permite uma melhor observação dos elementos celulares. No entanto, se isto não for possível, deverá ser colhida a urina após ter estado duas horas sem urinar<sup>11</sup>. Esta colheita deve ser feita para contentor/copo adequado e enviada rapidamente ao laboratório, no entanto, caso isso não seja possível, a amostra deverá ser refrigerada e processada até vinte e quatro horas após a colheita<sup>7</sup>.

- Urina a tempo determinado (três, doze ou vinte e quatro horas)

Para a colheita de urina a tempo determinado o utente deverá iniciar a recolha com a bexiga vazia e terminá-la do mesmo modo, ou seja, o utente deverá esvaziar completamente a bexiga antes de iniciar a colheita e anotar a hora. A partir daí, o utente deve urinar para o recipiente fornecido, de modo a guardar toda a urina até completar três, doze ou vinte e quatro horas desde que iniciou a contagem. O recipiente com amostra deve ser conservado no frigorífico ou em local seco e fresco durante o período de colheita e a entrega ao laboratório deve ser feita imediatamente após o seu término<sup>11</sup>.

De referir ainda que, a refrigeração é o processo de conservação de eleição, no entanto, quando este não é possível, pode recorrer-se ao uso de conservantes químicos, tendo em conta que o tipo de conservante a utilizar, depende da substância que vai ser analisada e da metodologia empregue. De um modo geral, os conservantes químicos atuam como antibacterianos e antimicóticos<sup>7</sup>. No entanto, não se poderá recorrer ao uso destes conservantes quando a urina de vinte e quatro horas for necessária para determinações quantitativas de creatinina e proteínas, pelo que a amostra deverá ser mantida refrigerada durante o período de colheita. No CHMT existe um Protocolo que se deve consultar para saber qual o aditivo a adicionar ao recipiente de urina para cada determinação<sup>7</sup>.

- Urina asséptica

O utente deve colher a primeira urina da manhã para recipiente apropriado fornecido pelo laboratório. Se isso não for possível, deverá aguardar pelo menos três horas, após a última micção, antes de fazer a colheita<sup>14</sup>. Esta só deve ser feita em condições de assepsia pelo que o utente, antes de urinar, deverá lavar muito bem as mãos e os órgãos genitais com água e sabão, enxaguando abundantemente com água<sup>7</sup>. No caso das mulheres é importante que a lavagem seja efetuada sempre de frente para trás de modo a evitar contaminações. No caso do homem, este deverá afastar o prepúcio e lavar a glândula também com água e sabão<sup>14</sup>. Finalizada a lavagem, começar logo a colheita, de modo a não tocar no interior nem na tampa do recipiente. A primeira parte da urina não deve ser aproveitada e a colheita deverá ser feita diretamente para o recipiente<sup>7</sup>. Neste passo é importante que a mulher afaste os grandes lábios e mantenha essa posição durante todo o procedimento e, do mesmo modo, o homem deverá manter afastado o prepúcio<sup>14</sup>. A parte final da urina também não deverá ser aproveitada pelo que poderá ser descartada e, finalizada a colheita, o recipiente deverá ser imediatamente tapado<sup>7</sup>.

A entrega ao laboratório deve ser feita de imediato ou até, no máximo, duas horas após a colheita<sup>11</sup>. Caso isso não seja possível, a urina deve ser mantida refrigerada até ao seu envio<sup>14</sup>.

No caso de colheita de urina asséptica para pesquisa de micobactérias são necessárias três amostras, realizadas em três dias consecutivos, para diferentes recipientes. As amostras devem estar corretamente identificadas com a ordem de colheita e devem ser mantidas refrigeradas até à sua entrega<sup>11</sup>.

- Urina para pesquisa de *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*

Esta colheita deve ser efetuada entre as onze horas e as catorze horas<sup>14</sup> e após uma prova de esforço, isto é, após movimento ativo e continuado durante quinze minutos. O utente deve guardar toda a urina de uma única micção no recipiente fornecido pelo laboratório e conservar a amostra no frigorífico. A entrega deve ser feita, de imediato, no laboratório ou até duas horas após a colheita<sup>11</sup>.

### **Colheita de fezes**

- Para pesquisa de sangue oculto

Antes de iniciar a colheita, o utente deve ser consciencializado que não deve efetuar o exame no caso de hemorragia visível, diarreia, ter ingerido qualquer medicamento que tenha, na sua composição, ácido acetilsalicílico ou grandes quantidades de álcool, quarenta e oito

horas antes de efetuar a colheita. No caso de ser mulher, também não deve realizar a colheita se estiver menstruada ou até três dias depois de finalizada a menstruação.

Para a pesquisa de sangue oculto nas fezes, são necessárias três amostras, se possível, colhidas em três dias consecutivos. A evacuação deve ser feita em recipiente limpo e seco, tendo o cuidado de não misturar com a urina e a recolha para o recipiente de transporte deverá ser feita retirando uma porção de fezes, com a colher que se encontra fixa à tampa, de três zonas diferentes.

Os recipientes devem ser refrigerados ou mantidos em local seco e fresco até serem entregues no laboratório ao terceiro dia de colheita.

- Para exame bacteriológico

A colheita deverá ser realizada na fase aguda da doença intestinal, ou seja, nos primeiros três dias de sintomatologia e uma amostra é quase sempre suficiente para o diagnóstico<sup>7</sup>. O utente deverá colher da mesma forma que o descrito para pesquisa de sangue oculto<sup>11</sup>. No caso de fezes sólidas, a amostra ideal deverá ter o tamanho máximo de uma noz e a recolha deverá ser feita nas zonas com sangue, pus ou muco<sup>11</sup>, locais onde, normalmente, existe um grande número de microrganismos envolvidos no processo infeccioso<sup>7</sup>. No caso de fezes líquidas, deve ser colhido um volume entre 5 a 10 ml (aproximadamente 2 a 3 cm de altura). Este exame não deve ser efetuado se o utente fez algum exame radiológico, com ingestão de papa de bário, nos três dias anteriores à colheita de fezes<sup>11</sup>.

A entrega deve ser feita de imediato ao laboratório, porque o processamento da amostra tem de ser realizado até duas horas após a sua emissão. Isto acontece para evitar que microrganismos como *Shigella spp.* ou *Salmonella spp.* percam a viabilidade para diagnóstico. Estas bactérias são muito frágeis fora do tubo digestivo e suportam mal as variações de pH decorrentes da redução da temperatura corporal para a temperatura ambiente, daí a necessidade do envio rápido ao laboratório e do facto de a amostra não poder ser refrigerada<sup>7</sup>.

Para facilitar o processo de transporte e conservação da amostra à temperatura ambiente e até vinte e quatro horas, o laboratório poderá ainda fornecer meios de transporte adequados como, por exemplo, o meio de *Cary Blair*<sup>11</sup>.

- Para exame parasitológico

Para este exame, o modo de colheita é igual ao referido para exame bacteriológico, no entanto, é necessário ter em conta alguns aspetos importantes. Não é aconselhada a colheita nos oito dias seguintes à ingestão de substâncias que deixam resíduos, tais como compostos

antidiarreicos, antiácidos, bismuto, bário ou laxantes oleosos. Também nos casos de toma de antibióticos ou meios de contraste, a colheita só é aconselhada passadas duas ou três semanas do fim da toma, pois estes causam uma diminuição do número de parasitas, provocando resultados erróneos<sup>14</sup>.

Para exame parasitológico são necessárias três amostras, em três dias consecutivos após emissão espontânea<sup>7</sup>. A entrega ao laboratório deve ser realizada quando recolhidas todas as amostras necessárias<sup>11</sup>.

- Para exame parasitológico - pesquisa de Oxiúros (*Enterobius vermicularis*)

A realização deste exame deve ser feita de manhã, ao acordar, antes de evacuar e de fazer a higiene local. Reunidas estas condições deve-se começar a colheita. Com o auxílio de uma espátula de madeira, aplicar a parte adesiva da fita transparente na região anal, exercendo pressão suficiente para assegurar o contacto da fita com as pregas do ânus<sup>11</sup> (ver Figura 4), tendo o cuidado de não tocar em material fecal<sup>14</sup>. Ao fim de alguns minutos, a fita adesiva deve ser retirada e colada na lâmina de vidro, fornecida pelo laboratório, ao longo do seu comprimento. A lâmina, por sua vez, deve ser colocada num envelope e entregue ao laboratório no dia indicado<sup>11</sup>.



Figura 4: Método de aplicação da fita adesiva para pesquisa de oxiúros.  
Fonte: Colheita em Ambulatório (Instrução de Trabalho)<sup>11</sup>.

### **Colheita de expetoração**

- Para exame bacteriológico

Antes de iniciar a colheita o utente não poderá escovar os dentes e deverá apenas lavar e gargarejar a boca com água. Este tipo de colheita deverá ser realizado de manhã, em jejum<sup>11</sup> e para um recipiente apropriado fornecido pelo laboratório<sup>14</sup>. A amostra colhida deverá ser de expetoração profunda e terá de ser entregue de imediato ao laboratório<sup>11</sup>. Caso isso não seja possível, a amostra deverá ser mantida refrigerada até ao seu envio<sup>14</sup>.

Para a pesquisa de micobactérias a colheita deve ser feita do mesmo modo, no entanto, são necessárias três amostras, se possível, colhidas em três dias consecutivos. Deverá ser utilizado um contentor para cada dia, sendo que cada um deles deverá ser identificado pela ordem de colheita. Os recipientes deverão ser guardados refrigerados ou em local seco e fresco até ao dia da entrega (terceiro dia de colheita de amostra).

### **Colheita de esperma**

- Para espermocultura

O indivíduo deverá colher todo o volume de uma ejaculação, obtida por masturbação, para o recipiente apropriado, fornecido pelo laboratório. É importante que antes de efetuar a colheita, as mãos e a glândula sejam lavadas com água e sabão<sup>14</sup>. A amostra deverá ser mantida à temperatura ambiente até entrega ao laboratório, que deverá ser feita o mais rapidamente possível<sup>11</sup>.

## **COLHEITA NA UNIDADE HOSPITALAR**

Existem, contudo, alguns tipos de colheita que devem ser realizados em Unidade Hospitalar, pois são procedimentos mais invasivos e que necessitam ser realizados por profissionais qualificados para tal.

### **Colheita de urina**

- Urina assética

A colheita de urina assética em contexto hospitalar só é realizada nos casos em que não seja possível a sua colheita em ambulatório, como acontece em crianças sem controlo do esfíncter ou, excepcionalmente, em utentes algaliados em situação de internamento.

No caso de crianças que ainda não tenham controlo do esfíncter, a colheita para urocultura processa-se para um saco coletor de urina pediátrico e, antes da aplicação deste, deverá ser lavada também toda a zona genital. De salientar que, se ao fim de trinta minutos a criança ainda não tiver urinado para o saco, este deverá ser retirado e repetido todo o processo anterior para a colocação de novo saco<sup>14</sup>.

De acrescentar que não está indicado fazer uroculturas em utentes algaliados, no entanto, se necessário, a colheita deve ser feita através da punção do tubo da algália, previamente desinfetado e clampado durante os quinze minutos anteriores. A punção deve ser feita com agulha e seringa estéreis e a urina deve ser depois transferida para um contentor esterilizado<sup>14</sup>.

## **Colheita de sangue venoso**

Para a realização deste tipo de colheita, o utente deve encontrar-se em condições de jejum e ter feito um repouso noturno adequado. A colheita tem de ser realizada sob condições de assepsia e seguindo os passos descritos<sup>7</sup>:

### 1. Seleção da zona de punção

Para obter uma amostra de sangue venoso é possível puncionar todas as veias superficiais da fossa ante cubital, antebraço ou dorso da mão, no entanto, não se deve preferir outra zona potencial de punção antes de examinar ambos os braços do utente. De notar que o dorso da mão é utilizado como local de punção apenas para utentes com veias delicadas ou difíceis (esclerosadas ou difíceis de visualizar) e que estas veias sangram com facilidade, pelo que, após a colheita, deve-se ter redobrada atenção ao processo de hemóstase do local puncionado.

### 2. Aplicação do garrote

O garrote é utilizado para aumentar o volume das veias, tornando-as mais proeminentes e, conseqüentemente, mais fáceis de canalizar. O garrote deve ser aplicado um pouco acima da zona escolhida para a realização da punção, de modo a que o fluxo arterial dos vasos seja interrompido, no entanto, esta compressão deve ser suave, por forma a que se possa sentir o pulso.

A pressão exercida pelo garrote não deve exceder um minuto pois poderá produzir uma estase local com hemoconcentração. Esta situação deve ser evitada porque pode interferir com certas determinações analíticas, produzindo resultados erróneos como, por exemplo, concentrações elevadas de parâmetros proteicos, elevação do hematócrito, trombocitopenias, assim como, hemólise.

### 3. Seleção da veia e preparação para a punção

Depois de selecionar a zona de punção, através da palpação da veia mais adequada para a colheita, deve-se desinfetar o local cuidadosamente com a solução alcoólica de benzalcónio e deixar secar. De notar que não se deve palpar a zona de punção depois de desinfetada, mesmo se o TSDT ou enfermeiro estiver a usar luvas.

Para facilitar a seleção da veia a puncionar, o utente deverá manter o braço esticado e o punho cerrado.

#### 4. Punção venosa

Para a realização da punção, o corpo de extração (adaptador e agulha) deve ser mantido num ângulo de 15° com a superfície a puncionar e a agulha deve ser introduzida ao longo do curso da veia, até que o bisel se encontre no seu interior. É importante avisar o utente aquando da realização da punção de modo a que possa adotar uma posição adequada ao processo.

#### 5. Extração de sangue

O corpo de extração deve ser fixo com o dedo indicador, entre a base da agulha e o braço e cada tubo é colocado no adaptador com a mão disponível. Neste passo é dado ao TSDT/enfermeiro o método de colheita que preferir, ou seja, é possível escolher entre o método de colheita por vácuo e o método clássico. No método de colheita por vácuo, os êmbolos dos tubos de colheita devem ser previamente puxados, de forma a criar o vácuo necessário, e só depois se devem introduzir os tubos no corpo de extração. Em vez disso, no método clássico de colheita, o tubo é introduzido no corpo de extração e só depois se deverá puxar o êmbolo do tubo de colheita, como se se tratasse de uma seringa.

Os tubos de colheita, quando introduzidos no corpo de extração devem ser totalmente perfurados pela ponta da agulha disponível para o efeito, ou seja, é necessária a correta perfuração do tubo para que todo o sistema de extração funcione. No momento logo após o início do enchimento do primeiro tubo, caso a veia seja de um calibre razoável e a extração esteja a correr bem, o garrote deve ser retirado.

Findado o enchimento do primeiro tubo de colheita, este deverá ser retirado de modo a que o corpo de extração não se mova. Se o método de colheita for o método clássico, após retirar o tubo do corpo de extração, o êmbolo deverá dar um *click* e depois ser partido.

É importante referir ainda que, a utilização dos tubos de extração deverá respeitar sempre a seguinte ordem: garrafa de hemocultura; tubos sem anticoagulante para determinações em soro; tubos citratados para testes de coagulação; tubos com outros aditivos, sendo que primeiro deve-se colocar o que tiver como aditivo a heparina e só depois o que tiver como anticoagulante o EDTA.

Finalizada a colheita, os tubos devem ser retirados do adaptador e invertidos suavemente algumas vezes. O corpo de extração deve ser retirado com cuidado, ativando a tampa de segurança da agulha e descartando para o contentor do material corto-perfurante. Após a remoção do corpo de extração, o local da punção deverá ser pressionado com gaze, durante alguns minutos, de forma a que se dê a hemóstase da veia. O utente deverá evitar fazer esforços com o braço ou mão puncionados nas horas seguintes à colheita.

- Hemoculturas

Considera-se ideal para o diagnóstico de qualquer bacteriemia a colheita de, pelo menos, dois pares de hemoculturas (dois frascos para crescimento de microrganismos aeróbios e outros dois frascos para crescimento de microrganismos anaeróbios) num período de vinte e quatro horas antes de iniciar a terapêutica antibiótica. É importante que as duas colheitas sejam feitas num intervalo mínimo de trinta a sessenta minutos, e que se utilizem locais de punção venosa diferentes para cada uma das colheitas. De referir ainda que, para a pesquisa de micobactérias é necessário um contacto prévio com o SPC para que seja fornecido o frasco adequado.

O sangue venoso deve ser sempre colhido por punção de veia periférica, como descrito anteriormente, ou seja, é incorreta a colheita através de cateter vascular. A colheita deve ser feita em condições de assepsia extremas pelo que a correta desinfeção da pele no local da punção é fundamental. É importante também a desinfeção da tampa de borracha do frasco, com solução desinfetante, por exemplo, álcool a 70°, tendo o cuidado de deixar evaporar antes de puncionar a borracha.

No fim da colheita é fundamental agitar cuidadosamente o frasco, por inversão, como realizado com os tubos de colheita. Os frascos devem ser identificados com as etiquetas respetivas e acrescentada a seguinte informação: dia e hora da colheita, número da amostra e local anatómico da colheita<sup>14</sup>.

As garrafas de hemocultura devem ser transportadas de imediato ao SPC e mantidas à temperatura ambiente até ao seu processamento<sup>7</sup>.

### **Recolha de cateteres intravasculares**

É importante, antes da remoção do cateter, avaliar se este é ou não responsável por originar um quadro de bacteriemia<sup>7</sup>, ou seja, só é aconselhado o envio se existirem sinais de infeção relacionada com o cateter<sup>14</sup>.

Em caso de necessidade de remoção, deve-se proceder a uma colheita prévia de sangue venoso para hemocultura. Esta colheita deve ser feita de uma outra veia periférica, pois só assim é possível valorizar o exame cultural do cateter.

Esta recolha deve ser efetuada só depois da desinfeção da pele em redor com solução antisséptica. Posteriormente, o cateter deve ser retirado e cortado, em condições assépticas, 3 a 5 cm da porção terminal do mesmo. Esta amostra deve ser entregue no laboratório em recipiente esterilizado ou em tubo *Portagerm*<sup>TM</sup> <sup>7</sup>.

## **Colheita de lavado brônquico, lavado bronco-alveolar, aspirado gástrico**

Esta colheita deverá ser efetuada por um médico, no entanto, é de referir que as amostras devem ser colhidas para um recipiente esterilizado e, se for o caso, marcado com a ordem de colheita das amostras<sup>14</sup>.

Quando a amostra é utilizada para pesquisa de micobactérias, quer para exame direto, quer para exame cultural, esta pode ser conservada refrigerada durante quarenta e oito horas<sup>7</sup>.

## **Colheita de exsudados**

### ▪ Exsudado faríngeo, nasal e ocular

A amostra deverá ser colhida com zaragatoa estéril, rodando suavemente na superfície de recolha e colocada em meio de transporte adequado.

Na zona orofaríngea, para recolha de exsudado faríngeo, a zaragatoa deverá ser aplicada entre os pilares e por detrás da úvula, amígdalas e qualquer área inflamada ou ulcerada, evitando tocar na mucosa oral e língua.

No caso da recolha de exsudado nasal, a zaragatoa deverá ser aplicada nas fossas nasais, ou seja, uma zaragatoa diferente para cada narina até encontrar resistência.

Para recolha de exsudado ocular, a zaragatoa deve ser passada junto ao saco lacrimal. Deverá ser recolhida uma zaragatoa para cada olho e indicado o lado da infeção<sup>7</sup>. Sempre que possível, repetir a operação com uma segunda zaragatoa para a realização de exame direto (esfregaços)<sup>14</sup>.

### ▪ Exsudado auricular

Para esta colheita é necessário lavar, previamente, o canal auditivo externo com soro fisiológico estéril ou com um detergente (por exemplo, solução aquosa de cloreto de benzalcónio), de forma a remover a flora contaminante<sup>7</sup>.

O produto indicado para o diagnóstico de otite é o líquido de timpanocentese e deverá ser colhido por aspiração (com agulha e seringa). No entanto e excecionalmente, se o tímpano estiver perfurado este líquido poderá ser colhido com zaragatoa<sup>14</sup>. Assim, esta deverá ser introduzida o mais profundamente possível no canal auditivo, rodando suavemente. A zaragatoa deverá ser colocada em meio de transporte adequado e mantida à temperatura ambiente até ao seu processamento<sup>7</sup>. Nos casos de colheita por aspiração, a amostra deverá chegar ao SPC em contentor esterilizado ou frasco *Portagerm*<sup>TM</sup>. De referir ainda que, para a pesquisa de fungos em raspados do ouvido externo, o produto não deve ser colocado em meio de transporte, mas

sim em recipiente estéril com algumas gotas de água destilada estéril ou soro fisiológico, para evitar que a amostra seque. O envio, neste caso, deve ser feito de imediato<sup>14</sup>.

- Exsudado vaginal e endocervical

Este tipo de colheita é efetuado pelo médico. Contudo, é importante transmitir à utente que a colheita não deve ser realizada nos dias de menstruação e seguintes.

Para que a amostra seja viável é importante também que a colheita seja feita com espéculo sem lubrificante, sendo preferível que o espéculo seja humedecido com soro fisiológico estéril. Finalizada a colheita, a zaragatoa deverá ser colocada em meio de transporte adequado e transportada para o laboratório à temperatura ambiente.

Deve ser ainda colhida uma segunda zaragatoa para realização de preparações a fresco, colhida do mesmo modo que a anterior<sup>7,14</sup>.

- Exsudado uretral

Assim como para o exsudado vaginal e endocervical, também a colheita de exsudado uretral deverá ser efetuada pelo médico. Este procedimento deverá ser feito antes da primeira micção da manhã ou, se isso não for possível, esperar pelo menos uma hora após a última micção. É ainda necessário limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze estéril antes deste procedimento para evitar contaminações. De referir também que são necessárias duas zaragatoas, uma para exame direto e outra para exame cultural e, após o procedimento, estas deverão ser colocadas em meio de transporte adequado e à temperatura ambiente até ao processamento da amostra<sup>7,14</sup>.

- Exsudado purulento

Neste tipo de colheita, é aconselhado lavar superficialmente a lesão com soro fisiológico estéril e descontaminar a zona envolvente com iodopovidona ou, em casos de lesões mais profundas, desinfetar a pele com solução antisséptica.

No caso de ser necessário a colheita de um exsudado profundo, esta deverá ser efetuada puncionando e aspirando, com seringa e agulha estéreis, no local onde a supuração for mais abundante, tendo o cuidado de não tocar nos bordos da lesão. A amostra deverá ser entregue em contentor estéril ou na própria seringa de colheita, devidamente fechada com a tampa adequada (sem agulha)<sup>7</sup>.

Se for apenas uma colheita de exsudado superficial, deverão ser colhidos, por biópsia, pequenos fragmentos de tecido da base e bordo da lesão e enviados em recipiente esterilizado.

Outro processo de colheita utilizado, apenas em último recurso, é esfregar a zaragatoa esterilizada em toda a base da lesão e acondicioná-la em meio de transporte adequado.

Todas estas amostras deverão ser entregues o mais rapidamente possível ao laboratório, para que possam ser processadas até, no máximo, duas horas após a colheita.

De notar que, se no pus forem observados grânulos amarelos, cinzentos, brancos ou negros, é necessário colher também os grânulos para estudo micológico.

### **Colheita de líquidos biológicos**

- Líquido cefalorraquidiano (LCR)

A colheita deve ser feita por um médico e para três tubos estéreis (sem anticoagulante), numerados de acordo com a sequência da colheita e com cerca de 1 a 2 ml por tubo. O primeiro tubo servirá para realizar o exame citológico, o segundo para exame bioquímico e o terceiro e último tubo para exame microbiológico. Ambos os tubos devem ser enviados de imediato ao SPC e mantidos à temperatura ambiente até ao seu processamento, exceto se a amostra de LCR se destinar a estudos virais. Neste último caso, o tubo deverá ser refrigerado ou congelado até ao seu processamento<sup>7,14</sup>.

- Líquido pleural, peritoneal, pericárdio, sinovial e amniótico

A amostra deve ser realizada por um médico e colhida: para um tubo com EDTA (cerca de 1 ml de amostra), para a realização de exame citológico; para um recipiente esterilizado (cerca de 10 ml), com tampa de rosca, para exame microbiológico e/ou bioquímico e, finalmente, para uma garrafa de hemocultura, para o estudo microbiológico da amostra. De notar ainda que, para pesquisa de microrganismos, exceto fungos e micobactérias, a amostra deverá chegar ao laboratório no meio de transporte apropriado, ou seja, num frasco *Portagerm*<sup>TM</sup> 7,14.

### **Colheita de cabelo, pele e unhas**

A colheita deste tipo de amostras serve, unicamente para exame micológico.

- Cabelo e couro cabeludo

Através da examinação do utente devem-se verificar zonas de perda de cabelo, cabelos partidos ou lesões no couro cabeludo. Seguidamente, devem ser colhidos, com pinça esterilizada, escamas, crostas, partes do cabelo afetado ou material das margens das lesões

sempre que estas se verifiquem. O material colhido deve ser colocado numa placa de Petri e esta fechada com fita adesiva<sup>7</sup>.

- Raspados cutâneos

A zona da colheita deve ser lavada duas vezes, antes da colheita. Da primeira vez, a zona da lesão deverá ser lavada com água e sabão e, da segunda vez, utilizando álcool 70° e uma gaze. Após a secagem do local, o bordo da lesão deverá ser raspado com um bisturi estéril e o material recolhido para uma caixa de Petri. Se a epiderme também estiver solta, deve-se recolher alguns fragmentos e, no final, a caixa de Petri deverá ser fechada com fita adesiva para que se possa transportar sem risco de perder o seu conteúdo<sup>7</sup>.

- Raspados, cortes e fragmentos de unhas

Antes de iniciar a colheita deve-se lavar a zona visivelmente afetada com álcool 70° e uma gaze. Após secar, deve-se raspar a zona afetada com um bisturi estéril e recolher, para dentro de uma caixa de Petri, o material raspado. Se necessário, podem ainda ser cortados fragmentos das unhas afetadas ou recolher os detritos encontrados sobre elas<sup>7</sup>.

Se houver disponível meio de Sabouraud, aconselha-se a inoculação, no momento da colheita, de uma placa com o material obtido<sup>7</sup>.

#### **3.4.4. Segurança**

No que diz respeito à segurança perante o manuseamento de amostras biológicas é necessário ter sempre em mente que “todos os produtos são potencialmente perigosos”<sup>7</sup>.

Assim, devem ter-se em consideração algumas regras para garantir a segurança do TSDT/enfermeiro:

- Os produtos colhidos por aspiração com agulha devem ser transferidos para recipiente apropriado. Isto significa que, as seringas com agulha não são aceites no laboratório. No caso de ser necessário o envio do produto biológico em seringa, como é o caso de sangue arterial para gasimetria, ou exsudados purulentos, retirar sempre a agulha usada e fechar a seringa com a tampa adequada<sup>7</sup>.

- Os recipientes e/ou requisições visivelmente conspurcadas com matéria orgânica não são aceites. Para que isto não aconteça, as requisições devem ser enviadas de forma protegida, sem contacto direto com os produtos biológicos<sup>7</sup>.
- As embalagens de transporte, como tubos de transporte ou malas térmicas, devem ser herméticas e inquebráveis. Estas devem permitir o confinamento de qualquer produto derramado e a proteção das amostras da exposição direta à luz<sup>15</sup>.
- Todo o resíduo hospitalar produzido no laboratório deve ser corretamente triado e encaminhado. Este trabalho é realizado pelo AO do laboratório<sup>15</sup>.

### **3.5. Registo da colheita**

Finalizada a colheita, esta deve ser sempre registada no *modulab* através do nome de utilizador do TSDT que a realizou. Caso isto não seja possível, a requisição das análises é datada e rubricada pelo TSDT que fez a colheita<sup>9</sup>.

Além do registo da colheita, todas as não conformidades que ocorrem durante este processo devem ser registadas por escrito, na requisição, de modo a que o responsável pela receção e triagem possa avaliar a necessidade de aceitar ou rejeitar a amostra biológica<sup>7</sup>.

### **3.6. Envio da amostra ao SPC**

Todas as amostras biológicas colhidas devem ser enviadas ao laboratório o mais rapidamente possível. Se isto não acontecer, podem conduzir a falsos resultados com o consequente diagnóstico clínico e respetiva terapêutica incorretos<sup>7</sup>. O AO transporta as amostras até ao SPC em caixas adequadas, juntamente com a requisição<sup>8</sup>.

Como já referido anteriormente, o SPC do CHMT é constituído por três laboratórios, sendo que os de Abrantes e Torres Novas apenas processam amostra de carácter urgente ou para satisfazer as necessidades das suas Unidades de Internamento. No entanto, todas as Unidades Hospitalares do CHMT têm postos de colheita para análises de rotina, pelo que essas amostras têm de ser transportadas para o laboratório central, em Tomar. Portanto, é necessário

que haja um transporte de amostras biológicas entre os laboratórios de menor dimensão para o laboratório central do SPC.

O transporte das amostras biológicas entre laboratórios é efetuado, diariamente, por uma equipa de motoristas, seguindo horários estipulados pelo CHMT. Fora desses horários, o pedido de transporte deve ser feito informaticamente pelo AT da Unidade Hospitalar onde se encontra a amostra ou, pelo TSDT dessa Unidade Hospitalar, caso o AT não esteja no seu horário de trabalho (só para pedidos urgentes)<sup>16</sup>.

Por conseguinte, o acondicionamento, envio, transporte e receção de amostras biológicas, deve ser efetuado em condições que mantenham a integridade da amostra biológica e do contentor e evitem a exposição accidental dos colaboradores que as transportam e manuseiam. Este processo é efetuado pelo TSDT de cada Unidade Hospitalar, responsável pela organização e envio das amostras, respeitando as condições de estabilidade e conservação das mesmas. Deste modo, é necessário que sejam respeitadas algumas condições para o correto acondicionamento das amostras<sup>16</sup>:

- Verificar se todas as amostras biológicas estão devidamente identificadas e os contentores vedados;
- Colocar os recipientes de colheita em contentor/suporte de transporte, em posição vertical e, posteriormente, em saco de cristal devidamente fechado;
- Transportar as amostras congeladas em contentores de congelação;
- Acondicionar tudo em mala térmica resistente, já numerada, com identificação do SPC e do laboratório de origem e destino através do impresso *IMP.SPC.002 - Receção e entrega de amostra/material pelo motorista*. Como medida de segurança é colocado na parte exterior das malas térmicas o símbolo de risco biológico;
- Colocar termoacumuladores no transporte de amostras refrigeradas, de forma a que estes envolvam a mala térmica e que as amostras sejam mantidas nas devidas condições de temperatura. Para amostras congeladas é fundamental que a temperatura da mala térmica se mantenha inferior a -4°C, para amostra refrigeradas, a temperatura tem de se manter entre 2°C e 12°C e, caso o transporte seja de amostras à temperatura ambiente, este deve ser feito a uma temperatura entre 15°C e 25°C. De notar que a variação da temperatura durante o transporte não deverá exceder 30% do intervalo de temperaturas estipuladas;
- Ativar os *dataloggers*, para o registo de temperaturas durante o transporte. Estes medidores automáticos registam a temperatura a que se encontra a mala em intervalos de dez minutos. Por isso, a preparação da mala deve ser efetuada atempadamente, de

forma a que a primeira temperatura registada pelo *datalogger* esteja dentro do intervalo aceitável definido;

- Nos transportes em que não sejam utilizados *dataloggers*, a temperatura deve ser monitorizada de forma manual, com termohigrómetros calibrados para os intervalos de temperaturas a que são transportadas as amostras. Esta monitorização é feita antes da saída das malas do laboratório de origem e registada no campo “observações” de todos os impressos envolvidos no processo de transporte. No caso de amostras congeladas, a leitura da temperatura deve ser de um “porta congelados” escolhido aleatoriamente;
- Mesmo que as amostras se mantenham no intervalo de temperatura definido anteriormente, o transporte não deve ultrapassar as quatro horas, de forma a garantir a estabilidade das amostras;
- Sempre que o transporte seja efetuado por um motorista do CHMT, deve ser usado o impresso *IMP.GRL.514 – Guia de transporte*.
- O TSDT deve preencher também, na pasta partilhada o impresso *IMP.SPC.033 – Amostras enviadas entre laboratórios do Serviço de Patologia Clínica*, de forma a garantir a rastreabilidade das amostras.

### **3.7. Receção e triagem da amostra no SPC**

A receção das amostras é feita pelo TSDT que esteja escalado para a triagem nesse dia.

Nos casos de requisições pedidas por outros sistemas que não o *modulab*, por exemplo, as requisições de utentes internos pedidas através do SONHO, o AT deve proceder ao registo de todas as análises da requisição no sistema informático do laboratório<sup>8</sup>, como já mencionado em 3.1. *Requisição das análises*. Neste caso, tanto a requisição feita no *modulab* como as respetivas etiquetas devem ser impressas e enviadas para a receção de amostras, onde o TSDT procederá à confirmação da identificação do utente nas novas etiquetas e realizará a troca das mesmas nos tubos respetivos<sup>8</sup>.

No caso das amostras enviadas dos laboratórios do SPC para o laboratório central, devem ser realizados alguns procedimentos por parte do TSDT que se encontra na receção de produtos/triagem. O TSDT deve preencher todos os impressos que são enviados juntamente com as malas térmicas, assim como confirmar se foi feito o correto acondicionamento e

conservação das amostras biológicas. Por último, deve ser feita também uma validação das temperaturas de transporte e o respetivo registo<sup>16</sup>.

### **3.7.1. Avaliação da conformidade da amostra**

Todas as amostras recebidas no laboratório devem ser corretamente colhidas, transportadas e processadas, de modo a não fornecer informações erróneas que possam levar a diagnósticos e tratamentos incorretos<sup>10</sup>.

A avaliação da conformidade da amostra é feita pelo TSDT que, segundo os critérios de rejeição da amostra a seguir descritos, é responsável pela aceitação ou rejeição da amostra para análise. A amostra não é aceite quando<sup>10</sup>:

- Existir discrepância na identificação do utente entre amostra e requisição ou entre o tipo de amostra enviada e a requisição. Nestes casos, a requisição deve ser devolvida e a amostra inutilizada.
- As amostras chegarem sem identificação, hemolisadas, lipémicas ou com coágulos, que se apresentem contaminadas macroscopicamente ou com volume inadequado, assim como, as que se verifiquem que as condições de colheitas não foram adequadas, devem ser inutilizadas.
- O contentor ou sistema de meio de transporte não for apropriado para a amostra e/ou análise a efetuar, a integridade do meio de transporte não estiver assegurada ou se verificarem más condições de conservação e estabilidade da amostra. Nestes casos, deve-se proceder do mesmo modo que o ponto anterior, ou seja, inutilizar a amostra.
- O produto tiver sido enviado em seringa com agulha. O procedimento a adotar neste caso é a devolução ao serviço requisitante.
- As amostras chegarem derramadas, o que leva à sua inutilização.
- O cateter enviado não chegar acompanhado de hemocultura.

É de salientar ainda que, em todos os casos acima descritos, é contactado o serviço requisitante e registado o contacto e a identificação do colaborador contactado no *modulab*, nomeadamente, na secção do relatório interno da amostra<sup>10</sup>.

No caso de amostras enviadas entre laboratórios do SPC, sempre que a temperatura de transporte das amostras exceder em 30% os intervalos definidos como aceitáveis, e tendo em

consideração o estipulado nos referidos Protocolos e manuais em relação à estabilidade e conservação de amostras, também estas devem ser rejeitadas e solicitadas novas colheitas<sup>16</sup>.

### **3.7.2. Receção/ponto de controlo**

Após esta primeira fase de verificação das etiquetas ou receção de amostras enviadas de outro laboratório do SPC, é necessário dar a entrada de todas as amostras no sistema informático do laboratório (*modulab*), de forma a que se possa garantir a rastreabilidade das mesmas ao longo do processo analítico. Para que isso aconteça, existem dois processos, o modo manual e o automático.

No primeiro caso, o TSDT deverá aceder ao *modulab* e, no separador “Fase Pré-Analítica”, entrar em “Receção de contentores”.

No modo de receção de amostras automatizado, através do equipamento *AutoMate™ 2550* da *BECKMAN COULTER* (descrito em 3.7.4. *Triagem da amostra*), é de salientar que só são introduzidos neste equipamento tubos de colheita de sangue venoso e, no caso de amostras de plasma e soro, estes devem entrar no equipamento já centrifugados (ver 3.7.3. *Tratamento da amostra*).

### **3.7.3. Tratamento da amostra**

Antes do processamento nos respetivos setores analíticos, algumas amostras necessitam de um tratamento prévio de modo a que a amostra seja a mais adequada para a análise que se pretende efetuar ou que garanta as condições necessárias para o seu processamento.

Um exemplo disso são as amostras de sangue venoso que podem ser usadas em vários setores analíticos, no entanto, cada um utiliza diferentes constituintes da amostra (na Bioquímica utiliza-se soro e na Hematologia utiliza-se sangue total ou plasma). Portanto, para a obtenção de diferentes amostras, o processo de centrifugação é essencial. Assim, entende-se por centrifugação, o procedimento utilizado na separação dos constituintes celulares do meio, de forma rápida, ao gerar um aumento da aceleração relativa<sup>17</sup>. Este é um método de separação de misturas que se baseia na diferença de densidade entre os seus componentes. Para que este processo aconteça, a velocidade, duração e temperatura da centrifugação vão variar de acordo com a amostra que se pretende obter.

Quando se tratam de amostras biológicas para determinações na área da hemóstase, todas elas realizadas em plasma, é de salientar que estas devem chegar ao SPC o mais rapidamente possível, para que o tempo que medeia entre a colheita e o tratamento da amostra seja o mais curto possível. No entanto, se isso não for possível, estas devem ser tratadas de acordo com o descrito na Tabela 2 e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  de forma a assegurar a qualidade da amostra. O mesmo acontece quando o SPC tem necessidade de enviar plasma para processamento num laboratório externo, no entanto, o tubo que contém a amostra congelada deve ainda ser rotulado, para além da identificação do doente, com a natureza do produto e a respetiva contagem de plaquetas, efetuada nos contadores automáticos de Hematologia<sup>18</sup>.

No caso de a amostra pretendida ser soro, no fim da colheita para o tubo adequado, a amostra deverá repousar entre quinze e trinta minutos para que ocorra a coagulação e, por conseguinte, a retração do coágulo. Seguidamente, o tubo deverá ser centrifugado à velocidade recomendada<sup>7</sup>, descrita na Tabela 2.

No que toca à análise do sedimento urinário, também é importante que seja feita uma alíquota da amostra de urina e que a primeira sofra uma pequena centrifugação antes do seu processamento, de modo a concentrar o sedimento e facilitar a sua análise detalhada.

Em suma, é apresentado um quadro resumo da velocidade de centrifugação adequada à obtenção de determinadas amostras biológicas.

*Tabela 2:* Quadro resumo dos valores específicos para a força centrífuga relativa (FCR) em g, velocidade de centrifugação em rotações por minuto (rpm) e tempo de centrifugação em minutos, indicados para o processamento de amostras biológicas.

<b>Tipo de tubo</b>		<b>FCR (g)</b>	<b>rpm</b>	<b>Tempo (min)</b>
Tubo soro (com ativador e gel)		1800	$\pm 3000$	10
Tubo plasma (sem gel)		2000-3000	$\pm 4000$	15
Tubo coagulação	Plasma Rico em Plaquetas	150	$\pm 800$	5
	Plasma Pobre em Plaquetas	1500-2000	$\pm 3000$	10
	Plasma Livre de Plaquetas	2500-3000	$\pm 4000$	20
Tubo com alíquota de urina		350-400	$\pm 1500$	5
Tubo com alíquota de urina para pesquisa de micobactérias		3000	$\pm 3500$	15
Tubo com líquidos biológicos		1500	$\pm 3000$	15-20

Fonte: Adaptado de Standardização do processo de centrifugação (Instrução de Trabalho)<sup>17</sup> e de Colheita e Conservação - Acondicionamento de Amostras Biológicas para Análises de Imunoquímica (Protocolo)<sup>19</sup>.

No caso de amostras para estudo microbiológico, é necessário ter em conta que, após a receção das mesmas, é necessária a impressão das etiquetas para a identificação da(s) sementeira(s) de cada produto biológico, assim como, no caso de urina para estudo

bacteriológico, e caso este processo não tenha sido efetuado previamente, transferir a amostra para um tubo com ácido bórico<sup>20</sup>.

Em todos estes casos é importante referir que sempre que haja informação relevante no que toca à qualidade, quantidade ou tratamento da mesma, esta deve ser anotada no campo “Observações: internos”, no *modulab*<sup>20</sup>.

### 3.7.4. Triagem da amostra

De modo a facilitar o processo de triagem, o laboratório central do CHMT possui um equipamento automático que recebe e distribui os tubos de colheita pelas *racks* dos vários setores analíticos. Este equipamento designa-se de *AutoMate*<sup>TM</sup> 2550 da *BECKMAN COULTER* e é um sistema semiaberto de processamento e classificação de amostras, pré e pós-analítico. O sistema identifica o tubo, através da leitura do código de barras, e distribuiu-o pelo setor analítico respetivo, na área de saída do equipamento, sob o controlo do sistema informático do laboratório<sup>21</sup>. O *AutoMate*<sup>TM</sup> 2550 possui também um módulo de alíquotas que permite criar tubos secundários rotulados e detetar se o volume de amostra é suficiente para as análises solicitadas. Este sistema possui ainda um módulo de recuperação de amostras que permite vedar, novamente, todos os tubos para que seja possível o seu arquivo<sup>21</sup>.



Figura 5: *AutoMate*<sup>TM</sup> 2550 da *BECKMAN COULTER*.  
Fonte: *AutoMate*<sup>TM</sup> 2500 Family Sample Processing System - Instruções de utilização<sup>21</sup>.

No CHMT, o *AutoMate*<sup>TM</sup> 2550 não se encontra ligado a nenhum outro equipamento de distribuição pelo que, depois dos tubos separados pelas *racks* de cada setor analítico, é o TSDT que se deve deslocar ao equipamento para recolher as *racks* do setor para o qual se encontra escalado.

### 3.7.5. Envio de amostras para laboratório externo

Por vezes existe a necessidade de enviar amostras para laboratórios externos, pelo que é importante que, quando a amostra biológica chega à triagem, o seu acondicionamento e transporte sejam feitos devidamente e o mais rápido possível. Este circuito de amostras é feito

diariamente, no entanto, apenas durante o horário de expediente do SPC e respeitando os horários estipulados pelo CHMT<sup>16</sup>. Todas as amostras a serem enviadas para laboratórios externos são centralizadas no laboratório de Tomar do SPC, à exceção das amostras cuja estabilidade e conservação obriguem a que o transporte seja feito no próprio dia, sendo então o seu envio feito a partir da Unidade Hospitalar de origem<sup>16</sup>. O envio deve ser feito do mesmo modo que o envio entre laboratórios do CHMT, no entanto, os impressos a preencher deverão ser os adequados ao envio para laboratório externo<sup>16</sup>.

## **4. Fase Analítica**

A principal função do laboratório é a execução de análises qualitativas e quantitativas aos fluidos do organismo e os resultados obtidos são usados, pelo médico, para detecção da doença, orientação e monitorização do tratamento e avaliação da progressão da mesma. Os métodos analíticos devem ser, por isso, realizados com grande especificidade e sensibilidade. Para além disso, é necessário conhecer também os princípios e fundamentos básicos que afetam o processo analítico, ou seja, é importante o uso de métodos analíticos apropriados, bem como de instrumentação e equipamentos que possam garantir a capacidade de o laboratório dar resultados seguros e em tempo útil. Assim, a fidedignidade de um valor analítico obtido depende, em relação à fase analítica, da verificação da linearidade do método, da sua precisão e reprodutibilidade.

Neste capítulo será descrita a rotina de análise do CHMT, através da abordagem das análises desenvolvidas por cada setor analítico do laboratório central, em Tomar, bem como todos os processos efetuados à amostra desde que chega ao setor analítico até à validação do resultado obtido.

### **4.1. Hematologia**

A Hematologia é um ramo das ciências médicas que estuda a morfologia do sangue nas vertentes clínica e laboratorial. O sangue é um fluido corporal constituído maioritariamente por plasma, mas também por elementos figurados, como os eritrócitos (ou glóbulos vermelhos), leucócitos (ou glóbulos brancos) e plaquetas. Para além da morfologia sanguínea, a Hematologia ocupa-se ainda do estudo dos órgãos hematopoiéticos (medula óssea, baço e gânglios linfáticos), mas também das doenças do sangue, entre as quais se destacam as anemias, leucemias, linfomas, mieloma múltiplo e as alterações da coagulação.

#### **4.1.1. Equipamentos**

##### ***XN-1000 da SYSMEX***

O equipamento *XN-1000* é um analisador automatizado de Hematologia para contagem, *in vitro*, de populações de células sanguíneas de uma amostra. Este equipamento permite uma

análise quantitativa, identificação, análise percentual e a sinalização de elementos figurados do sangue e fluidos corporais (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e outras células) através dos métodos de focagem hidrodinâmica, citometria de fluxo e laurisulfato de sódio (SLS)<sup>22</sup>.

No laboratório central do CHMT existem dois equipamentos *XN-1000*, sendo que ambos realizam as mesmas análises, à exceção da contagem de reticulócitos que apenas é feita no equipamento número 1.



Figura 6: XN-1000 da SYSMEX.

### **TEST 1 - THL da ALIFAX**



Figura 7: TEST 1 - THL da ALIFAX.

Fonte: Infecções gastrointestinais | bioMérieux Brasil<sup>23</sup>.

Este equipamento é um autoanalisador para a determinação da velocidade de sedimentação. Utiliza amostras de sangue total em EDTA e, devido à sua tecnologia, os resultados são obtidos mais rapidamente (em segundos) e com uso de menos quantidade de amostra (175 µl) quando comparado com o método de Westergren (técnica manual), que necessitaria de uma hora e cerca de 2 ml de amostra para a determinação deste parâmetro<sup>23</sup>.

### **ADAMS A1c HA-8160 da ARKRAY**

O analisador automático de hemoglobina *ADAMS A1c HA-8160* é um equipamento usado para determinar a quantidade de diferentes tipos de hemoglobinas (Hb) presentes numa amostra de sangue venoso. Uma das análises mais frequentes é a medição de HbA1c, um bom indicador do teor médio de glucose no sangue nos últimos três meses. No entanto, este equipamento também é utilizado, no CHMT, para medir a concentração de HbA2 e HbF e outras variantes de hemoglobina para a triagem de β-talassemia e outras hemoglobinopatias, através do método de separação de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*)<sup>24</sup>.



Figura 8: ADAMS A1c HA-8160 da ARKRAY.

### ***RAL STAINER da RAL DIAGNOSTICS***



Figura 9: *RAL STAINER* da *RAL DIAGNOSTICS*.  
Fonte: *RAL Diagnostics*<sup>25</sup>.

O equipamento *RAL STAINER* é um sistema de coloração automática usado para corar esfregaços de sangue periférico no setor de Hematologia. Este corador é um sistema fechado que usa uma técnica de coloração em banho, durante a qual as lâminas são imersas diretamente nos contentores do corante. Neste equipamento podem ser coradas até dez lâminas num ciclo de coloração<sup>25</sup>.

### ***ACL TOP® 300/500 da WERFEN***

A família *ACL TOP®* é uma linha completa de sistemas de teste na área da Hemóstase, baseado em ensaios cromogéneos e imunoturbidimétricos, com um menu completo para análises de rotina ou especiais<sup>26</sup>.

No CHMT, o *ACL TOP® 500*, devido à sua maior capacidade de processamento de amostras, é utilizado para análises de rotina, isto é, para análises que são feitas diariamente. Já o analisador *ACL TOP® 300* é utilizado para a realização de análises especiais, ou seja, que não são feitas frequentemente<sup>26</sup>.



Figura 10: *ACL TOP® 300* (A) e *ACL TOP® 500* (B) da *WERFEN*.  
Fonte: Família *ACL TOP Série* | *Werfen em Portugal*<sup>26</sup>.

### ***FACSCALIBUR da BD DIAGNOSTICS***



Figura 11: Citómetro de fluxo *FACSCalibur* da *BD DIAGNOSTICS*.  
Fonte: Biosciences | *BD Biosciences-EU*<sup>27</sup>.

O citómetro de fluxo *FACSCalibur* identifica e enumera subconjuntos de linfócitos, células-tronco, outros leucócitos e reticulócitos em suspensão numa amostra de sangue total. Este equipamento caracteriza células em diferentes estadios de desenvolvimento, através do uso de anticorpos monoclonais, marcados com fluorescência<sup>27,28</sup>.

## **HYDRASYS® da SEBIA**

O equipamento semiautomático *HYDRASYS®*, foi desenvolvido tendo por base a técnica de separação de moléculas por eletroforese em gel de agarose. Neste equipamento é possível três tipos de separação, consoante: a carga das proteínas, em tampão com pH específico; o ponto



Figura 12: Equipamento *HYDRASYS®* da *SEBIA*.  
Fonte: GEL ELECTROPHORESIS | *Sebia*<sup>29</sup>.

isoeletrico, num gradiente de pH específico; e o peso molecular das proteínas, num gel de agarose. A realização das funções de aplicação da amostra, migração, lavagem e coloração é feita automaticamente e a quantificação das frações proteicas pode ser feita através do *scan* do gel obtido. É ainda possível automatizar a pipetagem da amostra através da estação de pipetagem *HYDRAPLUS®*<sup>29</sup>.

### **4.1.2. Análises Hematologia**

#### **HEMOGRAMA COM DIFERENCIAL OU COMPLETO**

O hemograma com diferencial ou completo é um exame que permite avaliar as três principais linhagens de células do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O hemograma junta, num só exame, o eritrograma (exame que avalia a série vermelha), o leucograma com diferencial (exame que avalia leucócitos e a proporção de cada tipo de leucócitos em circulação) e o plaquetograma (exame que avalia as plaquetas).

- Amostra: Sangue total.
- Condições de colheita: Normalmente o sangue venoso é colhido para um tubo com EDTA como anticoagulante, para produzir uma amostra de sangue total. É importante a inversão correta do tubo de colheita para que o sangue e o anticoagulante fiquem bem homogeneizados, de modo a não causar a coagulação da amostra.
- Equipamento: *XN-1000* da *SYSMEX*.

No hemograma completo são analisados os seguintes parâmetros:

#### **Eritrócitos (RBC)**

Os eritrócitos, também designados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são unidades morfológicas pertencentes à série vermelha do sangue, anucleadas e com forma de disco

bicôncavo. A sua principal função é o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) aos tecidos e o retorno de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) dos tecidos para os pulmões, onde ocorreram as trocas gasosas<sup>30</sup>.

- Metodologia: O método utilizado para a contagem de eritrócitos é a focagem hidrodinâmica e esta é calculada através da contagem de partículas entre dois discriminadores<sup>22</sup>.

- Limitações/interferências: Em amostras que contenham agregados de eritrócitos (aglutininas frias), microeritrócitos ou eritrócitos fragmentados, o sistema poderá indicar erroneamente um resultado baixo. Em oposição, podem ocorrer resultados falsamente elevados em casos de amostras com leucocitose ou que tenham gigantoblastos presentes<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Na contagem de eritrócitos é determinado o número destas células num determinado volume de sangue. Os resultados devem ser sempre comparados com outros parâmetros antes do diagnóstico definitivo de uma patologia. No entanto, uma contagem de eritrócitos elevada poderá indicar a presença de patologias como doença cardíaca congênita, doença obstrutiva dos pulmões, desidratação ou superprodução destas células por parte da medula óssea. Por outro lado, uma contagem baixa de eritrócitos poderá estar presente nos casos de anemia, hemorragias, doença renal, insuficiência da medula óssea, por exemplo, por tumor ou por exposição a radiação, ou desnutrição. Este valor diminuído poderá ainda indicar deficiências nutricionais de ferro, folato ou vitamina B12<sup>31</sup>.

### **Hemoglobina (HBG ou Hb)**

Como já referido, a principal função dos eritrócitos é o transporte de  $O_2$  para os tecidos e o retorno de  $CO_2$  destes para os pulmões, no entanto, essa troca só é possível, pois os eritrócitos contêm uma proteína especializada, a hemoglobina. A hemoglobina é então uma proteína constituída por quatro cadeias polipeptídicas, as globinas, e cada uma delas contém o seu próprio grupo *heme*<sup>30</sup>.

O sangue de um adulto contém, normalmente, três tipos de hemoglobina, sendo que a variante de hemoglobina que predomina é a HbA, com estrutura molecular  $\alpha_2\beta_2$ . As variantes de hemoglobina presentes em menor quantidade contêm cadeias de globina  $\gamma$  (Hb fetal ou HbF) ou  $\delta$  (HbA2) em vez de  $\beta$ . No entanto, podem ainda existir outras variantes de hemoglobina que surgem de mutações em genes que codificam para as cadeias de globina, causando distúrbios genéticos da hemoglobina<sup>30</sup>.

- Metodologia: A determinação de Hb em sangue total é feita usando o método SLS<sup>22</sup>.

- Limitações/interferências: Podem ser encontrados resultados falsamente elevados para este parâmetro quando a amostra utilizada estiver lipémica ou na presença de leucocitose ou proteína anormal<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Os valores para este parâmetro são dependentes do gênero, idade e origem étnica do indivíduo, pelo que se deve ter isso em conta quando é feita a interpretação dos resultados. Posto isto, níveis de hemoglobina acima dos valores de referência para o indivíduo podem ser o resultado de desidratação, excesso de produção de eritrócitos pela medula óssea, doença pulmonar grave, entre outras condições mais específicas<sup>32</sup>.

Por outro lado, um nível baixo de Hb, frequentemente denominado de anemia, pode ser o resultado de deficiências nutricionais, nomeadamente, de ferro e vitaminas, especificamente a vitamina B12, mas também de hemorragias, doenças renais, distúrbios inflamatórios (artrite reumatoide ou infeções), hemólise, distúrbios genéticos hereditários (talassemias ou drepanocitose), cirrose hepática, insuficiências ou tumores da medula óssea<sup>32</sup>.

### **Hematócrito (HCT)**

O hematócrito é a medida do volume ocupado pelos eritrócitos no volume total de sangue e é expresso em percentagem<sup>33</sup>.

- Metodologia: Este parâmetro é calculado ao mesmo tempo que RBC, pelo método de deteção de altura do impulso de RBC<sup>22</sup>.

- Limitações/interferências: Resultados erroneamente baixos de hematócrito podem ser observados em amostras com agregados de eritrócitos (aglutininas frias), microeritrócitos ou fragmentos de eritrócitos. Por outro lado, resultados falsamente elevados podem estar presentes em amostras com leucocitose, esferocitose, uremia ou com valores de glucose extremamente elevados<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: O hematócrito é um parâmetro dependente de vários outros, isto é, sofre variações juntamente com outros parâmetros do hemograma. Isto acontece, por exemplo, nos casos de desidratação, onde o volume do plasma é reduzido e conseqüentemente os valores de HCT aumentam. No entanto, também nos casos em que haja um aumento de eritrócitos em circulação (poliglobulia), o valor do HCT é elevado, como o que acontece em indivíduos com policitemia (primária ou secundária)<sup>33</sup>.

Em oposição, o HCT encontra-se diminuído em indivíduos com anemia, hemorragias, deficiências minerais e vitamínicas, com condições inflamatórias, doença renal (causando a diminuição da secreção de eritropoetina e a conseqüente diminuição da produção de eritrócitos), cirrose, hemólise, distúrbios da medula óssea (anemia aplásica, síndrome mielodisplásica, leucemia, linfoma ou mieloma) e pela administração de alguns medicamentos de quimioterapia<sup>33</sup>.

### **Volume Corpuscular Médio (VCM)**

O Volume Corpuscular Médio é o índice hematimétrico que indica o volume médio dos eritrócitos numa amostra de sangue total<sup>34</sup>. Esta constante é expressa em fentolitros (fl) e calculada a partir da RBC e do HCT, utilizando a seguinte fórmula<sup>22</sup>:

$$MCV (fl) = \frac{HCT (\%)}{RBC (\times 10^6 / \mu l)} \times 10$$

▪ Interpretação clínica: Nos casos em que este parâmetro se encontra diminuído, normal, ou elevado os eritrócitos são designados de microcíticos, normocíticos ou macrocíticos, respetivamente. Quando não existe um predomínio de tamanho é frequente utilizar-se a designação de anisocitose<sup>34</sup>.

O VCM pode estar fora dos limites de referência para adulto em duas situações fisiológicas que devem ser consideradas antes do diagnóstico: no recém-nascido, onde o VCM se encontra elevado nas primeiras semanas de vida e diminuído no lactente até um ano de vida, aumentando progressivamente ao longo da infância até atingir os níveis normais de adulto; na gravidez, onde ocorre um leve aumento desta constante.

Este parâmetro encontra-se normalmente diminuído em casos de anemias ferropénicas, ou seja, por carência de ferro, mas também em indivíduos com talassemias, e aumentado em indivíduos com anemia megaloblástica, ou seja, anemia provocada por deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico. Este parâmetro poderá estar alterado em muitas outras doenças, como doenças hepáticas e tiroidismo. Contudo, um valor normal de VCM não exclui a presença de patologias graves, pelo que é importante a sua interpretação juntamente com os outros parâmetros do hemograma, mas também com a sintomatologia e as evidências clínicas do indivíduo<sup>30</sup>.

### **Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)**

A Hemoglobina Corpuscular Média é o índice hematimétrico que mede a quantidade de hemoglobina presente dentro do eritrócito<sup>34</sup>. O MCH é expresso em picogramas (pg) e é calculado a partir da RBC e da HBG, utilizando a seguinte fórmula<sup>22</sup>:

$$MCH (pg) = \frac{HBG (g/dl)}{RBC (\times 10^6 / \mu l)} \times 10$$

▪ Interpretação clínica: Dependendo dos valores obtidos para este parâmetro, os eritrócitos podem ser classificados como hipocrômicos, se os valores estiverem abaixo dos valores de referência e normocrômicos, se estiverem contidos nesse intervalo<sup>34</sup>.

Assim como todas as constantes eritrocitárias, também o MCH deverá ser interpretado juntamente com os outros parâmetros que compõem o hemograma. No entanto, é frequente que se observe um valor elevado de MCH quando estão presentes esferócitos, ou seja eritrócitos de forma oval, normalmente associados a patologias como esferocitose, disfunção da tireoide e alcoolismo. Os valores reduzidos estão presentes em casos de anemias hipocrômicas e podem ser explicados por defeitos na síntese de hemoglobina<sup>30</sup>.

### **Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC)**

A concentração de Hemoglobina Globular Média é a constante eritrocitária que indica a concentração média de hemoglobina do indivíduo por unidade de volume de eritrócitos<sup>34</sup>. A MCHC expressa-se em g/dl e é calculada a partir do HCT e HGB, utilizando a seguinte fórmula<sup>22</sup>:

$$MCHC (g/dl) = \frac{HGB (g/dl)}{HCT (\%)} \times 100$$

### **RDW**

O RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*, ou em português largura da distribuição de eritrócitos, é o índice que avalia a variação da distribuição do volume eritrocitário<sup>34</sup>.

▪ Metodologia: Este parâmetro é calculado com base na detecção de frequências relativas diferentes em cada nível de discriminador (alto ou baixo)<sup>22</sup>.

▪ Interpretação clínica: Quando os valores deste parâmetro se encontram elevados, significa que o tamanho dos eritrócitos em circulação é discrepante, ou seja, existe anisocitose. Estes valores são, normalmente, evidentes em hemogramas de indivíduos com anemia ferropénica, anemia megaloblástica, talassemia, doenças do fígado ou ainda em indivíduos que estejam a fazer quimioterapia ou antiviral. Estes valores podem ainda indicar que existem problemas de morfologia nos eritrócitos<sup>35</sup>.

## **Eritroblastos (ERT)**

Os eritroblastos são as células precursoras dos eritrócitos ainda nucleadas e que podem ser classificados em proeritroblastos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos. Esta classificação é feita com base na relação núcleo-citoplasma, tamanho da célula e basofilia do citoplasma, que diminuem à medida que a célula se torna mais madura<sup>36</sup>.

- Metodologia: A contagem de eritroblastos é feita pelo método de citometria de fluxo, usando o canal de análise WNR do equipamento<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: A presença de eritroblastos no sangue periférico normalmente é detetada, em condições não fisiológicas, como prognóstico de processos hemolíticos e pós hemorragias agudas, sendo característico de um processo reacional do organismo. No entanto, a presença destas células imaturas em indivíduos que não apresentem doenças hemolíticas ou não sofreram hemorragias agudas, é considerado um marcador de mau prognóstico, podendo ser indicativo de síndrome mielodisplásica<sup>37</sup>.

## **Leucócitos (WBC)**

Os leucócitos são um grupo de células que tem como principal função a defesa do organismo contra agentes estranhos e potencialmente patogênicos. As células que constituem este grupo são formadas a partir de células precursoras diferentes e cada uma tem uma função específica<sup>38</sup>.

Os leucócitos podem ser divididos e classificados de várias formas, isto é, a classificação pode ser feita de acordo com a forma do núcleo (polimorfonucleares – núcleo segmentado, ou mononucleares – núcleo não segmentado), de acordo com o tipo de granulações citoplasmáticas (granulócitos ou “agranulócitos”) e de acordo com o local de origem (mieloides – se foram formados na medula óssea e linfoides – se o seu desenvolvimento não está restrito à medula óssea, mas também a outros órgãos)<sup>30</sup>.

O número total de leucócitos no sangue periférico de adultos saudáveis varia entre, aproximadamente, 4 a  $12 \times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$  e só devem estar presentes os leucócitos maduros (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). A contagem absoluta de cada categoria de leucócitos no sangue periférico tem importante significado clínico<sup>38</sup>.

- Metodologia: A contagem total de leucócitos é feita por citometria de fluxo com análise no canal WPC do equipamento<sup>22</sup>.

- Limitações/interferências: Os resultados de amostras de sangue que contenham agregados leucocitários podem estar falsamente baixos para este parâmetro. Em oposição, estes resultados podem estar elevados erroneamente em casos de amostras com crioproteínas e

crioglobulinas, fibrina, gigantoblastos e agregados plaquetares. No caso de líquidos biológicos, interferências como a presença de leveduras, assim como, a presença de lipossomas, no LCR, pode resultar em valores falsamente elevados para este parâmetro<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Para distinguir entre os vários tipos de doença relacionadas com os leucócitos é essencial determinar, quer o seu número, quer o tipo exato e o seu grau de maturação em circulação.

De um modo geral, as patologias leucocitárias podem resultar de doença reativa ou não reativa (maligna), sendo que as primeiras são observadas no curso de doenças infecciosas ou inflamatórias, enquanto que as alterações malignas são normalmente indicadoras de leucemias, linfomas e outras doenças hematológicas malignas. No entanto, nas patologias leucocitárias, fazer o diagnóstico correto requer que seja considerada toda a informação disponível a partir do hemograma completo, morfologia, imunofenotipagem e outros testes complementares.

### **Neutrófilos (NE)**

Os neutrófilos são glóbulos brancos implicados na resposta imunitária celular não-específica, ou seja, contribuem para a eliminação dos agentes infecciosos do organismo. Especificamente, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra bactérias patogénicas e limitam o desenvolvimento de microrganismos, até que os leucócitos mais eficientes (linfócitos e macrófagos) os removam<sup>30</sup>.

Estas células têm um núcleo denso e lobulado (dois a cinco lobos) e um citoplasma que contém grânulos secundários<sup>30</sup>.

- Metodologia: Esta contagem é feita usando o método de citometria de fluxo e o canal de análise WDF. Este canal é um canal de classificação de leucócitos e permite a obtenção de um diagrama bidimensional que representa a luz fluorescente detetada lateralmente (SFL) em função da luz dispersa para o lado (SSC). A SFL fornece informações sobre o volume/tamanho das células sanguíneas analisadas e a SSC fornece informações sobre o conteúdo celular, como o tamanho do núcleo e a presença de grânulos. Este diagrama é utilizado no contexto laboratorial para observar e identificar as populações de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos, como mostra a figura seguinte<sup>22</sup>:

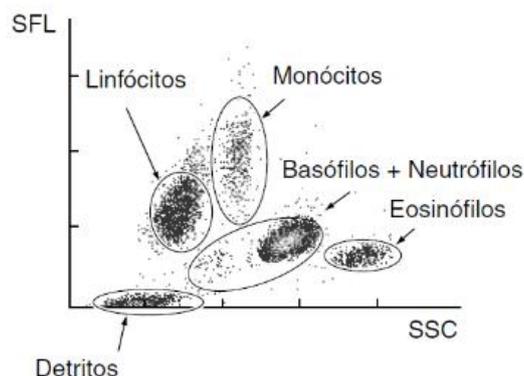


Figura 13: Diagrama bidimensional SFL em função de SSC.  
 Fonte: *XN series* - Instruções de Utilização<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: A contagem de neutrófilos, no hemograma, é apresentada em forma de contagem absoluta ou em percentagem<sup>30</sup>.

O aumento do número de neutrófilos circulantes é uma das alterações mais comuns no hemograma e é designada de neutrofilia. As causas mais frequentes para este aumento são as infecções bacterianas, especialmente por bactérias piogénicas, mas também pode ser originada por processos inflamatórios ou necrose tecidual (como miosite, vasculite, enfarte do miocárdio ou traumatismo), doenças metabólicas (como, por exemplo, uremia, eclâmpsia, acidose metabólica ou gota), neoplasias (carcinoma, linfoma, melanoma), hemorragia ou hemólise agudas, ou pode ser provocada por fármacos (corticosteroides, lítio, tetraciclina). A neutrofilia também está presente em indivíduos com leucemia mieloide crónica (LMC) ou com neoplasias mieloproliferativas, como a policitemia vera, mielofibrose e trombocitemia essencial<sup>30</sup>.

Por outro lado, quando a contagem absoluta de neutrófilos diminui para valores inferiores aos do intervalo de referência para este parâmetro, diz-se que o indivíduo possui uma neutropenia. A neutropenia pode ser seletiva ou parte de uma pancitopenia global, sendo que a neutropenia seletiva pode ainda ser dividida em congénita (Síndrome de Kostmann) ou adquirida. A neutropenia adquirida pode resultar da indução por fármacos (anti-inflamatórios, antibacterianos, anticonvulsivantes, antitiroideos, entre outros), de doenças imunológicas (doenças autoimunes, lúpus eritematoso sistémico, Síndrome de Felty, hipersensibilidade e anafilaxia), infecções virais (hepatite, gripe, vírus da imunodeficiência humana - HIV) ou infecções bacterianas fulminantes (febre tifoide e tuberculose miliar)<sup>30</sup>.

## **Linfócitos (LY)**

Linfócitos são células imunologicamente competentes que auxiliam na defesa do organismo, distinguindo as células do organismo, dos agentes potencialmente patológicos. Estes agentes possuem antígenos, facto que permite a sua identificação pelos linfócitos, ou seja, cada linfócito só é estimulado na presença de um antígeno específico<sup>38</sup>.

Esta resposta imunológica depende de três tipos de linfócitos, os linfócitos B, linfócitos T e células NK (*natural killer*). Os linfócitos B maturam na medula óssea e circulam no sangue periférico até adquirirem capacidade de reconhecimento do antígeno. Reconhecido um antígeno, estas células maturam para linfócitos B de memória ou plasmócitos, caso se encontrem nos tecidos. Por outro lado, os linfócitos T surgem da maturação de células-tronco hematopoiéticas que passam do córtex para a medula do timo. Existem ainda dois tipos de linfócitos T, os linfócitos T *helper*, que expressam a glicoproteína de superfície CD4, e os linfócitos T citotóxicos, que expressam CD8<sup>30</sup>.

Em relação aos órgãos linfoides, estes podem ser separados em dois tipos: primários e secundários, consoante as funções que desenvolvem no processo imunológico dos linfócitos. Após o nascimento, a medula óssea e o timo compõem os órgãos linfoides primários, onde se desenvolvem os linfócitos. Os órgãos linfoides secundários, nos quais são geradas as respostas imunológicas específicas, são os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides dos tratos digestivo e respiratório<sup>30</sup>.

- Metodologia: Os linfócitos são contados por citometria de fluxo, com o auxílio do canal de análise WDF<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: A contagem de linfócitos pode estar elevada (linfocitose) em infeções agudas, normalmente de origem viral, como mononucleose infecciosa, rubéola, hepatite e infeções provocadas pelos vírus HIV, Herpes *simplex* (HSV) ou citomegalovírus (CMV). A linfocitose pode ser ainda causada por infeções crónicas, como a tuberculose, sífilis, toxoplasmose ou em leucemias linfoides crónicas, leucemia linfoblástica aguda, linfomas ou tireotoxicose<sup>30</sup>.

Os valores para este parâmetro podem estar ainda diminuídos (linfopenia), o que é frequente ocorrer em casos de insuficiência grave da medula óssea, em indivíduos em tratamento com corticosteroides ou outros imunodepressores, no linfoma de Hodgkin ou em síndromes de imunodeficiência, como o caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)<sup>30</sup>.

## **Monócitos (MO)**

Os monócitos desempenham um papel chave na resposta imunitária, pois podem deslocar-se facilmente para os locais de infecção. Os monócitos permanecem pouco tempo na medula óssea e andam em circulação apenas entre vinte a quarenta horas. Depois disso, deixam o sangue para migrar para os tecidos, onde amadurecem e desempenham as suas principais funções<sup>30</sup>. Esta diferenciação dá origem aos macrófagos, nos tecidos, ou a células dendríticas, responsáveis pela fagocitose de agentes patogénicos e a sua decomposição em antigénios, que são posteriormente apresentados à superfície destas células, de modo a serem reconhecidos pelos linfócitos<sup>38</sup>.

Quanto à sua morfologia, os monócitos são maiores quando comparados com os demais leucócitos do sangue periférico e têm um núcleo grande, central, normalmente oval, com uma densa cromatina. Em relação ao citoplasma, este é abundante, cora de azul e contém vacúolos<sup>30</sup>.

- Metodologia: A contagem de monócitos é feita por citometria de fluxo, com o auxílio do canal de análise WDF<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: A monocitose, ou seja, a presença de uma contagem elevada de monócitos, pode ser causada por infeções bacterianas crónicas (como a tuberculose, endocardite bacteriana ou febre tifoide), doenças do tecido conectivo (lúpus eritematoso sistémico, arterite temporal, artrite reumatoide), infeções por protozoários, neutropenia crónica, linfomas de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica crónica ou outros tumores malignos<sup>30</sup>.

Por outro lado, a contagem de monócitos pode estar diminuída e originar uma monocitopenia, em qualquer caso de imunossupressão<sup>30</sup>.

## **Eosinófilos (EO)**

Os eosinófilos são morfologicamente semelhantes aos neutrófilos. As diferenças prendem-se no facto dos eosinófilos possuírem grânulos citoplasmáticos maiores que os neutrófilos e que coram de vermelho-alaranjado intenso, para além de que raramente apresentam mais do que três lobos nucleares. Contudo, tanto os eosinófilos, como os neutrófilos são capazes de ir ao encontro e fagocitar qualquer agente potencialmente patológico para o organismo<sup>30</sup>.

Este tipo de leucócitos penetra facilmente em exsudados inflamatórios e têm um papel especial nas respostas alérgicas, na resposta imunológica contra parasitas e na remoção de fibrina formada durante a inflamação<sup>30</sup>.

- **Metodologia:** Este parâmetro é determinado por citometria de fluxo e analisado no canal WDF<sup>22</sup>.

- **Interpretação clínica:** A eosinofilia é a contagem elevada de eosinófilos em circulação e pode ser provocada por doença alérgica, especialmente hipersensibilidade do tipo atópico (asma brônquica, febre do feno, urticária e hipersensibilidade a alimentos), infecções parasitárias (amebíase, ancilostomose, estrogiloidíase, ascaridíase, teníase, filariose, esquistossomose e triquinose) e certas doenças de pele (psoríase, dermatite herpetiforme, urticária, angioedema, dermatite atópica). A eosinofilia pode ainda surgir na recuperação de uma infecção aguda ou resultante de uma sensibilidade a fármacos, doença do enxerto contra o hospedeiro, pericardite nodosa, linfoma de Hodgkin e noutros tumores, especialmente distúrbios clonais de células T, tumores metastáticos com necrose tumoral, síndrome hipereosinofílica, leucemia eosinofílica crónica, neoplasias mieloproliferativas ou síndromes pulmonares (pneumonia eosinofílica, infiltrados pulmonares transitórios – Síndrome de Loeffler, granulomatose alérgica – Síndrome de Churg-Strauss, eosinofilia pulmonar tropical)<sup>30</sup>.

Uma baixa contagem de eosinófilos no sangue, ou seja, a presença de eosinopenia, pode aparecer em indivíduos com Síndrome de Cushing, com sépsis, ou em tratamento com corticosteroides. Esta redução, normalmente, não causa problemas pois outras partes do sistema imunológico compensam a falta destas células<sup>30</sup>.

### **Basófilos (BA)**

Os basófilos são encontrados no sangue periférico, normalmente, em percentagem muito baixa em relação aos demais leucócitos. Morfologicamente, estas células têm numerosos grânulos citoplasmáticos, escuros e que contêm heparina e histamina. Nos tecidos, os basófilos transformam-se em mastócitos, exercendo a sua função em processos como a quimiotaxia ou adesão celular. A sua atuação nestes processos só é possível devido ao facto de possuírem locais de ligação a imunoglobulina (Ig) E e de libertarem o conteúdo dos seus grânulos sempre que necessário<sup>30</sup>.

- **Metodologia:** Os basófilos são contados usando o mesmo método que os restantes leucócitos, ou seja, por citometria de fluxo, no entanto, a sua análise é feita no canal WNR<sup>22</sup>.

- **Interpretação clínica:** A deteção de basofilia é útil na diferenciação entre as síndromes mieloproliferativas e condições reacionais, já que somente nas primeiras, e em algumas leucemias, é possível observar um aumento acentuado da contagem de basófilos<sup>39</sup>.

A principal causa do aumento dos basófilos é a LMC e, neste caso, o aumento dos basófilos é importante para o prognóstico visto que, normalmente, indica fase acelerada da doença e transformação blástica iminente<sup>39</sup>.

Existe ainda a leucemia basofílica, no entanto, é rara e frequentemente cromossoma *Philadelphia* positivo, sendo considerada uma variante da LMC<sup>39</sup>.

Pode ainda ocorrer basofilia reacional, que é observada, por vezes, em indivíduos com mixedema, varíola, varicela ou com colite ulcerativa<sup>30</sup>.

### **Plaquetas (PLT)**

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, uma das maiores células do organismo. O megacariócito amadurece por replicação endomitótica sincrónica, ou seja, ocorre a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) sem haver divisão nuclear ou citoplasmática, o que faz com que haja um aumento do volume do citoplasma à medida que o número de lobos nucleares aumenta. Este aumento, por sua vez, origina uma fragmentação das extremidades das extensões do citoplasma, dando origem às plaquetas<sup>30</sup>.

As plaquetas são células pequenas e discoides com um volume médio de 7 a 11 fl e a sua principal função é a formação do tampão plaquetar durante a resposta hemostática à lesão vascular. Para que ocorra a imobilização das plaquetas para os sítios de lesão é necessário que ocorram interações específicas plaqueta-parede vascular (reações de adesão) e plaqueta-plaqueta (reações de agregação), ambas parcialmente mediadas pelo fator de von Willebrand<sup>30</sup>.

▪ Metodologia: A contagem de plaquetas pode ser determinada por diferentes princípios e tecnologias como a impedância (PLT-I) e, nalguns casos, método ótico (PLT-O) ou fluorescência (PLT-F). O método normalmente usado no CHMT é a determinação por impedância, no entanto, quando os valores se encontram fora do intervalo de referência as plaquetas são também determinadas pelo método ótico, que servirá como método de confirmação interno do laboratório.

A contagem de plaquetas determinada por impedância é calculada, normalmente, como uma contagem de partículas entre dois discriminadores, do mesmo modo que a contagem de eritrócitos. No entanto, os discriminadores estão configurados para uma gama de intervalos mais baixa para que seja possível esta determinação<sup>22</sup>.

▪ Limitações/interferências: Resultados falsamente elevados podem ocorrer quando se encontram presentes na amostra microeritrócitos, fragmentos de eritrócitos ou leucócitos, crioproteínas ou crioglobulinas. Por outro lado, os resultados da contagem de plaquetas podem

encontrar-se falsamente diminuídos em quadros de pseudotrombocitopenia e quando a amostra contém coágulos ou gigantoblastos<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Contagens baixas de plaquetas são, normalmente, designadas de trombocitopenias e podem ser o resultado de uma insuficiência na produção de plaquetas, aumento do seu consumo, distribuição anormal (causada por esplenomegalia) ou por perda devido à sua diluição, em casos de transfusões massivas<sup>30</sup>.

A insuficiência de produção de plaquetas poderá indicar que existe uma depressão seletiva de megacariócitos devido a defeitos congénitos, ou provocada por fármacos, agentes químicos ou infeções de etiologia viral. No entanto, esta perda também poderá indicar uma disfunção da medula óssea devido a leucemia, linfoma, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo, anemia megaloblástica, entre outras patologias<sup>30</sup>.

No caso do aumento do consumo de plaquetas, poderá ter origem imunológica associada a doença autoimune, lúpus eritematoso sistémico, leucemia linfocítica crónica (LLC) ou linfoma ou ser causado por infeções por *Helicobacter pylori*, HIV, vírus da hepatite C (HCV) ou *Plasmodium spp.*. Este aumento poderá ser ainda induzido por fármacos como a heparina ou estar presente na púrpura pós-transfusional, trombocitopenia aloimune materno-fetal, coagulação intravascular disseminada (CID) ou púrpura trombocitopénica trombótica<sup>30</sup>.

Quando ocorre um aumento do número de plaquetas em circulação, estamos perante uma trombocitose. A trombocitose poderá ser classificada como primária, como o caso da trombocitemia essencial, ou reativa/secundária, normalmente, causada por doenças inflamatórias crónicas, infeção aguda, hemorragia, deficiência de ferro, hemólise, cancro, esplenectomia ou hipoesplenismo. A contagem de plaquetas nas trombocitemias secundárias, normalmente, diminui para valores normais quando o distúrbio subjacente é tratado<sup>40</sup>.

### **Plaquetócrito (PCT)**

O plaquetócrito é também chamado de hematócrito plaquetário e é calculado da mesma forma que o hematócrito, ou seja, é o rácio entre o volume plaquetário e o volume total de amostra<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Os valores do plaquetócrito variam consoante a alteração da contagem de plaquetas, pelo que deve ser interpretado em conjunto com os restantes parâmetros relativos à avaliação das plaquetas.

## **Volume plaquetário médio (VPM)**

O Volume Plaquetário Médio (VPM) corresponde à média do volume das plaquetas e é calculado com base nos valores do plaquetócrito e contagem de plaquetas, utilizando a seguinte fórmula<sup>22</sup>:

$$MPV (fl) = \frac{PCT (\%)}{PLT (\times 10^3 / \mu l)} \times 10\,000$$

- Interpretação clínica: O VPM é um marcador essencial para avaliar a atividade e função plaquetárias, sendo muito importante na interpretação de diversas desordens clínicas de origem hematológica ou não, tais como, diabetes *mellitus*, enfarte agudo do miocárdio, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, entre outras doenças onco-hematológicas, assim como, na avaliação da resposta medular em determinados casos<sup>41</sup>.

## **PDW**

O PDW, do inglês *Platelet Distribution Width*, é o equivalente ao RDW da série vermelha, ou seja, é a largura de distribuição volumétrica das plaquetas. Este índice avalia a variação de tamanho entre a população de plaquetas, isto é, mede a diferença entre a plaqueta de menor e maior tamanho analisadas.

- Metodologia: A partir do gráfico gerado após a contagem de plaquetas entre os dois discriminadores, e com a altura máxima do pico considerada como 100%, a largura de distribuição para uma frequência de 20% é considerada o PDW, medido em fentolitros<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: Quando os valores deste índice se encontram elevados, significa que o tamanho das plaquetas em circulação é discrepante, ou seja, existe uma anisocitose plaquetar<sup>35</sup>.

## **P-LCR**

O P-LCR, do inglês *Platelet Large Cell Ratio*, que significa rácio de plaquetas grandes, é calculado dividindo o número de partículas contadas entre o discriminador fixo e o discriminador alto pelo número de partículas contadas entre o discriminado baixo e o discriminador alto<sup>22</sup>.

- Interpretação clínica: O P-LCR demonstra a proporção de plaquetas com volume a acima de 12 fl em relação à contagem total de plaquetas, o que se torna num parâmetro útil na deteção de macroplaquetas e plaquetas gigantes<sup>22</sup>.

## HEMOGRAMA COMPLETO COM RETICULÓCITOS

Para além do hemograma completo, já descrito anteriormente, é também frequente o clínico pedir a contagem de reticulócitos e, neste caso, a etiqueta presente nos tubos de colheita apresenta uma chamada de atenção para que o TSDT saiba que aquela amostra é para ser processada no equipamento programado para o efeito, ou seja, no equipamento *XN-1000* da *SYSMEX* número 1, do laboratório central do CHMT.

### Reticulócitos (RET)

Os reticulócitos são hemácias imaturas formadas através da diferenciação das células-tronco na medula óssea. As células-tronco, inicialmente, produzem eritroblastos, que começam a produzir hemoglobina e que acabam por perder o núcleo nos últimos estádios de maturação antes de se formarem os eritrócitos. Assim, os reticulócitos são um estadio intermédio de maturação, entre os eritroblastos e os eritrócitos, sem núcleo, mas ainda com algum conteúdo de ácidos nucleicos no citoplasma, o que lhes confere uma coloração mais azul quando visualizados num esfregaço de sangue periférico corado com a coloração de May-Grünwald-Giemsa<sup>42</sup>.

- **Metodologia:** A contagem (RET#) e o rácio (RET%) de reticulócitos são calculados com base na análise do diagrama obtido no canal RET do equipamento<sup>22</sup>.
- **Limitações/interferências:** O sistema poderá indicar erroneamente uma alta contagem de reticulócitos se estiverem presentes agregados de eritrócitos (aglutininas frias), gigantoblastos, coágulos, leucócitos fragmentados, eritrócitos parasitados com *Plasmodium spp.* e corpos de Howell-Jolly<sup>22</sup>.
- **Interpretação clínica:** A contagem de reticulócitos reflete a atividade recente da medula óssea, ou seja, indica se esta responde de modo adequado à necessidade do aumento de produção de eritrócitos. Se a resposta for eficaz existirá uma libertação de células menos maduras (reticulócitos) na circulação<sup>42</sup>.

Assim, um aumento da percentagem de reticulócitos pode indicar: hemorragia, pois o número de reticulócitos aumenta alguns dias depois do episódio hemorrágico, de modo a compensar a perda de hemácias; perda de sangue crónica, o que faz com que o número de reticulócitos permaneça elevado, enquanto a medula óssea colmata as necessidades de produção; anemia hemolítica; doença hemolítica do recém-nascido. Caso a medula óssea seja incapaz de suprir as necessidades, o número de reticulócitos pode permanecer normal, pouco aumentado ou até diminuir devido à falta de produção de eritrócitos<sup>42</sup>.

Por outro lado, a diminuição da percentagem de reticulócitos pode ser vista, por exemplo, em casos de anemia ferropénica, anemia perniciosa ou deficiência de ácido fólico, anemia aplástica, ou em indivíduos que estejam sujeitos radioterapia, ou com inibição da medula óssea por infeção ou cancro<sup>42</sup>.

É importante salientar ainda que a contagem de reticulócitos é também usada para monitorizar a eficácia do tratamento como, por exemplo, após quimioterapia, transplante de medula óssea ou tratamento de deficiências de ferro, vitamina B12 ou ácido fólico<sup>42</sup>.

## **HEMOGRAMA COMPLETO COM ESTUDO DO SANGUE PERIFÉRICO**

O clínico pode ainda pedir o estudo do sangue periférico, juntamente com o hemograma completo, por ser parte essencial da investigação hematológica. Este estudo tem como objetivo avaliar potenciais alterações morfológicas das células sanguíneas ou analisar a presença de células não frequentes no sangue periférico como, por exemplo, blastos ou outros precursores hematológicos<sup>30</sup>.

O estudo do sangue periférico é feito, no CHMT, por análise microscópica de um esfregaço de sangue corado, realizada por um TSS ou MPC. O esfregaço deverá ser feito sobre uma lâmina de vidro e o sangue distendido em camada fina sobre a lâmina, de modo a que seja possível observar os bordos laterais e uma “franja” na extremidade. Depois de seco, o esfregaço é corado pela coloração de May-Grünwald-Giemsa, com a ajuda do corador automático *RAL STAINER* da *RAL DIAGNOSTICS*.

Normalmente, no CHMT, juntamente com este estudo, são pedidos alguns tipos de análises mais específicas, como a pesquisa de células falciformes, acantócitos e esquizócitos ou a pesquisa de *Plasmodium spp.*, agente causal da malária.

## **VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO**

A velocidade de sedimentação (VS) é um teste hematológico que mede a taxa com que os glóbulos vermelhos, presentes numa suspensão de sangue total, sedimentam e se separam do plasma, num determinado período.

- Metodologia: A determinação da VS é feita através do método de microaglutinação, que avalia a interação dos eritrócitos com proteínas plasmáticas inflamatórias num curto espaço de tempo. Os impulsos elétricos formados estão diretamente relacionados à agregação dos eritrócitos<sup>43</sup>.

- Equipamento: *TEST 1 - THL* da *ALIFAX*.
- Interpretação clínica: A VS aumenta quando o nível de certas proteínas aumenta em circulação, especialmente proteínas de fase aguda, como a Proteína C reativa e o fibrinogénio, normalmente, aumentados em resposta a quadros inflamatórios.

A VS é um teste não específico, que pode estar aumentado em diversos estados clínicos, o que faz com que apenas forneça informações gerais sobre a presença ou ausência de estado inflamatório. Este teste é normalmente indicado para diagnóstico e acompanhamento de arterite temporal, vasculites sistémicas e polimialgia reumática, estando particularmente aumentada em indivíduos com doença reumática<sup>44</sup>.

### **4.1.3. Análises Hemóstase**

A palavra hemóstase vem do grego, *haeme*, que quer dizer sangue e, *stasis*, que significa parar. A hemóstase é, portanto, um conjunto que eventos mecânicos e bioquímicos que ocorrem de forma a garantir a fluidez do sangue e a integridade dos vasos sanguíneos quando ocorre uma lesão vascular. Este processo ocorre em três etapas fundamentais: a hemóstase primária, com a contração vascular no local da lesão e a formação do tampão plaquetário; a hemóstase propriamente dita, ou seja, a ativação da cascata de coagulação com a consequente formação do coágulo; e a fibrinólise, onde ocorre a retração do coágulo após a integridade do vaso sanguíneo ser restaurada<sup>45</sup>.

De grosso modo, a cascata de coagulação é formada por fatores da coagulação, que são os principais responsáveis pelo processo da coagulação<sup>45</sup>. A maioria dos fatores de coagulação são precursores de enzimas proteolíticas, conhecidas como zimogénios, que circulam na forma inativa. A ativação de cada zimogénio é representada pelo sufixo "a" no número romano que identifica o fator específico e acontece após os fatores inativos sofrerem uma modificação pós-tradução (carboxilação dependente da vitamina K), que permite que o cálcio e outros catiões divalentes se liguem a estes fatores e os ative<sup>46</sup>.

Através das interações dos fatores da coagulação ativos e das reações que estes provocam, o fibrinogénio (solúvel), presente normalmente em circulação, converte-se em fibrina, formando uma rede insolúvel que estabiliza o tampão plaquetário e promove a formação do coágulo. Para que isso aconteça, a cascata da coagulação pode ser ativada por duas vias distintas: a via intrínseca e a via extrínseca, que convergem numa via comum<sup>45</sup>.

O processo de coagulação está ainda sob o controle inibitório de vários fatores, que têm como função limitar a formação de coágulos, evitando assim a propagação do trombo (fibrinólise)<sup>46</sup>.

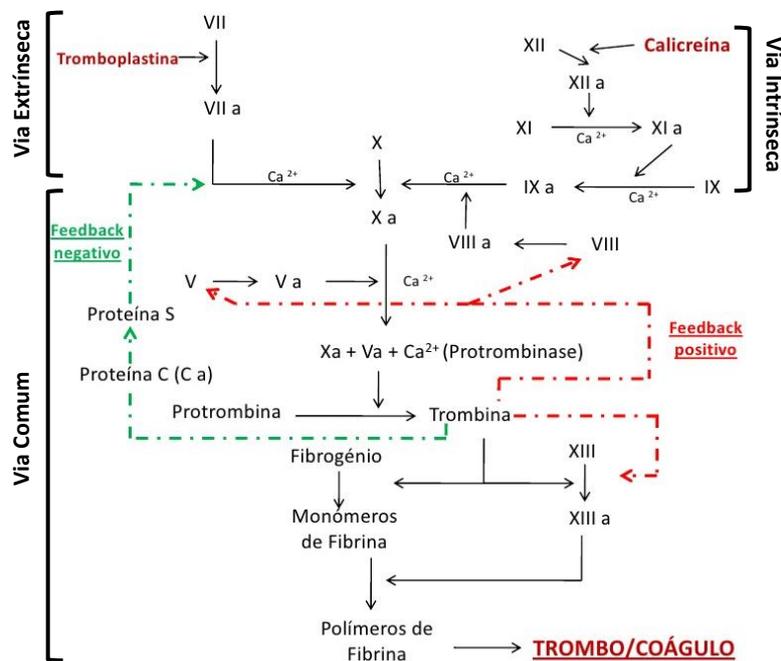


Figura 14: Cascata da coagulação.  
Fonte: Adaptado de Cascata de coagulação<sup>47</sup>.

- **Amostra:** Plasma pobre em plaquetas.
- **Condições de colheita:** A determinação de fatores da coagulação e de outras determinações especiais devem ser efetuadas em plasma pobre em plaquetas, onde o número de plaquetas aconselhado deverá ser inferior ou igual a  $5 \times 10^9/L$ . Esta contagem deverá ser registrada no *modulab* mas não sairá o resultado para o clínico<sup>18</sup>. O tratamento pré-analítico necessário para a obtenção deste tipo de amostra encontra-se descrito na Tabela 2 do subcapítulo 3.7.3. *Tratamento da amostra*.
- **Equipamento:** *ACL TOP<sup>®</sup> 300/500* da *WERFEN*.

## TEMPO DE PROTROMBINA (TP)

A protrombina, ou fator II da coagulação, é uma proteína plasmática sintetizada no fígado, na presença de vitamina K, e precursora da trombina. A protrombina, ao ligar-se à

trombomodulina, ativa o sistema da proteína C que, por sua vez, tem um papel importante no equilíbrio pró-coagulante e/ou anticoagulante<sup>48</sup>.

- Metodologia: Neste ensaio, a adição do regente, formado por tromboplastina tecidual, à amostra de plasma, na presença de íons cálcio, ativa a via extrínseca da coagulação, o que resulta na conversão do fibrinogénio em fibrina, com formação de coágulo. O tempo que decorre para que haja essa formação é medido e corresponde ao tempo de protrombina<sup>49</sup>.

- Limitações/interferências: Podem observar-se interferências entre fármacos e este ensaio, pelo que é necessário ter isso em conta aquando da interpretação dos resultados<sup>49</sup>.

- Interpretação clínica: O tempo de protrombina é normalmente dado em segundos ou transformado em rácio (INR), para uma uniformização de valores entre laboratórios. Assim, o INR é calculado através da seguinte equação<sup>49</sup>:

$$INR = \frac{TP \text{ da amostra}}{Média \text{ do intervalo normal de TP}}$$

O TP é frequentemente usado para avaliar a via extrínseca, formada pelo fator VII, e a via comum, que inclui os fatores X, V, II (protrombina) e I (fibrinogénio)<sup>45</sup>. Assim, caso exista deficiência de algum destes fatores, o TP será prolongado. Contudo, o TP é usado fundamentalmente para a monitorização de indivíduos que estejam em tratamento com anticoagulantes orais. Nestes indivíduos este parâmetro é normalmente elevado e o ajuste da medicação é muitas vezes necessário para manutenção do equilíbrio hemostático<sup>49</sup>.

### **TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT)**

A tromboplastina, também conhecida como fator III ou fator tecidual, é uma glicoproteína com atividade pró-coagulante e o principal ativador da coagulação *in vivo*. Esta proteína está, normalmente, presente no tecido subendotelial e fibroblastos e só é encontrada em circulação quando ocorre a rutura da parede do vaso. No entanto, também pode ser encontrada, em menor quantidade, nos monócitos<sup>46</sup>.

A tromboplastina pode ser ativada de três maneiras distintas: por lesão física, com a ativação do fator da parede do vaso; por lesão vascular direta; ou por lesão funcional através da ativação do fator circulante, em situações de hipoxia, sépsis, inflamação, entre outras<sup>46</sup>.

- Metodologia: A determinação do APTT é feita através da adição de um reagente fosfolipídico sintético que funciona como ativador da via intrínseca da coagulação. O tempo que demora até à formação do coágulo é medido e expresso em segundos<sup>50</sup>.

- Limitações/interferências: Os resultados para este parâmetro podem ser alterados por vários fármacos de administração comum<sup>50</sup>.

- Interpretação clínica: O APTT é o exame laboratorial usado para monitorizar as vias intrínseca e comum, sendo importante, principalmente, para monitorização de doentes que se encontram sob terapêutica com anticoagulantes orais<sup>50</sup>.

O APTT pode estar aumentado devido a défices nos fatores de coagulação, nomeadamente, os pertencentes à via intrínseca (fatores XII, XI, IX e VII) e à via comum (X, V, II e fibrinogénio). Estas deficiências são encontradas, normalmente, em indivíduos com hemofilias A e B, doenças hepáticas e com deficiência de vitamina K. A presença de heparina, anticoagulante lúpico ou outros inibidores da coagulação também pode provocar o aumento do APTT<sup>50</sup>.

## **TEMPO DE TROMBINA**

A trombina é o mediador comum final, tanto da via intrínseca como da extrínseca da coagulação. Esta proteína acelera a ativação plaquetária, assim como a produção dos fatores V, VIII e IX, além de intervir na clivagem proteolítica de fibrinogénio em fibrina. Já formado o coágulo, a trombina liga-se à fibrina e permanece ativa e protegida da inativação, pela antitrombina, até se iniciar o processo de fibrinólise<sup>51</sup>.

A trombina, produzida a partir da protrombina, também tem efeitos pró-inflamatórios, oriundos da ativação de recetores ativadores de proteases presentes nos monócitos, linfócitos, endotélio e células dendríticas<sup>46</sup>.

- Metodologia: Neste ensaio, o fibrinogénio da amostra é convertido em fibrina por adição de trombina bovina purificada e é medido o tempo necessário para a formação do coágulo<sup>52</sup>.

- Limitações/interferências: Os resultados do tempo de trombina podem ser alterados por vários fármacos de administração comum<sup>52</sup>.

- Interpretação clínica: O tempo de trombina é, normalmente, realizado quando existe um prolongamento do TP e APTT, ou seja, quando há suspeita de deficiência dos fatores X, V, protrombina e fibrinogénio. Por outro lado, o tempo de trombina pode ser também usado para a avaliação de indivíduos com suspeita de CID ou para monitorização da terapêutica com heparina ou outros anticoagulantes<sup>52</sup>.

O tempo de trombina pode estar prolongado em indivíduos com sobredosagem de heparina, ou que tenham em circulação produtos de degradação de fibrina. Indivíduos com deficiência de fator XIII, com doença hepática ou com concentrações elevadas de imunoglobulinas também apresentam um tempo mais prolongado que os limites de referência<sup>52</sup>.

## **FIBRINOGENIO**

O fibrinogénio, ou fator I da coagulação, é uma proteína solúvel essencial da coagulação, produzida pelo fígado, e é o precursor da fibrina<sup>46</sup>. A libertação do fibrinogénio em circulação, juntamente com outros fatores, é desencadeada quando há lesão de um vaso sanguíneo e dá início ao processo de homeostasia. No final deste processo, o fibrinogénio é convertido em filamentos insolúveis de fibrina, que reforçam e estabilizam o coágulo plaquetário até que ocorra a cicatrização dos tecidos no local da lesão<sup>53</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de fibrinogénio é feita pelo mesmo ensaio que a determinação do TP, no entanto, o fibrinogénio é determinado medindo a absorvência durante o processo de coagulação e comparando-a com um calibrador<sup>49</sup>.

- Limitações/interferências: Os resultados da análise do fibrinogénio podem sofrer interferências se, na amostra, estiverem presentes produtos de degradação de fibrina ou fibrinogénio<sup>49</sup>.

- Interpretação clínica: O fibrinogénio é um marcador útil na avaliação e monitorização de diversas doenças. Concentrações reduzidas desta proteína em circulação são, normalmente, encontradas em doenças hereditárias, como a afibrinogenemia ou hipofibrinogenemia, e em patologias adquiridas, como doença hepática avançada e desnutrição intensa. Os níveis de fibrinogénio ficam ainda mais reduzidos quando estão presentes patologias como CID, hiperfibrinólise ou após transfusão<sup>53</sup>.

Por outro lado, o fibrinogénio é também uma proteína de fase aguda, o que faz com que os seus níveis em circulação aumentem quando existe inflamação ou lesão tecidual. No entanto, estas elevações são temporárias, pelo que voltam à normalidade assim que desaparecer a causa do quadro inflamatório. São ainda detetadas concentrações elevadas desta proteína em indivíduos com cancro, doença coronária ou enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), distúrbios inflamatórios (arterite reumatoide e glomerulonefrite) e traumatismos<sup>53</sup>.

## **D-DÍMEROS**

O D-dímero é um dos derivados solúveis formados após degradação da rede de fibrina pela plasmina. A plasmina, uma protease de serina, quando não está inibida, digere a fibrina insolúvel, o que dá origem a vários derivados solúveis, com diferentes pesos moleculares, dependendo da extensão da digestão<sup>54</sup>. Assim, os D-dímeros tornam-se indicadores específicos de fibrinólise<sup>46</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de D-dímeros é feita por imunoensaio turbidimétrico<sup>54</sup>.
- Limitações/interferências: O anticorpo monoclonal contido no reagente tem uma grande especificidade para o domínio D-dímero dos produtos de degradação da fibrina com ligações cruzadas, o que poderá causar interferências nos resultados<sup>54</sup>.
- Interpretação clínica: A determinação dos níveis de D-dímero em circulação é uma ferramenta generalizada para o diagnóstico de algumas patologias trombóticas<sup>54</sup>.

Normalmente, os níveis de D-dímero podem estar elevados em indivíduos com trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar e CID. No entanto, é necessário ter atenção aquando a interpretação dos resultados deste parâmetro analítico, pois este também aumenta moderadamente com a idade e durante a gravidez. Neste último caso é necessária atenção redobrada, pois níveis muito elevados estão associados a complicações<sup>54</sup>.

No caso de concentrações baixas de D-dímero em circulação, quando combinadas com uma avaliação clínica pré-teste de baixa probabilidade, têm um valor preditivo negativo elevado para o desenvolvimento de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar<sup>54</sup>.

## **ANTICOAGULANTE LÚPICO**

O anticoagulante lúpico é um autoanticorpo adquirido, encontrado numa variedade de distúrbios autoimunes e, por vezes, em indivíduos saudáveis<sup>55</sup>.

Os anticoagulantes lúpicos pertencem ao grupo dos anticorpos antifosfolipídicos<sup>56</sup> e são imunoglobulinas que se ligam aos fosfolípidos ou complexos fosfolípidos-proteínas que são ativados na coagulação. Estes anticorpos têm a capacidade de prolongar os tempos dos testes dependentes de fosfolípidos, como o TP ou APTT, o que faz com que os indivíduos que os possuem tenham uma predisposição elevada para trombozes e, no caso de mulheres grávidas, para abortos recorrentes no segundo trimestre da gravidez<sup>55</sup>.

- Metodologia: Para o diagnóstico qualitativo da deteção de anticoagulante lúpico, é utilizado o método do veneno diluído da víbora de Russell, na forma de dois ensaios: o *dRVVT*

*Screen* e o *dRVVT Confirm*. No ensaio *dRVVT Screen* o reagente é pobre em fosfolípidos, o que o torna sensível ao anticoagulante lúpico. Em oposição, o excesso de fosfolípidos presente no *dRVVT Confirm* neutraliza o anticoagulante lúpico, o que resulta em tempos de coagulação menores. Após a adição do reagente, o veneno da víbora de Russell, na presença de íons cálcio, ativa diretamente o fator X presente na amostra e, conseqüentemente, a via comum da cascata da coagulação. O tempo necessário para que se forme o coágulo é medido e expresso em segundos<sup>56</sup>.

▪ Interpretação clínica: A interpretação dos resultados deve ser feita através do cálculo do rácio correspondente a cada um dos ensaios. Assim, tanto para o *dRVVT Screen*, como para o *dRVVT Confirm* é calculado o seguinte rácio<sup>56</sup>:

$$dRVVT = \frac{dRVVT \text{ amostra (s)}}{\text{média do intervalo normal do } dRVVT \text{ (s)}}$$

O resultado é obtido através da divisão do rácio do *dRVVT Screen* pelo resultado do rácio do *dRVVT Confirm*, ou seja<sup>56</sup>:

$$\text{Rácio normalizado } dRVVT = \frac{\text{Rácio } dRVVT \text{ Screen}}{\text{Rácio } dRVVT \text{ Confirm}}$$

Caso o rácio normalizado apresente um valor superior a 1,2, o resultado dado ao clínico deverá ser positivo para a presença de anticoagulante lúpico. Caso este rácio se encontre inferior ao valor referido, o resultado apresentado deverá ser negativo. No entanto, estes testes podem ser mais ou menos sensíveis para determinados subgrupos de anticoagulantes lúpicos, pelo que devem ser efetuados, pelo menos dois testes, antes de descartar a possibilidade de o indivíduo ter este anticoagulante<sup>56</sup>.

Os tempos de coagulação dos dois ensaios podem também encontrar-se elevados em indivíduos que estejam a fazer terapêutica anti-vitamina K. Contudo, quando não é esse o caso, devem ser realizados testes de confirmação para investigar deficiências de fatores ou inibidores da cascata da coagulação<sup>56</sup>.

A realização deste teste é fundamental em indivíduos com trombose inexplicada, principalmente se não houver histórico familiar, ou com tromboembolia venosa recorrente, acidentes vasculares cerebrais ou outros eventos arteriais e também em mulheres com perda fetal recorrente no segundo trimestre. Indivíduos com o anticoagulante lúpico quase sempre

apresentam outras anormalidades, causadas pela presença de anticorpos antifosfolípidos, como anticorpos anti-cardiolipina, trombocitopenia e resultados positivos no teste direto de antigobulina e fator antinuclear<sup>55</sup>.

### **ANTITROMBINA III (FUNCIONAL)**

A antitrombina III, também conhecida como cofator I da heparina, é o principal inibidor fisiológico da coagulação<sup>57</sup>. A antitrombina é um inibidor da serina protease responsável pela ligação e inativação da trombina e dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa, sendo que a sua atividade enzimática é aumentada na presença de heparina. Contudo, como a concentração plasmática de heparina é baixa, este anticoagulante não contribui significativamente para a ativação da antitrombina *in vivo*, sendo a antitrombina ativada pela ligação do sulfato de heparina, presente na superfície celular endotelial<sup>46</sup>.

- **Metodologia:** A determinação quantitativa de antitrombina é feita por ensaio cromogéneo cinético<sup>57</sup>.
- **Interpretação clínica:** A determinação deste parâmetro analítico é normalmente utilizada para excluir ou diagnosticar o déficit congênito de antitrombina em indivíduos com tendência para o desenvolvimento de doenças tromboembólicas, CID, síndromes nefróticas ou hepatopatias. É ainda determinada a atividade da antitrombina em indivíduos em estádios pré-operatórios ou antes da prescrição de contraceptivos orais, terapêutica com heparina e concentrados de antitrombina<sup>57</sup>.

### **PROTEÍNA C FUNCIONAL**

A proteína C é uma proteína vitamina K-dependente, que está presente no plasma como zimogénio<sup>58</sup>. Esta proteína é ativada pela trombina, na presença de trombomodulina, para formar a proteína C ativada. A proteína C ativada/funcional, por sua vez, atua inibindo os fatores Va e VIIIa, juntamente com os cofatores proteína S e fosfolípidos. A proteína C tem, por isso, importantes propriedades anticoagulantes, profibrinolíticas e anti-inflamatórias<sup>46</sup>.

- **Metodologia:** A proteína C é ativada quando é adicionado à amostra o reagente que contém a fração proteica derivada de veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*, e a sua quantificação é feita utilizando um substrato cromogéneo sintético, por ensaio imunocromatográfico cinético<sup>58</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras que tenham sido submetidas a ativação por contacto podem apresentar resultados falsamente elevados como, por exemplo, na presença de caliceína. O contrário acontece em amostras de indivíduos tratados com aprotinina, onde os resultados de proteína C podem encontrar-se falsamente diminuídos<sup>58</sup>.

- Interpretação clínica: A diminuição da proteína C, decorrente de causas genéticas ou adquiridas, predispõe os indivíduos a trombose venosa, principalmente adultos jovens. A deficiência genética, normalmente causa tromboembolismos venosos, no entanto, também pode ser a causa de púrpura neonatal fulminante, ou seja, um tipo grave de CID no recém-nascido. Por outro lado, as diminuições adquiridas desta proteína ocorrem em indivíduos com doença hepática ou CID e durante o tratamento com anticoagulante oral<sup>58</sup>.

## **PROTEÍNA S LIVRE: ANTIGÉNICA**

A proteína S é uma glicoproteína vitamina K-dependente, sintetizada por células endoteliais e hepatócitos<sup>46</sup>, que atua como cofator da proteína C ativada, aumentando os seus efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos. A proteína S encontra-se presente no plasma em duas formas: a proteína S livre, que representa cerca de 40% do total desta proteína em circulação e a proteína S ligada à proteína transportadora da fração C4b do complemento (cerca de 60%). Embora as duas formas estejam em equilíbrio dinâmico, apenas a proteína S livre tem atividade biológica<sup>59</sup>. A atividade anticoagulante da proteína S ocorre em virtude da forma livre, enquanto a forma ligada atua como inibidor do sistema complemento e é regulada nos estados inflamatórios, o que faz com que os níveis de proteína S em circulação reduzam dando origem a estados procoagulantes. Esta proteína, para além de funcionar como cofator da proteína C funcional na inativação dos fatores Va e VIIIa, também provoca uma inibição reversível do complexo protrombinase (FVa-FXa)<sup>46</sup>.

- Metodologia: A determinação de proteína S livre é feita por imunoensaio turbidimétrico<sup>59</sup>.

- Interpretação clínica: Assim como a proteína C, também os défices de proteína S podem ser congénitos ou adquiridos, provocando o mesmo tipo de patologias e um maior risco de tromboembolismo venoso. As patologias associadas a um défice de proteína S adquirida são idênticas às provocadas pelo défice de proteína C e podem manifestar-se durante a gravidez, em recém-nascidos, em indivíduos que façam terapêutica anticoagulante ou contraceptiva oral ou que possuam hepatopatias<sup>59</sup>.

## **FATOR DE VON WILLEBRAND (ANTIGÉNIO)**

O fator de von Willebrand (FVW) é uma glicoproteína produzida pelas células endoteliais, megacariócitos e tecido conjuntivo subendotelial. Este fator, para além de mediar a adesão das plaquetas à superfície subendotelial para a formação do tampão plaquetário, também atua como proteína transportadora do fator VIII, formando o complexo designado de fator VIII: C, com atividade coagulante<sup>46</sup>.

- **Metodologia:** A determinação quantitativa do fator de von Willebrand livre (antigénio) é feita por imunoensaio turbidimétrico<sup>60</sup>.
- **Limitações/interferências:** Podem surgir resultados falsamente elevados se na amostra estiver presente fator reumatoide<sup>60</sup>.
- **Interpretação clínica:** Dependendo dos resultados obtidos na determinação quantitativa deste parâmetro, a Doença de von Willebrand (DWD) pode ser considerada hereditária ou adquirida<sup>60</sup>.

A DWD hereditária pode classificar-se em três tipos. Indivíduos com o tipo 1 da doença, o mais frequente, apresentam concentrações de FVW em circulação reduzidos, ainda que a estrutura e funcionalidade deste fator seja normal. Isto não acontece nos indivíduos que apresentam o tipo 2 da doença, pois podem apresentar uma quantidade de FVW no plasma normal ou ligeiramente reduzida, mas a estrutura molecular e funcionalidade deste fator é anormal. No tipo 3 desta doença, os resultados quantitativos para o FVW são quase nulos<sup>60</sup>.

Por outro lado, a DWD adquirida, provocada pela presença de autoanticorpos, pode ser provocada por outras patologias, o que faz com que haja uma diminuição de FVW<sup>60</sup>.

Concentrações elevadas deste fator são frequentemente observados em indivíduos com doenças crónicas, inflamações agudas ou processos que alterem o endotélio vascular<sup>60</sup>.

## **FATOR VIII:C (CROMOGÉNICO)**

O fator VIII é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado, que se encontra em circulação na forma de complexo com o fator de von Willebrand, dando origem ao fator VIII:C<sup>46</sup>.

Durante a coagulação, o fator VIII é convertido na sua forma ativa, o fator VIIIa, pela trombina ou pelo fator Xa. O fator VIIIa funciona como um cofator para o fator IX, acelerando a conversão de fator X a fator Xa pelo fator IXa<sup>61</sup>.

- **Metodologia:** A atividade do fator VIII é determinada por um teste de TTP ativado modificado. Neste ensaio, a amostra é diluída e adicionada ao plasma com défice de fator VIII,

o que faz com que a correção do tempo de coagulação do plasma deficitário seja proporcional à concentração do fator VIII específico na amostra, quando comparado com um calibrador<sup>61</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras que apresentem hemólise, icterícia ou lipemia excessivas, não devem ser utilizadas para provas de coagulação, pois podem surgir interferências<sup>61</sup>.

- Interpretação clínica: A deficiência congênita do fator VIII é a causa de Hemofilia A, uma doença hereditária recessiva ligada ao gênero, que pode originar eventos hemorrágicos em indivíduos com esta patologia. A sua gravidade é inversamente proporcional à concentração de fator VIII no organismo, pelo que é fundamental o doseamento deste fator da coagulação. Assim, os indivíduos com Hemofilia A são normalmente agrupados pelos vários estadios da doença, de acordo com a sua atividade em fator VIII. Existem três categorias: a hemofilia grave, onde as concentrações de fator VIII são inferiores a 0,01 UI/ml; a hemofilia moderada, com níveis em circulação entre 0,01 e 0,04 UI/ml; e hemofilia ligeira, onde estão presentes quantidades entre 0,05 e 0,25 UI/ml<sup>61</sup>.

No entanto, o decréscimo dos níveis de fator VIII também pode ser associado à DWD, embora nesta doença, o défice deste fator seja apenas moderado quando comparado com os défices em indivíduos com Hemofilia A. Assim como o FVW, também o fator VIII está igualmente diminuído no tipo 1 da DWD. O mesmo não acontece no tipo 3 da DWD, pois existe uma deficiência acentuada de fator VIII, enquanto que o FVW está, muitas vezes, ausente<sup>61</sup>.

#### **4.1.4. Outros testes**

##### **PESQUISA DE EOSINÓFILOS NO MUSO NASAL**

O muco nasal é constituído por 95% de água, 3% de elementos orgânicos e 2% de minerais e funciona como uma barreira permeável entre a mucosa e o ar inspirado. Os eosinófilos são células sanguíneas ativas em doenças alérgicas e infeções e, quando presentes no muco nasal, a sua contagem torna-se fundamental para diagnosticar a presença de bactérias ou alergias, em indivíduos com sintomatologia clínica<sup>62</sup>.

- Amostra: Exsudado nasal.
- Condições de colheita: A colheita deve ser feita com uso de zaragatoa, uma para cada lado das fossas nasais (direito e esquerdo).

▪ Metodologia: A pesquisa de eosinófilos no muco nasal é feita microscopicamente, através do exame citológico de um exsudado nasal. A preparação é feita transferindo o conteúdo de duas zaragoas nasais, uma do lado direito e outra do lado esquerdo, cada uma delas para duas lâminas. Assim que toda a preparação esteja seca, as lâminas são fixadas à chama e coradas pelo mesmo tipo de coloração que um esfregaço de sangue periférico, ou seja, pela coloração de May-Grünwald-Giemsa. Findado este processo, a lâmina é analisada ao microscópico pelo TSS/MPC e os resultados são dados qualitativamente, isto é, caso sejam visualizados eosinófilos em, pelo menos, uma das duas lâminas do mesmo lado, o resultado será positivo, caso contrário o resultado será negativo.

▪ Interpretação clínica: Uma contagem elevada de eosinófilos em circulação revela uma resposta do organismo à presença de alérgenos responsáveis pela reação alérgica. O mesmo acontece quando estas células estão presentes no muco nasal, constituindo uma das metodologias de diagnóstico da rinite alérgica<sup>62</sup>.

## ELETROFORESE DAS HEMOGLOBINAS

A eletroforese das hemoglobinas é uma técnica laboratorial que permite identificar os diferentes tipos de hemoglobina que podem ser encontrados nos eritrócitos em circulação. Esta técnica é usada, fundamentalmente, para o diagnóstico de hemoglobinopatias<sup>63</sup>.

▪ Amostra: Solução de eritrócitos lavados e hemolisados, previamente preparada.

▪ Metodologia: Para a realização da eletroforese das hemoglobinas é usado o ensaio *HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E)*, fornecido em *kit* para os equipamentos *HYDRASYS*<sup>®</sup>, que permite a separação de HbA e HbA<sub>2</sub>, assim como a deteção das principais variantes de hemoglobinas, HbS ou HbD e HbC ou HbE. O ensaio é feito por eletroforese em gel de agarose, a pH alcalino (pH 8,5) e, para a garantia da qualidade, este *kit* fornece ainda três tipos de controlo: controlo normal HbA<sub>2</sub>; com uma quantidade de HbA<sub>2</sub> dentro dos valores de referência para este parâmetro, controlo patológico HbA<sub>2</sub>, onde a quantidade de HbA<sub>2</sub> se encontra elevada e, por último, controlo HbFSC, onde estão presentes as variantes F, S/D e C/E de hemoglobina<sup>63</sup>. Neste tipo de metodologia são bastante importantes os controlos, de modo a que seja possível a comparação do perfil eletroforético do indivíduo com o perfil do controlo. Para além disso, no CHMT, como forma de garantir que o resultado é fiável e que não houve interferências na corrida, todas as amostras são realizadas em duplicado e em posições estratégicas entre os três controlos.

O modo de leitura do gel pode ser feito de duas formas, dependendo da finalidade a que se destina a utilização desta técnica. Sendo assim, a visualização do gel fornece uma análise qualitativa, enquanto a leitura do gel num leitor *SEBIA* fornece os perfis de hemoglobina para análises quantitativas relativas. No CHMT, é utilizada a análise quantitativa, com transmissão do perfil eletroforético, das quantificações de cada fração e de um breve comentário feito pelo especialista, para o *modulab*. Contudo, tanto o gel, como os perfis impressos são guardados também em envelope, devidamente etiquetado com os dados do indivíduo, no arquivo do laboratório.

- Limitações/interferências: Não é possível, na eletroforese de hemoglobinas a pH alcalino, diferenciar as variantes S da D, assim como a variante E da C. Estas variantes de hemoglobina só são possíveis diferenciar em eletroforese a pH ácido<sup>63</sup>.

- Equipamento: *HYDRASYS*<sup>®</sup> da *SEBIA*.

- Interpretação clínica: As hemoglobinopatias são um grupo de doenças hereditárias autossómicas recessivas, relacionadas com défice quantitativo ou qualitativo de hemoglobina, a proteína essencial no transporte de oxigénio. As talassemias enquadram-se no grupo de défices quantitativos de Hb, enquanto as variantes estruturais da hemoglobina são o resultado de défices qualitativos desta proteína. Estas variantes são causadas por mutações nos genes globínicos e que dão origem à substituição de um aminoácido na proteína. Estas alterações resultam, conseqüentemente, na modificação das propriedades físicas, químicas ou funcionais da molécula de hemoglobina<sup>64</sup> que são possíveis detetar através da eletroforese das hemoglobinas.

Através da análise qualitativa do gel de agarose, é possível verificar se está presente na amostra alguma das variantes de hemoglobina, pois aparecerá uma banda correspondente a essa variante na amostra e no controlo.

Após o *scanner* do gel, é feita então a análise quantitativa pelo *software* desenvolvido pela *SEBIA*. Esta quantificação é feita pela medição da intensidade da cor da banda quando comparada com os controlos, que resultará num pico no tempo de migração da variante quando desenhado o perfil eletroforético.

No subcapítulo 4.1.5. *Caso Clínico*, será relatado um caso clínico dos estudados durante o período de estágio.

## **TESTE DE SOLUBILIDADE À HBS**

*HbS Solubility Screening Kit* da *Helena Biosciences Europe* é um teste rápido que se destina à deteção qualitativa da variante S da hemoglobina, responsável pela transformação dos

eritrócitos bicôncavos em eritrócitos falciformes<sup>65</sup>. Este teste baseia-se no facto de, sob baixos níveis de oxigénio, a HbS se tornar menos solúvel que a sua forma oxigenada.

A gravidade das patologias associadas à presença de HbS em circulação depende da informação genética de cada indivíduo e pode originar quadros clínicos assintomáticos ou com sintomatologia característica<sup>65</sup>.

- Amostra: Sangue total.
- Metodologia: Para a realização deste teste rápido é necessária a adição de 2 µl de amostra de sangue total ou amostra controlo e 2 ml de reagente *HbS Solubility* num tubo de ensaio. De salientar que, se a concentração de hemoglobina for inferior a 60 g/L, deve ser adicionado um volume maior de amostra. Seguidamente, homogeneizar bem a mistura e deixar repousar entre três e cinco minutos. A leitura é feita com base na turvação da mistura e com o auxílio das linhas do gráfico de visualização desenhado na bula<sup>65</sup>.
- Limitações/interferências: Os resultados obtidos em recém-nascidos ou em lactentes não são confiáveis devido à baixa percentagem de HbS e elevada percentagem de HbF em circulação, o que pode originar resultados falsamente negativos<sup>65</sup>.
- Interpretação clínica: Se houver turvação o resultado é positivo, ou seja, as linhas do gráfico de visualização não podem ser vistas quando observadas através da amostra. Este resultado significa que o indivíduo possui a variante S da hemoglobina em circulação<sup>66</sup>.

Sempre que o resultado deste teste for positivo deve ser investigada a natureza do traçado falciforme, ou seja, se o indivíduo é homozigótico ou heterozigótico. Um indivíduo heterozigótico possui apenas um gene com a mutação falciforme e pode ser ou não sintomático, dependendo da variante de hemoglobina manifestada pelo outro gene<sup>66</sup>. Nestes casos, embora os eritrócitos não se tornem falciformes sob concentrações normais de oxigénio, a falciformação poderá ocorrer *in vivo*, quando os níveis de oxigénio são reduzidos devido a patologias adjacentes como a pneumonia, anestesia e, principalmente, se houver febre ou acidose<sup>65</sup>. No caso de indivíduos homozigóticos, ou seja, detentores de dois genes que codificam para a HbS, apresentam geralmente complicações e sintomas característicos de anemia falciforme, a manifestação mais grave da doença falciforme<sup>66</sup>.

Um resultado negativo é obtido quando a mistura não possui turvação, ou seja, quando é possível a observação das linhas do gráfico de visualização (Figura 15).

De salientar que, por se tratar de um teste presuntivo, os resultados obtidos devem ser sempre confirmados por eletroforese das hemoglobinas.



Figura 15: Resultado negativo obtido no teste de solubilidade à HbS.

## PROVA DA FALCIFORMAÇÃO

Para além do anteriormente descrito, a presença de HbS pode ser demonstrada pela pesquisa de células falciformes através da prova da falciformação, que consiste em provocar a transformação da forma dos eritrócitos que possuem HbS, através da desoxigenação do sangue.

Na forma homozigótica (HbS/S) ou heterozigótica com o genótipo HbS/C e HbS/ $\beta$ -talassemia, os drepanócitos observam-se facilmente num esfregaço de sangue periférico. O mesmo não acontece na forma assintomática heterozigótica (HbA/S), pois não ocorre falciformação em condições normais *in vivo*. Este processo pode ser induzido, *in vitro*, através da privação de oxigénio aos eritrócitos, ou mesmo pela indução de um ambiente redutor, no qual se baseia esta prova.

- Amostra: Sangue total.
- Condições de colheita: Amostra colhida com uso de EDTA como anticoagulante. Sempre que possível, o laboratório deverá ser informado previamente da entrada do pedido para este tipo de prova, devido à extemporaneidade do reagente e à pouca estabilidade da amostra.
- Metodologia: Numa lâmina de microscopia, devem ser colocados 150  $\mu$ l de solução de metabissulfito anidro ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) a 2% e adicionados 50  $\mu$ l de sangue total, cobrindo imediatamente a preparação com uma lamela. De modo a que a atividade metabólica dos leucócitos conduza à desoxigenação da amostra, os cantos da lamela devem ser vedados com verniz incolor e a preparação deve ser observada ao microscópio com ampliação de 400x. O MPC/TSS deverá procurar identificar eritrócitos falciformes, utilizando especialmente as margens da preparação para essa visualização.
- Limitações/interferências: Lâminas com resíduos de detergente podem modificar ou lisar as células, simulando células falciformes e, conseqüentemente, dando origem a resultados falsamente positivos.
- Interpretação clínica: O resultado será positivo sempre que se observarem eritrócitos falciformes na preparação. Para um resultado negativo, a preparação deve ser visualizada novamente passadas doze horas e o resultado deverá ser concordante nas duas observações.

Esta prova é usada como teste presuntivo, assim como o Teste de Solubilidade à HbS, e os resultados devem ser interpretados do mesmo modo. O diagnóstico definitivo de doença falciforme deve ser dado recorrendo ao uso de técnicas de diagnóstico mais específicas.

## DOSEAMENTO DAS HEMOGLOBINAS

O doseamento das hemoglobinas é um teste utilizado, normalmente, como teste complementar de diagnóstico de diabetes *mellitus* ou de hemoglobinopatias<sup>67</sup>.

A hemoglobina, como já referido, é uma proteína que faz parte da constituição dos eritrócitos e que é responsável pelo transporte de oxigênio. No entanto, não é só o oxigênio que circula nos vasos sanguíneos, pelo que pode ocorrer interações entre a hemoglobina e outros compostos, como é o caso da glicose. A reação entre a HbA e a glicose corresponde a uma glicação não enzimática, que ocorre de forma contínua e irreversível, dando origem a um complexo designado de hemoglobina glicada (HbA1c). A velocidade de síntese deste complexo depende da concentração de glicose a que os eritrócitos são expostos, uma vez que o eritrócito é livremente permeável à glicose. Como a semivida dos eritrócitos é de cerca de cento e vinte dias, a HbA1c reflete a média das glicemias durante esse intervalo<sup>67</sup>, tornando-se um parâmetro complementar ao diagnóstico e monitorização da diabetes *mellitus*.

Por outro lado, num adulto, podem ser encontradas ainda outras frações de hemoglobina para além da HbA, como por exemplo a HbA2. Existem ainda outras variantes da hemoglobina, que são encontradas quando alterações genéticas mudam a sequência de aminoácidos da globina. Essas mutações alteram a estrutura da hemoglobina e podem alterar o seu comportamento, velocidade de produção ou estabilidade. O seu doseamento torna-se importante, pois auxiliam o clínico no diagnóstico de muitas das hemoglobinopatias existentes.

- Amostra: Sangue total.
- Metodologia: A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é uma técnica de separação, identificação e quantificação de compostos presentes numa mistura. Através de uma cromatografia líquida de fase reversa, é possível a separação da mistura das hemoglobinas circulantes nos vários tipos de hemoglobinas, com base nas interações iónicas e hidrofóbicas da amostra com a matriz de suporte. Cada variante de hemoglobina tem o seu tempo de retenção característico, o que permite a sua identificação através desta técnica<sup>68</sup>.
- Equipamento: ADAMS HA-8160 da ARKRAY.
- Interpretação clínica: Nos indivíduos com diabetes *mellitus*, principalmente naqueles que apresentam glicemia persistentemente elevada, o excesso de glicose acaba por facilitar a ocorrência da glicação da hemoglobina, o que faz com que os valores de HbA1c obtidos sejam elevados. Este doseamento proporciona uma visão global do controlo desta doença, da necessidade de ajustes no tratamento, bem como, do risco que o indivíduo tem de vir a sofrer complicações tardias<sup>67</sup>.

No caso do doseamento de outras hemoglobinas, é possível dosear cada uma das frações presentes devido aos tempos de retenção característicos de cada uma das variantes. No entanto, é necessário ter em consideração que algumas variantes mais raras podem co-eluir com as frações mais comuns como, por exemplo, a co-eluição das HbE e HbLepore com a HbA<sub>2</sub>, assim como outras hemoglobinas podem co-eluir com HbA, HbS e HbF. Do mesmo modo, o tempo de retenção da HbS e dos seus derivados pode ser o mesmo que os da HbA e HbA<sub>2</sub><sup>24</sup>. Por esta razão e pelo facto de existirem mais de mil variantes de hemoglobina identificadas, o doseamento das hemoglobinas pela técnica de HPLC não pode servir como teste de diagnóstico definitivo das hemoglobinopatias, funcionando apenas como exame complementar de diagnóstico.

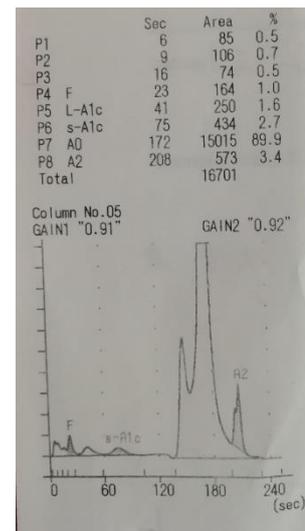


Figura 16: Cromatograma obtido no equipamento ADAMS HA-8160 da ARKRAY.

## CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO

A pseudotrombocitopenia é o nome dado a uma baixa contagem de plaquetas em amostras de sangue colhidas com o uso do anticoagulante EDTA. Esta diminuição é causada pela aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, pela formação de rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos, chamado de satelitismo plaquetário<sup>69</sup>.

A aglutinação das plaquetas pode resultar na formação de agregados plaquetares de tamanho similar aos dos leucócitos, o que faz com que o contador automático seja incapaz de distinguir os agregados, reconhecendo-os como leucócitos e fornecendo contagem falsamente elevada destas células (pseudoleucocitose)<sup>69</sup>.

- Amostra: Sangue total.
- Metodologia e limitações/interferências: A metodologia utilizada para esta contagem é a mesma que a utilizada para a contagem de plaquetas (ver subcapítulo 4.1.2. *Análises Hematologia*), assim como as limitações/interferências.
- Equipamento: XN-1000 da SYSMEX.
- Interpretação clínica: De um modo geral, os indivíduos com pseudotrombocitopenia não têm história clínica de hemorragias ou marcadores autoimunes. A juntar a isto, o TP também está normal e o VPM não se encontra alterado, o que prova que a diminuição das plaquetas encontrada é induzida *in vitro*<sup>69</sup>.

A ocorrência de pseudotrombocitopenia pode ainda ocorrer em indivíduos portadores de trombocitemia essencial que, normalmente, apresentam um número bastante elevado de plaquetas em circulação, o que pode encobrir o diagnóstico desta doença ou dificultar a monitorização do tratamento nos casos já diagnosticados. Por outro lado, em indivíduos com doenças associadas à diminuição das plaquetas em circulação, quer pela supressão da plaquetopoiese medular ou por mecanismos imunes, a ocorrência da pseudotrombocitopenia pode dificultar na monitorização da terapêutica em curso<sup>69</sup>.

A pseudotrombocitopenia representa, assim, um resultado clínico que carece de atenção por parte do clínico, uma vez que pode originar diagnósticos errados, pedidos de mais exames laboratoriais desnecessários e terapêutica inadequada, como por exemplo, transfusão de plaquetas e, em casos extremos, esplenectomia<sup>69</sup>.

## **HLA-B27**

O complexo do antígeno leucocitário humano (HLA) é a versão humana do Complexo de Histocompatibilidade (MHC), uma família de genes presente em muitas espécies. Os genes neste complexo são categorizados em três grupos básicos: classe I, classe II e classe III. No Homem, os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, são os principais genes do MHC de classe I<sup>70</sup>.

Os genes MHC de classe I fornecem a informação genética para a tradução de proteínas de membrana presentes na superfície de quase todas as células. Estas proteínas ligam-se a péptidos endógenos (antígenos) de outras células, apresentando-os aos linfócitos T do sistema imunológico<sup>70</sup>.

O gene HLA-B tem vários alelos, sendo um deles o alelo HLA-B27, que está associado a um grupo de doenças inflamatórias articulares relacionadas à espondilite anquilosante<sup>70</sup>.

- Amostra: Sangue total.
- Condições de colheita: A realização deste exame só se efetua, no laboratório central do CHMT, às quartas-feiras. Tendo em conta que a estabilidade da amostra para este exame é de apenas quarenta e oito horas à temperatura ambiente, a colheita da amostra terá de ser efetuada à terça-feira para tubo contendo EDTA como anticoagulante.
- Metodologia: A técnica utilizada para a determinação do antígeno HLA-B27 é a citometria de fluxo. Através desta técnica é possível caracterizar subpopulações de linfócitos contendo o antígeno HLA-B27 pelo uso de anticorpos monoclonais, marcados com fluorescência, contra as células que possuem este antígeno<sup>28</sup>.
- Equipamento: *FACSCALIBUR* da *BD DIAGNOSTICS*.

▪ **Interpretação clínica:** O resultado para a pesquisa de antígeno de histocompatibilidade HLA-B27 é dado qualitativamente. Se o resultado obtido for positivo, indica que o indivíduo tem um risco acrescido de desenvolvimento de doença inflamatória articular relacionada com a espondilite anquilosante, conhecidas como espondiloartropatias. Alguns desses distúrbios estão associados a doenças autoimunes, como a psoríase, ou a doenças crônicas que causam inflamação das paredes intestinais<sup>70</sup>.

Por outro lado, é de conhecimento geral que cerca de 7% da população mundial tem o antígeno HLA-B27, porém o risco de desenvolver este tipo de doença é de apenas 5%. Isto significa que é necessário estarem reunidos um conjunto de fatores, como os antecedentes familiares, a presença de sintomas clínicos ou radiográficos e a presença de antígeno HLA-B27, para o diagnóstico de espondiloartropatia<sup>71</sup>.

## CONTAGEM DE CÉLULAS EM LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

As células dos líquidos biológicos são contadas nos aparelhos de hematologia, no entanto, devem ser contadas também em câmara para confirmação. No caso dos líquidos ascítico, peritoneal, pleural, dialisado e sinovial, a contagem deve ser feita em Câmara de Neubauer<sup>72</sup>, no entanto, esta contagem não é obrigatória. Por outro lado, caso a amostra seja de LCR, a contagem deve ser feita em câmara de Fuchs-Rosenthal ou Nageotte e é obrigatória para que o resultado seja disponibilizado<sup>73</sup>.

**Contagem em equipamento de hematologia:** O líquido biológico, para ser processado em equipamento de hematologia, deve chegar do serviço de origem em tubo de hemograma, caso contrário, deverá ser transferida uma alíquota para o respectivo tubo. Para além disso, deve-se verificar sempre se, no líquido biológico, existe fibrina, pois em caso afirmativo, a amostra não deverá ser processada no equipamento<sup>72</sup>.

**Contagem em câmara:** No caso de o líquido biológico ser LCR, a amostra a processar deve ter sido obtida no primeiro tubo de colheita, ou seja, nunca se deve utilizar, para contagem de células, a amostra do tubo destinado a estudos microbiológicos<sup>73</sup>.

No caso de líquidos hemáticos é importante a adição de uma ou duas gotas de ácido acético antes do seu processamento em câmara, de forma a destruir os eritrócitos presentes para que não interfiram na contagem<sup>72,73</sup>.

Para a contagem, a área dos retículos da câmara deve ser coberta com uma lamela e cheia com a amostra, sem que se formem bolhas. A câmara deve repousar uns minutos, em ambiente húmido, e a contagem de células deve ser feita ao microscópio pelo TSS/MPC<sup>72,73</sup>.

- Contagem total de leucócitos: Esta contagem pode ser feita utilizando três tipos de câmara, a Câmara de Neubauer<sup>72</sup>, a Câmara de Fuchs-Rosenthal<sup>73</sup> e a Câmara de Nageotte<sup>73</sup>. O resultado a introduzir no *modulab*, através da contagem em qualquer uma das três câmaras, deve ser dado em número de células por litro de sangue.

- Contagem diferencial de leucócitos: Para esta contagem, uma alíquota do líquido biológico deverá ser centrifugada e, do sedimento, serem feitos dois esfregaços, para que se possa determinar o predomínio das células. O modo como é efetuado o esfregaço varia em função da celularidade do líquido, sendo que se esta for alta, uma ou duas gotas do sedimento deverão ser espalhadas ao longo de toda a lâmina e, se for baixa, a amostra deverá ser espalhada num pequeno círculo. Uma das lâminas é corada com a coloração de May-Grünwald-Giemsa, a fim de poder ser observada ao microscópio pelo MPC/TSS. A contagem diferencial é dada em percentagem, indicando se o predomínio celular é mononuclear ou polimorfonuclear<sup>72,73</sup>. No LCR a contagem diferencial só é feita se a contagem total de células for superior ou igual<sup>73</sup> a 10 células/mm<sup>3</sup>.

## **MUTAÇÃO FATOR V LEIDEN/ MUTAÇÃO FATOR II**

As interações entre fatores de risco genéticos e/ou adquiridos que afetam os fatores de coagulação são muitas vezes causadoras de tromboembolismo venoso, pelo que se torna importante o seu conhecimento. Entre os fatores genéticos, as mutações nos genes que codificam para os fatores V e II (protrombina) são as principais responsáveis pelos casos de trombose hereditária<sup>74</sup>.

O fator V é uma proteína plasmática precursora do fator Va, essencial para a síntese de trombina e com papel importante na ativação da coagulação. O processo de inativação do fator Va inicia-se com a ligação da trombina e da proteína C à trombomodulina, na presença de proteína S, convertendo a proteína C em proteína C ativada. Por outras palavras, o complexo proteína C ativada-proteína S, através da clivagem enzimática dos fatores Va e VIIIa, limita a formação do coágulo<sup>74</sup>.

Tendo em conta que a resistência à formação de proteína C ativada representa um dos principais fatores de risco para o tromboembolismo venoso e que a principal causa é a mutação

no gene que codifica para o fator V de Leiden, é necessária a sequenciação desse gene para que se possa avaliar o risco de desenvolvimento de doença trombótica<sup>74</sup>.

No caso da mutação do gene responsável pelo fator II (protrombina), sabe-se que esta é uma mutação pontual, onde ocorre uma troca de bases (guanina por adenina), no nucleótido 20210. Esta mutação, na região 3' não transcrita do gene, está localizada na proximidade de um local de clivagem do precursor de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro, o que faz com que aumente a sua transcrição ou estabilidade e, conseqüentemente, a concentração plasmática de protrombina e o risco de trombose sejam mais elevados<sup>75,76</sup>.

- Amostra: Sangue total.
- Metodologia: Para a detecção de mutações no fator II e fator V é usado um ensaio em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), que consiste num teste de genotipagem qualitativo. Este ensaio inclui reagentes, contidos em cartuchos descartáveis, para a detecção dos alelos normais e mutantes de ambos os fatores<sup>77</sup>.
  - Limitações/interferências: Mutações raras do fator V (A1696G, G1689A e A1692C) e quaisquer *Single Nucleotide Polymorphism* adicionais na região de ligação da sonda podem interferir com a detecção destes alelos. Por outro lado, indivíduos tratados com heparina, ou submetidos a transfusão sanguínea, podem ter amostras que poderão interferir com os resultados da RT-PCR. O teste deverá ser iniciado após, no máximo, quinze minutos da adição da amostra ao cartucho, de modo a produzir resultados fiáveis<sup>77</sup>.
    - Equipamento: GENEXPERT® da CEPHEID.
    - Interpretação clínica: Em relação à mutação no gene que codifica para o fator V, sabe-se que esta ocorre, normalmente, no exão 10 e provoca uma substituição de bases (guanina por adenina) no nucleótido 1691. Quando ocorre a tradução do gene, esta substituição vai-se refletir na troca do aminoácido Arginina por Glutamina, na posição 506 da proteína, local de clivagem para a ativação da proteína C. Esta substituição de aminoácidos resulta numa sobreprodução de fator Va e na conseqüente produção de fibrina, que em casos de homozigotia, levará a que o indivíduo possua um risco maior de sofrer de tromboembolismo, quando comparado com indivíduos sem a mutação<sup>74</sup>.

No caso da mutação pontual no gene que codifica para a protrombina, ocorre a troca de uma guanina por uma adenina, no nucleótido 20210, próximo do local de clivagem do precursor do RNA mensageiro<sup>75</sup>. Esta mutação associa-se ao aumento de estabilidade do RNA mensageiro transcrito, o que leva a uma maior eficiência na transcrição deste gene e, conseqüentemente, o aumento da produção de protrombina<sup>75</sup>. Embora a mutação não altere a

estrutura da proteína, induz uma elevação dos níveis plasmáticos de protrombina e o resultado é um aumento do risco de hipercoagulabilidade, ou seja, da ocorrência de trombose venosa<sup>76</sup>.

#### 4.1.5. Caso Clínico

Indivíduo do sexo masculino, com treze anos e natural de Angola, recorre ao serviço de Urgência do CHMT, com dor intensa nos membros inferiores e odontalgias. Após a análise do historial clínico, foi possível verificar um diagnóstico anterior de drepanocitose em contexto de dactilite, com tratamento com hidroxiureia 750 mg e ácido fólico 5 mg. O clínico pediu os exames laboratoriais a seguir mencionados para esclarecer a suspeita de favismo associado a vaso oclusão.

#### HEMOGRAMA COMPLETO

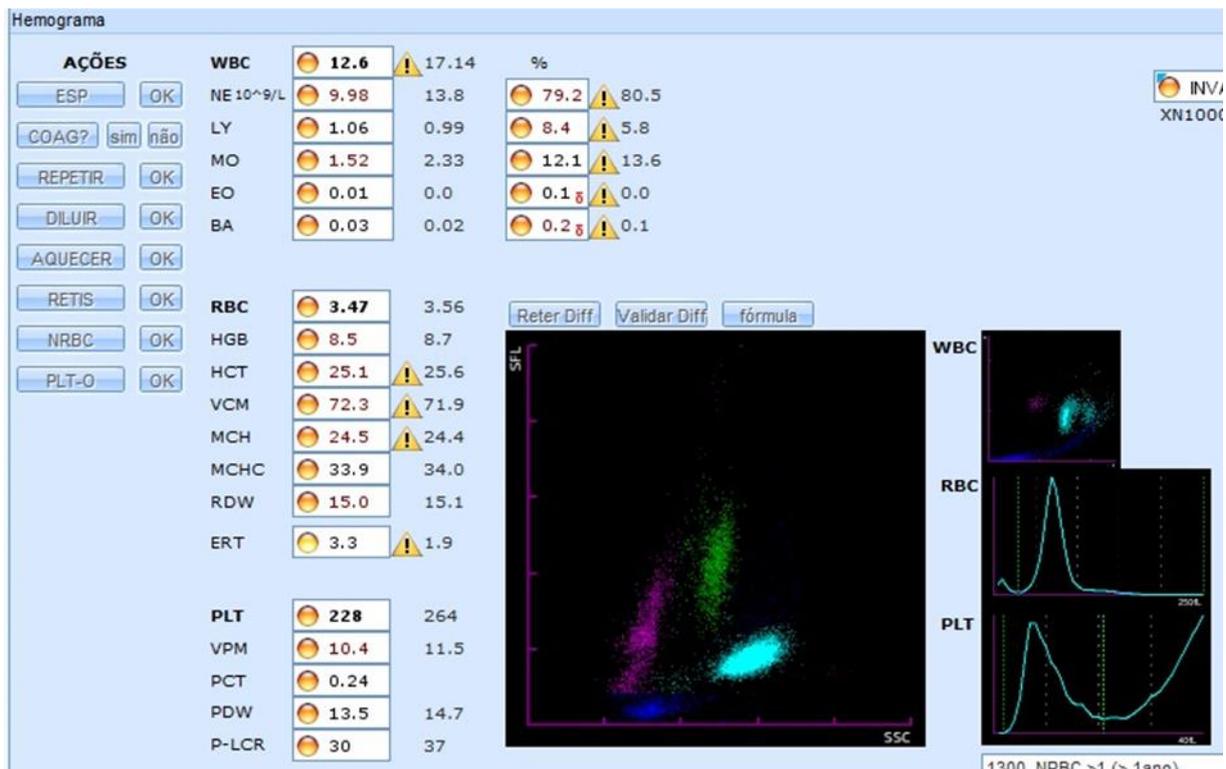


Figura 17: Hemograma do caso em estudo, obtido através da análise de sangue total no equipamento XN-1000 da SYSMEX.

## ELETROFORESE DAS HEMOGLOBINAS

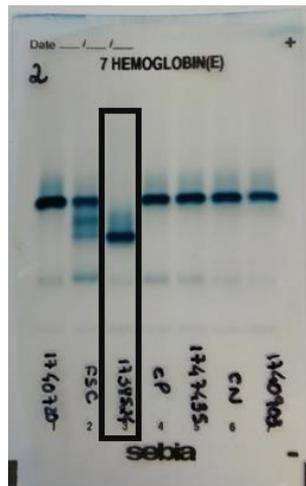


Figura 18: Eletroforese das hemoglobinas realizada no dia 16 de junho de 2020, no equipamento *HYDRASYS*® da *SEBIA*.

Em destaque encontra-se o perfil de migração do caso em estudo.

FSC: Controlo HbF, HbS e HbC; CP: controlo patológico (HbA2 aumentado); CN: controlo normal (HbA2 normal).

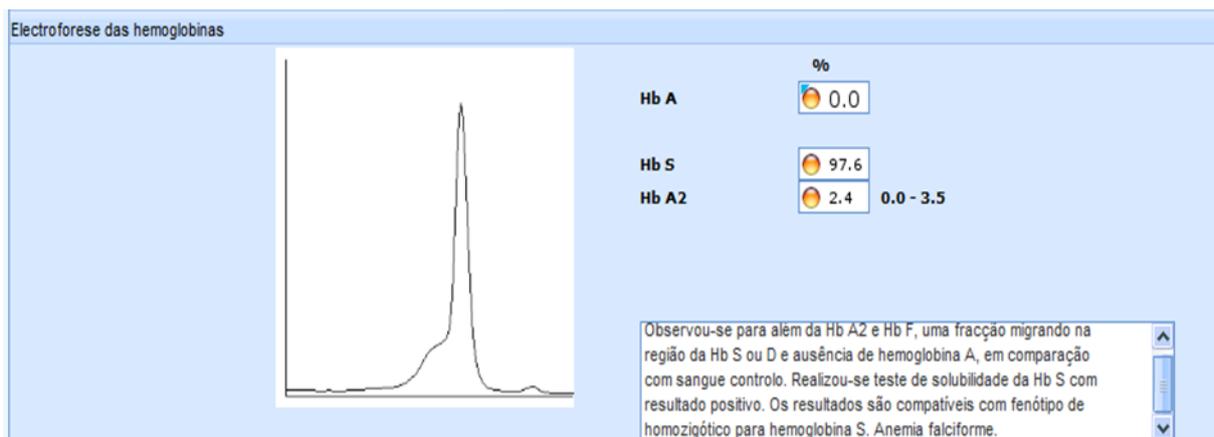


Figura 19: Perfil eletroforético obtido após *scanner* do gel de migração das hemoglobinas e respetivo comentário realizado pelo MPC/TSS.

## DOSEAMENTO DAS HEMOGLOBINAS

Doseamento das hemoglobinas		
-Hb A (dos)	0.0	%
O perfil cromatográfico revela a presença de uma variante de hemoglobina que elui com um tempo de retenção de acordo com Hb S ou C e ausência de hemoglobina A.		
-Hb F (dos)	10.2	% 0.2 - 1.0
-Hb A2 (dos)	5.5	% 0.0 - 3.5
-Hb outros	84.3	%

Figura 20: Resultados do doseamento das hemoglobinas realizado no equipamento *ADAMS HA-8160* da *ARKRAY*.

## TESTE DE SOLUBILIDADE À HbS

Resultado: Positivo



Figura 21: Teste de solubilidade à HbS.

Esquerda: Controlo negativo. Direita: Resultado positivo.

### Interpretação clínica:

Após a análise do gel obtido na eletroforese das hemoglobinas, Figura 18, é possível verificar que, nesta amostra, existe uma variante de hemoglobina a migrar no mesmo local que a HbS/HbD, quando comparado com a amostra controlo para as variantes F, S/D e C/E da hemoglobina. Por outro lado, quando comparado com o controlo normal, não é possível observar a banda correspondente à HbA, o que poderá significar a ausência deste tipo de hemoglobina. Ambos os factos são clarificados aquando a leitura do gel e obtenção do perfil eletroforético, que demonstra uma clara ausência de HbA na amostra do indivíduo e um pico acentuado na região de migração da HbS/D. Também foi possível observar um pico, embora mais reduzido, no local de migração da HbA2.

De modo a esclarecer este quadro clínico, realizou-se ainda o doseamento das hemoglobinas, obtendo-se um perfil cromatográfico semelhante ao perfil eletroforético anteriormente descrito. O perfil cromatográfico revelou uma variante de hemoglobina que eluiu com um tempo de retenção correspondente ao tempo de retenção característico da HbS ou HbC e que esta é a variante de hemoglobina predominante na amostra (84,3%). O cromatograma revelou ainda a presença de HbF (10,2%) e HbA2 (5,5%).

Assim, comparando o resultado obtido nestes dois exames laboratoriais, foi possível afirmar que o indivíduo possuía a variante S da hemoglobina. No entanto, como exame complementar realizou-se ainda o teste de solubilidade à HbS, do qual se obteve um resultado positivo, confirmando o diagnóstico de doença falciforme.

Contudo, é importante esclarecer ainda o genótipo, pois os genótipos da doença falciforme determinam a gravidade e a presença, ou não, de sintomas clínicos. Os genótipos HbS/ $\beta$ -talassemia, HbS/C e HbS/D são consideradas genótipos de gravidade média, enquanto que os genótipos HbA/S, que é responsável pelo traço falciforme, e HbS/S, que caracteriza a anemia falciforme, possuem maior relevância clínica. Nos casos de traço falciforme, os indivíduos são heterozigóticos para HbS, sendo portadores de um gene de HbA e um gene com a mutação falciforme (HbS), formando o genótipo HbA/S. Nestes casos, os indivíduos são apenas portadores da doença, sendo maioritariamente assintomáticos. Contrariamente aos restantes, indivíduos com anemia falciforme possuem a manifestação mais grave da doença falciforme. Os indivíduos homozigóticos para a HbS, possuem dois genes desta hemoglobina, formando o genótipo HbS/S. Nestes casos, os indivíduos apresentam complicações e sintomas característicos desta doença<sup>66</sup>.

Assim, tendo em conta que o indivíduo do caso em estudo apresenta uma anemia marcada e que possui alguns sinais característicos da doença, como é o caso da vaso-oclusão com dor intensa nos membros inferiores, pode-se afirmar que este possui um genótipo HbS/S, com necessidade de ser confirmado por técnicas de sequenciamento genético.

## 4.2. Microbiologia

O objetivo do trabalho no setor de Microbiologia é a identificação de microrganismos potencialmente patogênicos, que possam ser a causa de infecção e a obtenção do respectivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos<sup>14,78</sup>. Para isso, é fundamental a interpretação de todos os resultados disponíveis, obtidos pela execução de exames diretos e culturais, de provas complementares e de testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos<sup>78</sup>.

### 4.2.1. Equipamentos

#### **FILMARRAY® da BIOFIRE - BIOMÉRIEUX**

O equipamento *FilmArray*® é um dispositivo automatizado de diagnóstico *in vitro* de ácidos nucleicos de vários microrganismos potencialmente patogênicos, que estejam contidos



Figura 22: Equipamento *FilmArray*® da BIOFIRE – BIOMÉRIEUX.

Fonte: *FilmArray*® - Instruções de utilização<sup>79</sup>.

numa amostra. O equipamento interage com a bolsa de reagente para extrair e purificar ácidos nucleicos e amplificar as suas sequências de DNA de agentes patogênicos específicos, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex nested* (nmPCR). Os produtos de PCR resultantes são avaliados por análise de fusão de DNA, os quais são interpretados automaticamente<sup>79</sup>.

#### **GENEXPERT® da CEPHEID**

O equipamento *GeneXpert*® é um sistema automatizado que processa amostras, amplificando os ácidos nucleicos e detetando as sequências-alvo em amostras simples ou complexas. Este equipamento utiliza ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e transcriptase reversa-PCR em tempo real e esta reação dá-se em cartuchos *GeneXpert*®, de utilização única. Como os cartuchos são autónomos, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada<sup>80,81</sup>.



Figura 23: *GeneXpert*® da CEPHEID.  
Fonte: Cepheid | Permitindo acesso a testes de diagnóstico molecular em qualquer lugar<sup>81</sup>.

### **VITEK® 2 da BIOMÉRIEUX**

O equipamento VITEK® 2 é um sistema integrado que executa testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos, através da monitorização contínua do crescimento e da atividade dos microrganismos no interior de cartas de teste. Este equipamento combina tarefas de preparação de amostras, inoculação de cartas, incubação e leitura. A leitura é feita pelo



Figura 24: Equipamento VITEK® 2 da BIOMÉRIEUX.

sistema ótico de transmitância do equipamento, que faz uma leitura inicial do poço e, com intervalos de quinze minutos, mede o crescimento dos organismos através da quantidade de luz visível que é impedida de atravessar o poço<sup>82</sup>.

### **MALDI-TOF microflex LT da BRUKER**

O equipamento *microflex LT* é um sistema MALDI-TOF em modo linear, utilizado para a identificação rápida e confiável de pequenas moléculas, neste caso, microrganismos. Este sistema fornece identificação e classificação taxonómica de bactérias, leveduras e fungos, baseadas em impressões digitais proteómicas obtidas por espectrometria de massa MALDI-TOF de alto rendimento<sup>83</sup>.



Figura 25: Equipamento MALDI-TOF *microflex LT* da BRUKER.

### **BACTEC™ 9120™ da BD DIAGNOSTICS**

O equipamento BACTEC™ 9120™ pertence a uma série de instrumentos de cultura de sangue que foi projetada para a deteção rápida de microrganismos em amostras clínicas. A amostra é inoculada no frasco de cultura, o qual é inserido no equipamento para incubação. Cada frasco contém um fluorocromo que responde, dependendo do tipo de frasco, à concentração de CO<sub>2</sub>, produzida pelo metabolismo dos microrganismos, ou ao consumo de O<sub>2</sub>, necessário para o crescimento dos mesmos. A ação do fluorocromo é monitorizada pelo equipamento, a cada dez minutos, detetando a intensidade da fluorescência, que é proporcional ao aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> ou à diminuição da quantidade de O<sub>2</sub> presente no frasco. Uma leitura positiva indica a presença presuntiva de microrganismos viáveis na amostra<sup>84-86</sup>.



Figura 26: BACTEC™ 9120™ da BD DIAGNOSTICS.  
Fonte: BACTEC™ 9120™ | Diagnocel<sup>84</sup>.

## **AEROSPRAY® GRAM SERIES 2 da ELITECHGROUP**

O equipamento *Aerospray® Gram Series 2* é um sistema automatizado de coloração de lâminas pelo método de Gram. Neste sistema, os reagentes aplicados nas lâminas são novos, o que elimina a contaminação cruzada lâmina a lâmina. As amostras podem ser fixadas com calor ou pode ser usado o ciclo automático de fixação com álcool. Depois de fixadas, as lâminas são pulverizadas com violeta de cristal, com a remoção do excesso por centrifugação e a lâmina lavada com água desionizada. Seguidamente, o reagente de iodo é então pulverizado na lâmina e o excesso removido da mesma forma que o anterior. O descorante é aplicado para remover o



Figura 27: *Aerospay® Gram Series 2* da ELITECHGROUP.

Fonte: *ELITechGroup* - United Kingdom<sup>88</sup>.

complexo violeta de cristal-iodo, de modo a que apenas os organismos Gram-negativos sejam descorados. A safranina ou fucsina, adicionada ao descorante, cora simultaneamente as células Gram-negativas. As lâminas ficam secas e prontas para visualização ao microscópio em minutos<sup>87,88</sup>.

## **POLYSTAINER da IUL INSTRUMENTS**

O equipamento *PolyStainer* executa procedimentos de coloração automatizados, até vinte lâminas em simultâneo. O braço robótico carrega, mergulha e agita as lâminas pelos quatro poços de plástico substituíveis onde estão contidos os corantes. A possibilidade de trocar os poços torna este equipamento funcional para qualquer método de coloração, sendo apenas preciso substituir os corantes e dispô-los pela ordem correta. As lâminas são ainda mergulhadas num quinto poço, com água drenável, e podem ser secas em leque ou à temperatura ambiente<sup>89,90</sup>.



Figura 28: *PolyStainer* da IUL INSTRUMENTS.  
Fonte: *IUL Instruments*<sup>90</sup>.

## 4.2.2. Preparação da amostra

A correta manipulação das amostras recebidas para estudo microbiológico é essencial para um crescimento eficiente de microrganismos potencialmente patogênicos. Assim, todas as amostras colhidas para estudo microbiológico são rececionadas no setor de Microbiologia, de modo a que sejam preparadas para processamento, da seguinte forma<sup>91</sup>:

- **Amostras líquidas:** Deve ser recolhida uma alíquota ou a totalidade da amostra para um tubo de centrífuga. A amostra deve ser centrifugada a 1500 rpm durante vinte minutos e, posteriormente, usado o sedimento para análise.
  
- **Amostras sólidas:** As amostras sólidas devem ser maceradas sempre que possível, utilizando um bisturi esterilizado. Se necessário deverá juntar-se, de forma assética, uma pequena quantidade de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) para obter um produto mais homogêneo. Se não for possível macerar a amostra, esta deverá ser submersa com BHI, mantendo as condições de assepsia.
  
- **Amostras em frasco de hemocultura ou *Portagerm*<sup>TM</sup>:** As garrafas de hemocultura são recebidas e colocadas a encubar no equipamento *BACTEC*<sup>TM</sup> 9120<sup>TM</sup> da *BD DIAGNOSTICS* até que haja crescimento microbiológico. No caso de haver crescimento, as hemoculturas são consideradas positivas e preparadas do seguinte modo: a tampa de borracha do frasco deve ser desinfetada com solução apropriada e a amostra deve ser retirada com o auxílio de uma agulha.
  
- **Amostras em zaragatoa:** A zaragatoa recebida é utilizada para realização do exame cultural e do exame direto.
  
- **Outras amostras:** Para outro tipo de amostra deve ser utilizado o produto tal como foi recebido ou, caso não seja possível, processar pela maneira mais adequada à natureza do produto.

### 4.2.3. Exame direto

O exame direto, no setor de Microbiologia, é efetuado através da coloração de um esfregaço ou preparação a fresco da amostra.

#### PREPARAÇÃO DO ESFREGAÇO

Um esfregaço é uma leve camada de matéria orgânica, estendida sobre uma lâmina de vidro, normalmente usada para exame microscópico. Para a realização do esfregaço é espalhado o produto biológico, ou bactérias a partir de colónias em cultura, sobre a lâmina de modo a formar uma película fina. No caso de amostras biológicas líquidas ou cultura em meio líquido, deve ser usado o sedimento para a realização do esfregaço. Em amostras espessas ou purulentas, deve ser colocada uma pequena quantidade de produto biológico numa lâmina e dispor outra lâmina por cima, fazendo-as deslizar uma sobre a outra, de forma a deixar o esfregaço fino e homogêneo (técnica de estiramento). No caso de amostras biológicas sólidas ou colónias em meio de cultura sólido, a preparação do esfregaço deve ser feita por emulsão da amostra com soro fisiológico. Todos os esfregaços devem ser fixados, passando a lâmina na chama do bico de Busen, pelo menos três vezes<sup>92</sup>.

De salientar que, o esfregaço só deverá ser preparado depois de efetuado o exame cultural, evitando a contaminação do produto, e as lâminas devem ser identificadas com o número de registo da análise, o produto e o dia da execução. Caso a amostra não seja suficiente para a sua realização, o esfregaço deverá ser omitido, registando essa informação no *modulab*<sup>91</sup>.

#### COLORAÇÃO

##### Método de Gram

O método de Gram permite classificar as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivo e Gram-negativo. As bactérias Gram-positivas são bactérias que, devido à maior espessura da camada de peptidoglicano da sua parede celular, retêm o corante violeta de cristal, o que não acontece com as bactérias Gram-negativas, que têm uma menor espessura de peptidoglicano e, por isso, não retêm o mesmo corante. Este método de coloração é também utilizado para distinguir a forma e o arranjo das bactérias após a divisão celular<sup>93</sup>.

De um modo geral, as células bacterianas são então caracterizadas quanto a<sup>93</sup>:

- comportamento tintorial: Gram-positivo (coram de azul) ou Gram-negativo (coram de vermelho);

- forma: cocos, bacilos ou espirilos;
- arranjo (disposição das células entre si): Os cocos podem estar isolados, aos pares (diplococos), agrupados em cachos (estafilococos) ou em cadeia (estreptococos). Os bacilos apresentam-se, de um modo geral, como células isoladas, no entanto, ocasionalmente, podem observar-se bacilos aos pares (diplobacilos) ou em cadeia (estreptobacilos).

Esta coloração é efetuada, no CHMT, automaticamente, no corador *Aerospray® Gram Series 2* da *ELITECHGROUP*. Este equipamento utiliza os corantes violeta de cristal, iodina e safranina, assim como metanol (solução descorante) e água destilada<sup>93</sup>.

De referir ainda que são feitos esfregaços para coloração por Gram de todos os produtos biológicos que se destinem a análise microbiológica, exceto pontas de cateteres, material de próteses, exsudados nasal, perineal e vaginal/retal, urina ou fezes<sup>91</sup>.

#### Método da Auramina

A Auramina O é um corante fluorescente utilizado na identificação de micobactérias, que coram de amarelo-esverdeado, quando se incide um raio de luz ultravioleta.

Este método é realizado automaticamente no equipamento *PolyStainer* da *IUL INSTRUMENTS* e utiliza os corantes auramina e fucsina, assim como o descorante para Ziehl-Neelsen e água corrente<sup>93</sup>.

#### Método de Kinyoun

O princípio da coloração pelo método de Kinyoun assenta na resistência do bacilo, corado com fucsina, à descoloração com soluções álcool-ácido, devido à constituição da sua parede celular. Este método é similar ao da coloração por Ziehl-Neelsen, contudo a sua realização é feita a frio, ou seja, sem necessidade de aquecer a lâmina coberta com fucsina até à emissão de vapores, como aconteceria no método de Ziehl-Neelsen<sup>93</sup>.

Esta coloração é feita automaticamente no equipamento *PolyStainer* da *IUL INSTRUMENTS* e utiliza fucsina e azul de metileno como corantes, assim como um descorante para Ziehl-Neelsen e água corrente<sup>93</sup>.

## **EXAME DIRETO A FRESCO**

O exame direto a fresco mais utilizado em Microbiologia é o exame direto a fresco com contraste negativo por Tinta da China, para verificar a presença de *Cryptococcus spp.* em amostras biológicas ou a partir de colónias em cultura. Este corante é utilizado como material contrastante, pois a cápsula polissacarídea de *Cryptococcus spp.* exclui a Tinta da China deixando visível, ao redor da célula fúngica, um halo transparente<sup>94</sup>.

A preparação desta lâmina deve ser feita, colocando uma gota de Tinta da China e outra de soro fisiológico num tubo, tendo atenção à homogeneização correta desta preparação. Em amostras biológicas líquidas ou culturas em meio líquido, deve ser adicionado à preparação anterior, uma gota do sedimento e, no caso de colónias em meio de cultura sólido, deve-se retirar uma porção da colónia a estudar e proceder do mesmo modo. De notar que, caso seja necessária uma preparação com uma tonalidade mais clara, deve-se adicionar uma pequena gota de soro fisiológico à preparação e, caso seja necessária uma tonalidade mais escura, deve-se proceder do mesmo modo, no entanto, adicionando uma pequena gota de Tinta da China. Finalizada a preparação anterior, retirar uma gota e colocar sobre uma lâmina sobrepondo, logo de seguida, uma lamela para observação ao microscópio<sup>94</sup>.

### **4.2.4. Exame cultural**

#### **CULTURA PRIMÁRIA**

A cultura primária de produtos para estudo bacteriológico e/ou micológico destina-se à recuperação, a partir dos produtos, de microrganismos potencialmente patogénicos, para posterior identificação e estudo<sup>95</sup>.

#### **Meios de cultura**

Para que a cultura seja bem-sucedida é necessário selecionar os meios de cultura adequados ao produto enviado e ao estudo pretendido<sup>91</sup>. Para isso, é necessário conhecer os diferentes tipos de meios utilizados, assim como, a sua composição.

Os meios de cultura podem ser líquidos, sólidos e semissólidos, em função da composição em agar e são classificados em três tipos distintos: seletivos, não seletivos e diferenciais<sup>95,96</sup>. Existem ainda meios cromogénicos que possibilitam a identificação presuntiva

de alguns microrganismos que reduzem os substratos cromogéneos, após um curto período de incubação, tornando-se visíveis no meio de cultura pela sua alteração de cor<sup>95</sup>.

Antes da sementeira é importante que os meios atinjam a temperatura ambiente e que as placas sejam identificadas com o número de registo da análise, o produto que se está a semear e o dia e hora da sementeira<sup>91</sup>. Os meios de cultura utilizados no SPC do CHMT estão descritos detalhadamente no Apêndice II e os meios adequados para cada tipo de amostra serão mencionados no subcapítulo 4.2.9. *Interpretação dos Resultados*.

### **Técnicas de sementeira**

Sementeira por quadrantes: Este tipo de sementeira é utilizado para cultura em meios sólidos em placa. A sementeira é feita estriando, um quarto da placa de cada vez, sobrepondo as estrias até que os quatro quadrantes estejam todos estriados. Para um melhor isolamento, as sobreposições das estrias devem ser reduzidas gradualmente até que, no último quadrante, não se sobreponham<sup>95</sup>.

Sementeira por espalhamento com zaragatoa: Este tipo de sementeira é utilizado para cultura em meios sólidos em placa, normalmente, meios cromogéneos. Este tipo de meios deve ser estriado de forma apertada, ou seja, sobrepondo as estrias, com a zaragatoa original tendo o cuidado de estriar sempre duas vezes no mesmo sítio<sup>95</sup>.

Sementeira para quantificação de colónicas: Utilizada para sementeira de urina em meios sólidos em placa. O produto deve ser semeado utilizando uma ansa de diâmetro calibrado, capaz de transferir uma quantidade fixa de urina de 0,001 ml, de modo a padronizar o fator de diluição. Neste tipo de sementeira, uma colónia equivale a  $1 \times 10^3$  Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/ml e o inóculo deve ser feito com uma linha vertical no centro da placa, espalhando-o com uma série de passagens a 90° com a linha original<sup>95</sup>.

Sementeira em meio líquido: Transferir uma porção da amostra para o tubo com o meio ou, em amostras sólidas, submergir a amostra com o meio. No caso das amostras em zaragatoa, esta deve ser submersa no meio e esfregada contra a parede para libertar o máximo de produto possível. No fim do procedimento a mistura deverá ser homogeneizada suavemente<sup>95</sup>.

A qualidade das sementeiras é avaliada pelo MPC/TSS aquando da observação após incubação adequada.

## SUBCULTURAS

Nos casos em que há crescimento de colónias, as culturas em curso devem ser avaliadas através da sua análise morfológica e da execução de alguns testes rápidos, de modo a permitir a identificação de bactérias/fungos potencialmente patogénicos. Para isso, é fundamental isolar as colónias em cultura pura e recente, para que possam ser feitos os testes necessários à sua identificação definitiva e, se necessário e possível, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos<sup>97</sup>.

De acordo com as indicações do MPC/TSS, devem ser selecionados os meios de cultura adequados e as placas devem ser identificadas da mesma forma que a placa de origem, no entanto, devem também indicar o meio de cultura inicial e, se houver mais do que um tipo de colónia a isolar para o mesmo registo, o número de isolamento correspondente a essa colónia. A colónia deve ser repicada e a sementeira feita em quadrantes, tendo o cuidado de separar as estrias em função das características das colónias originais e de garantir um inóculo suficiente para a prossecução do estudo<sup>97</sup>.

### 4.2.5. Identificação de microrganismos

A decisão da valorização clínica das estirpes isoladas no meio de cultura, baseia-se na compreensão da patogenia da infeção nos diferentes locais anatómicos. Para além disso, a identificação e posterior teste de suscetibilidade aos antimicrobianos só devem ser realizados a partir de colónias isoladas.

No CHMT, a identificação de microrganismos é feita principalmente no equipamento *MALDI-TOF microflex LT* da *BRUKER*, que utiliza a técnica de espetrometria de massa para determinar a impressão digital proteómica do microrganismo. Mais especificamente, o sistema deste equipamento mede proteínas presentes no microrganismo e analisa os padrões característicos dessas proteínas, comparando-os com uma biblioteca de referência, de modo a determinar a identidade do organismo. Para que a qualidade do ensaio seja assegurada é ainda utilizado como controlo da técnica uma amostra de *Bacterial Test Standard* (BTS). O BTS é um extrato da bactéria *Escherichia coli* com uma composição específica e que cobre todo o espetro de massa das proteínas utilizadas para a identificação precisa dos microrganismos.

Por outro lado, a identificação poderá ser feita ainda no equipamento *VITEK*<sup>®</sup> 2 da *BIOMÉRIEUX*. Este equipamento identifica o microrganismo através da utilização de cartas de

identificação baseadas em métodos bioquímicos e em substratos, que medem a utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e resistência do microrganismo contido numa solução padrão. Consoante as características macroscópicas do exame cultural, o TSS/MPC utiliza as seguintes cartas de identificação:

- GN, para identificação de bactérias Gram-negativas, fermentadoras e não fermentadoras de lactose;
- GP, para identificação de bactérias Gram-positivas;
- ANC, para identificação de bactérias anaeróbias e Corinebactérias;
- NH, para identificação de bactérias dos géneros *Neisseria* e *Haemophilus* e outras bactérias Gram-negativas fastidiosas;
- YST, para identificação de leveduras.

É de salientar ainda que, a identificação é dispensada quando é feito o isolamento da mesma espécie de microrganismo em amostras idênticas, colhidas em dias sucessivos.

#### **4.2.6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) deve ser realizado para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e para o qual seja necessária a aplicação de terapêutica antimicrobiana<sup>96</sup>.

No setor de Microbiologia do SPC, os TSA podem ser feitos de forma automatizada, com o auxílio do equipamento *VITEK*<sup>®</sup> 2 da *BIOMÉRIEUX* ou de forma manual, pelo método de difusão.

##### **TSA AUTOMATIZADO**

Da mesma forma que o *VITEK*<sup>®</sup> 2 da *BIOMÉRIEUX* possui cartas para identificação de microrganismos, também utiliza cartas para a realização do TSA do microrganismo identificado.

Neste método, as colónias isoladas de cada tipo de microrganismo que possa ter um papel patogénico são selecionadas da cultura e é feita uma suspensão com solução salina, numa concentração padronizada. Esta suspensão é usada para reidratar o meio antibiótico na carta, que depois é celada e incubada. O equipamento monitoriza o crescimento do microrganismo

em cada um dos poços durante o ciclo de incubação. Posteriormente, os valores da Concentração Mínima Inibitória (CMI) são determinados para cada antimicrobiano contido na carta. A CMI é a concentração mais baixa de antimicrobiano em que ocorre inibição do crescimento do microrganismo. Por último, o sistema atribui um critério de interpretação (sensível, intermédio ou resistente) ao resultado da CMI, para ajudar o clínico na orientação da terapêutica<sup>98</sup>.

São então utilizadas as seguintes cartas para a realização do TSA:

- AST-355, para determinação do TSA de bacilos Gram-negativos aeróbios com significado clínico;
- AST-373, para determinação do TSA de *Pseudomonas spp.*;
- AST-648, para determinação do TSA de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus agalactiae*;
- AST-586, para determinação do TSA de *Enterococcus spp.* e *S. agalactiae*;
- AST-576, para determinação do TSA de *Streptococcus pneumoniae*;
- AST-ST03, para determinação do TSA de *S. pneumoniae*, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos e *Streptococcus viridans*;
- AST-YS08, para determinação do TSA de leveduras com relevância clínica.

## **TSA MANUAL**

### Método de difusão em placa

O método de difusão é um procedimento no qual se semeia, por espalhamento com zaragatoa, uma suspensão bacteriana padronizada (solução padrão de McFarland com densidade de 0,5), no meio sólido Gelose Mueller-Hinton, e no qual se colocam discos de papel de filtro impregnados em antimicrobianos. Após incubação de dezasseis a dezoito horas, são medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada disco, sendo que o tamanho do halo é inversamente proporcional à CMI do microrganismo. Assim, e tendo em conta a literatura, é obtido um resultado qualitativo do microrganismo em relação ao antimicrobianos, que se exprime em sensível, intermédio ou resistente<sup>96</sup>.

### Teste de Suscetibilidade à Colistina

Para além do descrito anteriormente, no SPC, existe ainda o *MIC-Strip Colistin* que é um TSA manual específico para o antibiótico colistina.

Assim como nos TSA descritos anteriormente, também no *MIC-Strip Colistin* é necessário efetuar uma suspensão da bactéria Gram-negativa em cloreto de sódio, com uma

turbidimetria de 0,5 na escala McFarland. Posteriormente, uma pequena quantidade desta suspensão é transferida para um meio líquido de Muller-Hinton, que servirá para reidratar os poços da *strip* que contém diferentes concentrações de antibiótico, assim como, o poço controle. Depois de todos os poços reidratados, as *strips* são tapadas e inoculadas na estufa, a aproximadamente 35°C, durante dezoito a vinte e duas horas até à sua leitura. A CMI é obtida através da concentração de colistina do primeiro poço onde não é possível visualizar o crescimento do microrganismo, ou seja, no poço onde não se observa turvação. O resultado é dado qualitativamente, da mesma forma que os TSA manual e automático, de acordo com os intervalos de concentrações mencionados na bula do teste<sup>99</sup>.

## **ANTIMICROBIANOS**

A seleção dos antimicrobianos a serem testados, tanto na escolha da carta de antibiograma no modo automatizado, como nos discos do TSA manual, é uma decisão do MPC/TSS responsável pela validação dos resultados na área da Microbiologia.

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, tendo em conta o seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação (consultar Apêndice III). Independentemente disso, todos os antimicrobianos devem ser referidos utilizando os nomes genéricos de modo a facilitar o diálogo entre o laboratório e o clínico<sup>96</sup>.

É ainda de referir que as condições de armazenamento das cartas de antibiograma e discos de antibióticos são fundamentais para que não haja interferência nos resultados obtidos. Os discos de  $\beta$ -lactâmicos, carbapenemes, cefalosporinas e de combinações com inibidores das  $\beta$ -lactamases devem ser armazenados a uma temperatura de -20°C, enquanto que as cartas de antibiograma do equipamento *VITEK*<sup>®</sup> 2, assim como, todos os outros discos de antibióticos usados no CHMT, requerem um armazenamento a 4°C<sup>96</sup>.

## **INTERPRETAÇÃO DO TSA**

A interpretação do TSA pressupõe um conhecimento vasto sobre os antimicrobianos, incluindo a estrutura química, modo de ação, farmacodinâmica, farmacocinética, mecanismos de resistência e respetivos fenótipos microbianos, resistência intrínseca, e correlação dos resultados *in vitro* com a resposta clínica à terapêutica. Por este motivo, a interpretação do TSA, tanto manual, como automatizado, é realizada apenas pelo MPC/TSS responsável pela validação dos resultados e o resultado é dado de modo qualitativo, ou seja, de acordo com a CMI, o microrganismo pode ser descrito como<sup>96</sup>:

- Sensível, quando o microrganismo responde à terapêutica com o antimicrobiano, utilizando a dosagem normalmente recomendada para determinado tipo de infecção e microrganismo envolvido;
- Resistente, quando não existe uma boa resposta terapêutica às concentrações habitualmente utilizadas com aquele antimicrobiano e/ou está presente um mecanismo específico de resistência do microrganismo que está a provocar a infecção;
- Intermédio, quando a CMI do antimicrobiano é próxima do valor que o microrganismo pode atingir quando provoca infecção e para a qual a resposta clínica é inferior à de uma estirpe sensível. Nestes casos é importante que a utilização do antimicrobiano seja apenas em locais onde é concentrado fisiologicamente, como é o caso das quinolonas, na urina, ou seja, utilizada uma dosagem maior.

É de referir ainda que esta interpretação só deverá ser feita se o controlo da qualidade, feito com estirpes padrão, esteja dentro dos limites de confiança estipulados pelo laboratório.

## LIMITAÇÕES

No que diz respeito ao TSA manual por método de difusão em placa, este apenas está padronizado para alguns microrganismos, por isso, sempre que seja utilizado para outros microrganismos sem método de difusão padronizado, os resultados devem ser dados como presuntivos, devendo isso ser referido no resultado<sup>96</sup>.

Em relação a todos os métodos de realização do TSA mencionados neste subcapítulo é bastante importante a temperatura de incubação das placas ou cartas, pois existem microrganismos que crescem melhor a determinadas temperaturas, o que pode originar halos de inibição maiores, originando falsas suscetibilidades. Por outro lado, em culturas com mais de vinte e quatro horas, o número de microrganismos inviáveis aumenta, pelo que o inóculo não terá o número de microrganismos viáveis suficiente para a realização do TSA por estes métodos<sup>96</sup>.

No TSA manual existem ainda numerosas fontes de erro que podem afetar os resultados, como é o caso da concentração do inóculo, a composição e espessura do meio de Mueller-Hinton, perda da potência dos discos, temperatura incorreta da estufa de incubação e erros na leitura dos halos<sup>96</sup>.

## 4.2.7. Controlo da Qualidade

O controlo da qualidade no setor de Microbiologia é feito de forma diferente dos outros setores, visto que esta área requer ainda muitas técnicas manuais e, por conseguinte, está mais sujeita a que ocorram erros durante todo o processo.

A utilização de estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*), que têm características fenotípicas previamente conhecidas, permite avaliar os procedimentos utilizados para a realização dos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos em equipamentos automáticos<sup>100</sup>, mas também em TSA manual, e instituir medidas corretivas, caso sejam detetados erros.

O controlo da qualidade é feito semanalmente, sendo utilizadas estirpes ATCC diferentes de semana para semana, como demonstrado na Tabela 3. As estirpes utilizadas são quase sempre obtidas a partir das culturas de trabalho e são armazenadas a -20°C até à sua utilização. A cultura de trabalho é preparada uma vez por semana, com início às segundas-feiras e o procedimento nos dias seguintes deve seguir o seguinte esquema: Cultura – Subcultura – Identificação e TSA automatizado e manual<sup>100</sup>.

Tendo em conta que o controlo da qualidade do equipamento de identificação *MALDI-TOF microflex* é feito pelo BTS, sempre que se realiza uma corrida de identificação, a identificação das estirpes ATCC do controlo da qualidade interno apenas são realizadas no equipamento de identificação alternativo *VITEK*<sup>®</sup> 2. Quanto ao TSA do controlo da qualidade interno, este deverá ser feito sempre no equipamento *VITEK*<sup>®</sup> 2 e manualmente. No TSA manual, os discos de antimicrobianos usados devem estar de acordo com o estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Tabela 3: Estirpes ATCC utilizadas para controlo da qualidade interno no setor de Microbiologia.

Estirpe	Cartas <i>VITEK</i> <sup>®</sup> 2
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	GP AST-586
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	GN AST-355
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	GP AST-576 AST-ST03
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	GP AST-648
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	GN AST-373

Fonte: CQI - Testes de Identificação e Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Equipamento Automático

(Instrução de Trabalho)<sup>100</sup>.

Assim que os resultados estiverem disponíveis, o MPC/TSS deverá validá-los se estiverem de acordo com os limites de confiança estabelecidos, ou rejeitá-los se isso não se verificar. Quando os resultados não estiverem conforme esperado, deverá procurar-se a causa do erro e corrigir-se sempre que possível. Nestes casos, o controlo deverá ser repetido na semana seguinte, juntamente com o já programado para essa semana. Os resultados e eventuais ações corretivas devem ficar sempre registados no equipamento e no impresso destinado para o efeito<sup>100</sup>.

#### 4.2.8. Testes rápidos

##### **PESQUISA DE CARBAPENEMASES KPC, OXA, VIM, IMP NDM**

Os  $\beta$ -lactâmicos são uma classe de antibióticos de primeira linha para o tratamento de infeções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. No entanto, desde o início do seu uso massivo, a sua eficácia tem diminuído, devido à produção, por parte das bactérias, de enzimas que os inativam: as  $\beta$ -lactamases<sup>101</sup>.

Antes da década de 1990, a maior parte da resistência aos antibióticos estava associada à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, designadas de ESBL, e que pertenciam às classes A, B, C e D da classificação de Ambler. As carbapenemases são enzimas que fazem parte desse grupo e são responsáveis pela hidrólise dos carbapenemes. Nos últimos anos, estudos apontam para um aumento da produção destas enzimas por parte de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, as quais se destacam a  $\beta$ -lactamase KPC (classe A), os metalo- $\beta$ -lactâmicos do tipo IMP, VIM e NDM (classe B), assim como OXA-48 (classe D). Estas carbapenemases são detetadas, principalmente, em ambientes hospitalares e são responsáveis pela maioria das infeções nosocomiais<sup>101</sup>.

- Amostra: Colónia bacteriana isolada em meio de cultura sólido.
- Metodologia: O *NG-Test® CARBA 5* é um ensaio imunocromatográfico *multiplex* visual que deteta um ou mais dos cinco tipos comuns de carbapenemases: KPC, OXA-48, IMP, VIM e NDM. Nesse ensaio, ocorre a ligação antigénio-anticorpo anti-carbapenemase, o que faz com que apareça uma ou mais linhas nas regiões de teste (K, O, V, I ou N), indicando um resultado positivo para uma ou mais carbapenemases. A linha controlo tem de estar sempre presente para que o teste seja válido e um resultado negativo é dado quando só esta linha é visível<sup>101</sup>.

- Desempenho do método: Este teste rápido tem uma sensibilidade de 96,3% e especificidade de 94,0%.

- Limitações/interferências: Um resultado negativo não exclui a presença de organismos produtores de carbapenemases nem a presença de outros mecanismos de resistência aos antibióticos<sup>101</sup>.

Podem ocorrer resultados falsos negativos com múltiplas subculturas sem qualquer pressão seletiva ou nos casos de culturas de *Proteus mirabilis* em gelose de sangue<sup>101</sup>.

## **TESTE RÁPIDO A *STREPTOCOCCUS* DO GRUPO A**

*Streptococcus pyogenes* são cocos Gram-positivos, pertencentes ao grupo A de Lancefield. Estas bactérias produzem um antigénio que pode causar infeções graves, como faringite, infeção respiratória, impetigo, endocardite, meningite, sépsis puerperal e arterite. Estas infeções, se não forem tratadas, podem levar a diversas complicações, incluindo febre reumática e abscesso periamigdaliano, pelo que é necessário o diagnóstico rápido deste tipo de infeções, o que não é possível nos procedimentos tradicionais de cultura e posterior identificação<sup>102</sup>.

- Amostra: Zaragatoa nasofaríngea.

- Metodologia: O teste rápido *Strep A* é um imunoensaio de fluxo lateral, qualitativo, para a deteção de antigénio de estreptococos do grupo A. A presença de uma linha colorida na região de teste indica um resultado positivo, enquanto que a sua ausência indica um resultado negativo. Este teste tem ainda uma linha de controlo que deverá aparecer sempre, independentemente de o resultado ser positivo ou negativo, que indicará que o volume de amostra foi adequado e que ocorreu a absorção da membrana<sup>102</sup>.

- Desempenho do método: O teste rápido *Strep A* tem uma sensibilidade de 92,3% e uma especificidade de 96,4%<sup>102</sup>.

- Limitações/interferências: Um resultado falsamente negativo pode ser obtido em amostras onde a concentração de antigénio está abaixo do nível de deteção. Por outro lado, excesso de sangue ou muco na amostra podem interferir com o teste e originar falsos resultados positivos<sup>102</sup>.

## PESQUISA DO ANTIGÊNIO CAPSULAR DE *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* são diplococos Gram-positivos,  $\alpha$ -hemolíticos, aeróbios e encapsulados, responsáveis pela maior parte das pneumonias, meningites e otites de origem bacteriana. Este microrganismo pode colonizar o trato respiratório superior sem causar qualquer tipo de infecção, no entanto, quando atinge o trato respiratório inferior, nomeadamente os pulmões, pode provocar uma pneumonia aguda. Por outro lado, através da extensão de uma otite ou pneumonia, *S. pneumoniae* pode entrar na corrente sanguínea e meninges, causando infecções purulentas que se não forem rapidamente tratadas podem levar à morte do indivíduo. A cápsula de *S. pneumoniae* é formada por um polissacarídeo complexo, crucial para evitar a fagocitose por parte das células fagocitárias, o que contribui para a sua virulência e patogenicidade. Para além disso, o antigénio capsular é fundamental para a deteção e identificação do tipo sorológico do pneumococo presente nas amostras que chegam ao laboratório<sup>103</sup>.

- Amostra: Colónia bacteriana obtida de cultura em meio sólido.
- Metodologia: *Oxoid Dryspot™ Pneumo Test* é um ensaio de aglutinação que utiliza partículas de latex desidratadas em cartões. Estas partículas são sensibilizadas com anticorpos específicos para a maioria dos tipos sorológico de pneumococos, o que faz com que estas se aglutinem na presença de antigénio e formem precipitados visíveis. Na área controlo, estas partículas estão cobertas com globulinas não sensibilizadas e desidratadas para que seja possível a validação dos resultados obtidos. O resultado é positivo se a aglutinação das partículas na área de teste for observada em sessenta segundos e significa que o microrganismo em cultura se trata de *S. pneumoniae*<sup>103</sup>.
  - Desempenho do método: Este teste rápido apresenta uma sensibilidade de 97,9% e uma especificidade de 93,2%<sup>103</sup>.
  - Limitações/interferências: Podem ocorrer reações falsamente negativas nos casos de número de colónias insuficiente para a realização do teste. Por outro lado, reações falsamente positivas podem ocorrer quando estão presentes certos estreptococos do grupo C ou as espécies *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mitori*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*. Além disso, também podem ocorrer reações sorológicas cruzadas entre pneumococos e bactérias Gram-negativas, especificamente, *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Haemophilus influenza*<sup>103</sup>.

## **PESQUISA DE SANGUE OCULTO NAS FEZES**

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é um exame normalmente solicitado pelo médico como rastreio de patologias gastrointestinais inferiores, como por exemplo, cancro cólon-retal, principalmente em pessoas que possuem histórico familiar<sup>104</sup>.

Este exame é também usado para investigar a causa de anemia ou para auxiliar no diagnóstico de alterações inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e colite<sup>104</sup>.

- Amostra: Fezes.
- Metodologia: *Chemtrue® One-Step FOB* é um teste rápido imunocromatográfico de leitura visual para deteção qualitativa de hemoglobina em amostras fecais. A amostra de fezes extraída e dissolvida em tampão salino move-se ao longo da membrana cromatográfica por ação da capilaridade e, quando a hemoglobina está presente na amostra, faz com que os anticorpos se complexem a ela formando uma linha visível na região de teste (resultado positivo). Por outro lado, quando não existe hemoglobina na amostra extraída, não se forma uma banda visível na região teste (resultado negativo). Como indicador do procedimento e de modo a garantir que o desempenho do teste e do dispositivo é adequado, deverá aparecer sempre uma banda colorida na região de controlo<sup>104</sup>.
- Desempenho do método: Este teste rápido imunocromatográfico apresenta uma sensibilidade de 98,3% e uma especificidade de 99,6%<sup>105</sup>.
- Limitações/interferências: A diluição excessiva das amostras com urina ou água sanitária podem dar origem a resultados erróneos. É ainda de salientar que, resultados negativos não excluem a presença de hemoglobina nas fezes, uma vez que alguns pólipos ou cancros da região cólon-retal podem provocar hemorragias intermitentemente ou o sangue pode não se encontrar distribuído uniformemente na amostra<sup>104</sup>.

## **EXAME PARASITOLÓGICO DAS FEZES**

O exame parasitológico das fezes é fundamental em casos de suspeita clínica de parasitose intestinal, uma vez que, a partir dele se consegue proceder à identificação correta de ovos, quistos ou trofozoítos de protozoários e/ou parasitas.

As técnicas mais usadas para a realização deste exame são as de concentração e têm como principais objetivos aumentar o número de formas parasitárias na preparação, mantendo-os num estado inalterado, e eliminar a maior parte do material orgânico fecal. Dentro das técnicas de concentração podem-se encontrar dois tipos – flutuação e sedimentação, sendo que

as últimas são as recomendadas para uso no diagnóstico laboratorial, uma vez que são mais fáceis de executar e estão sujeitas a menos erros técnicos<sup>106</sup>.

- Amostra: Fezes.

- Metodologia: O *kit* de concentração de ovos/parasitas fecais, da *Epitope Diagnostics*, é um dispositivo que tem por base a técnica de sedimentação através de centrifugação. Este método consiste em dissolver/ressuspender a amostra de fezes numa solução de formalina a 10%, com o objetivo de fixar o material. Seguidamente, é adicionado acetato de etilo à suspensão e filtrada a mistura obtida com o auxílio do tubo de filtração/sedimentação. O filtrado é então centrifugado a baixa rotação (1500 rpm), durante três minutos, e o sobrenadante é decantado<sup>106</sup>. O sedimento obtido deve ser misturado gentilmente e observado a fresco ao microscópio, com uma gota de iodo para auxiliar no contraste.

### **PESQUISA DE *Campylobacter jejuni* E *C. coli***

*Campylobacter sp.* são bacilos Gram-negativos microaerófilos que, normalmente, habitam o trato gastrointestinal de muitos animais domésticos e aves. A sua transmissão ao ser humano é favorecida através do contacto direto com estes animais ou através do contacto ou ingestão de alimentos contaminados. No entanto, também é frequente haver transmissão de pessoa para pessoa, através de contato fecal-oral e sexual<sup>107</sup>.

Das quinze espécies conhecidas de *Campylobacter sp.*, *C. jejuni* e *C. coli* são os principais causadores de gastroenterite nos humanos. Muitas destas infeções ocorrem assintomaticamente, no entanto, em indivíduos mais suscetíveis, é frequente ocorrerem sintomas típicos como diarreia, câibras e dores abdominais. As fezes, normalmente, são de consistência pastosa, aguadas e podem ser acompanhadas de sangue<sup>107</sup>.

A terapêutica, neste tipo de infeções é, geralmente, feita através da ingestão de líquidos e eletrólitos e, somente em casos mais difíceis, se recorre ao tratamento com antibióticos<sup>107</sup>.

Atualmente, a campilobacteriose é uma das doenças diarreicas associadas aos alimentos mais comuns e, por isso, torna-se importante o seu correto diagnóstico<sup>107</sup>.

- Amostra: Fezes.

- Metodologia: O *RIDA® QUICK Campylobacter* é um teste imunocromatográfico de fluxo lateral, que utiliza anticorpos anti-*Campylobacter* com biotina e marcados a ouro. Sempre que uma amostra possua o agente patogénico, os anticorpos anti-*Campylobacter* marcados formam imunocomplexos, que são eluídos ao longo da membrana. A estreptavidina presente na linha de teste liga os imunocomplexos através da biotina acoplada ao anticorpo anti-

*Campylobacter*, o que origina uma coloração vermelha na linha de teste. Na linha de controlo, localizada depois da linha de teste, ligam-se os anticorpos livres, marcados a ouro, e esta deve ser sempre visível para que o teste seja válido<sup>107</sup>.

- Desempenho do método: O *RIDA*<sup>®</sup>*QUICK Campylobacter* apresenta uma sensibilidade de 98,4% e uma especificidade de 98,6%<sup>107</sup>.
- Limitações/interferências: Um resultado negativo não exclui uma possível infeção por *Campylobacter spp.*, pois a eliminação do agente patogénico pode ser intermitente ou a amostra não conter quantidade suficiente de antígeno para ser detetada por este teste. A utilização de amostra de fezes em excesso pode também originar resultados falsamente negativos, uma vez que pode causar uma coloração castanha da tira de teste, a qual acaba por ocultar a coloração vermelha<sup>107</sup>.

### **PESQUISA DE *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* E *Entamoeba histolytica***

Um parasita é um organismo que vive com um organismo hospedeiro e obtém o seu alimento às custas deste. Os parasitas que causam doenças em humanos podem ser agrupados em três classes principais: protozoários, helmintos e ectoparasitas.

Os protozoários são microrganismos unicelulares capazes de viver livremente na natureza ou parasitando um hospedeiro. Estes microrganismos são capazes de se multiplicar em vários animais e em humanos, o que contribui para a sua sobrevivência, sendo a sua transmissão feita por via fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados ou por contacto direto com pessoas ou animais infetados<sup>108</sup>.

A *Giardia lamblia* é um protozoário flagelado que, normalmente, habita no trato intestinal dos animais. A sua transmissão é feita na forma de quisto, o qual evolui para trofozoíto no intestino delgado, onde provoca infeção (giardíase). Da mesma forma que este microrganismo, também a *Entamoeba histolytica* é ingerida pelo ser humano na forma de quisto e provoca uma infeção intestinal mais grave designada de amebíase<sup>109</sup>.

Outro protozoário frequentemente associado a infeção gastrointestinal é o *Cryptosporidium parvum*. Esta espécie zoonótica é transmitida no estadio de oocisto e é no trato gastrointestinal do ser humano que faz o seu ciclo sexual, provocando uma infeção designada de criptosporidiose<sup>109</sup>.

Muitas das pessoas infetadas com estes parasitas não apresentam sintomas, no entanto, o mesmo não acontece em crianças pequenas, em idosos ou imunocomprometidos, que apresentam um quadro clínico de diarreia ou, em casos mais graves, de gastroenterite<sup>109</sup>.

O método mais usado para diagnosticar as infecções causadas por estes parasitas é o exame parasitológico das fezes. No entanto, a visualização de quistos, trofozoítos ou oocistos nas fezes é difícil e implica muita experiência, pelo que se recorre a testes imunocromatográficos para auxiliar no diagnóstico laboratorial destas infecções<sup>109</sup>.

- Amostra: Fezes.
- Metodologia: O *RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi Test* é um teste imunocromatográfico de fluxo lateral no qual, anticorpos específicos contra os antígenos dos parasitas, são acoplados a partículas de látex. Estas partículas possuem cores diferentes para cada parasita, sendo as de cor verde específicas para *Entamoeba histolytica*, as vermelhas para *Giardia lamblia* e as azuis para *Cryptosporidium parvum*<sup>109</sup>.

Neste teste, a amostra de fezes é suspensa no tampão de extração e, depois de sedimentada, é retirada uma parte de sobrenadante para ser colocado na cassete de teste. A amostra passa pela membrana contendo os anticorpos específicos, os quais se ligarão ao antígeno presente na amostra, formando uma tira da cor correspondente ao parasita identificado. Além disso, podem ocorrer todas as combinações das três tiras de teste específicas, conforme a existência dos três agentes patogénicos na amostra. Para que o teste seja válido é sempre necessário que apareça uma linha na região do controlo, que deverá apresentar uma cor púrpura<sup>109</sup>.

- Desempenho do método: A sensibilidade e especificidade deste método são calculadas individualmente para cada parasita. Assim, para *Cryptosporidium parvum*, a sensibilidade é de 83,0% e a especificidade de 93,3%. Para *Giardia lamblia*, a sensibilidade é de 91,9% e a especificidade de 99,5%. Por último, para *Entamoeba histolytica*, este método apresenta uma sensibilidade de 84,8% e uma especificidade de 87,4%<sup>109</sup>.

- Limitações/interferências: Um resultado negativo não exclui uma possível infecção por estes parasitas, uma vez que, uma quantidade muito pequena de antígeno na amostra pode originar este tipo de resultados. Também uma quantidade excessiva de amostra pode deturpar a cor das tiras de teste, levando a um falso resultado negativo<sup>109</sup>.

## **PESQUISA DE *Clostridium difficile***

O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo anaeróbio, formador de esporos<sup>110</sup>, e é parte integrante da flora intestinal saudável dos seres humanos<sup>111</sup>. A flora gastrointestinal num adulto saudável é geralmente resistente à colonização por *C. difficile*<sup>110</sup>. Contudo, a colonização é facilitada através da diminuição dessa flora intestinal, como por exemplo, através da

exposição a antibióticos ou outros fatores que possam comprometer a imunidade intestinal. Outro dos fatores determinantes para uma infeção provocada por *C. difficile* é o facto de algumas estirpes produzirem toxinas<sup>111</sup>, tornando-as mais toxinogénicas. A produção das toxinas A e B por estas estirpes de *C. difficile* desempenha um papel significativo na manifestação clínica da doença. Estas proteínas de alto peso molecular são imunológica e funcionalmente distinguíveis e podem agir por conta própria ou sinergicamente, sendo a toxina A uma enterotoxina e a toxina B uma citotoxina<sup>112</sup>. Uma vez que nem todas as estirpes de *C. difficile* são produtoras destas toxinas, em caso de suspeita de infeção, a deteção das toxinas A e B é o único procedimento de significado patognomónico<sup>111</sup>.

As infeções por *C. difficile* causam, normalmente, diarreias, no entanto, com a prevalência de estirpes mais toxinogénicas ao longo dos anos, tem havido uma maior incidência de formas mais graves da doença, como é o caso da colite pseudomembranosa<sup>112</sup>. Assim, torna-se fundamental a deteção de *C. difficile*, por forma a evitar a sua transmissão a indivíduos mais vulneráveis, como é o caso de doentes hospitalizados a fazer antibioterapia, independentemente de se tratar de uma estirpe de *C. difficile* toxinogénica ou não. Surge então a desidrogenase de glutamato (GDH), uma enzima produzida por algumas bactérias intestinais, entre elas *C. difficile*, e que se tornou um marcador de rastreio sensível para a deteção deste microrganismo. No entanto, e uma vez que esta enzima também se encontra noutras bactérias intestinais<sup>111</sup>, é fundamental que o diagnóstico complementa a deteção de GDH com a deteção das toxinas A e B.

- Amostra: fezes diarreicas (amostra única).
- Condições de colheita: Aquando da receção da amostra verificar, no histórico, a ocorrência de resultado positivo nas quatro semanas anteriores. Em caso afirmativo, não efetuar o teste e introduzir a respetiva incidência no *modulab*: “Sem indicação para repetição de teste previamente positivo num período inferior a quatro semanas”.
- Algoritmo de diagnóstico laboratorial:



Figura 29: Algoritmo de diagnóstico laboratorial de *Clostridium difficile*.  
 Fonte: Adaptado de Pesquisa de *Clostridium difficile* (Instrução de Trabalho)<sup>113</sup>.

▪ Metodologias: O teste *RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH* é um ensaio imunoenzimático cromatográfico para a detecção qualitativa da desidrogenase do glutamato específica de *Clostridium difficile*. Sempre que uma amostra contenha GDH de *C. difficile*, os anticorpos anti-GDH marcados formam imunocomplexos, que vão eluir pela membrana. A estreptavidina existente na linha de teste liga os imunocomplexos, através da biotina acoplada ao anticorpo anti-GDH, o que origina uma cor vermelha nessa linha. Na linha de controlo ligam-se os anticorpos não complexados marcados a ouro e esta deverá estar sempre presente para que o resultado seja válido<sup>111</sup>.

Da mesma forma que o anterior, também o *RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B* é um teste imunocromatográfico e processa-se do mesmo modo que o descrito anteriormente. No entanto, os anticorpos monoclonais utilizados são antitoxina A e antitoxina B e sempre que uma destas toxinas está presente na amostra, ocorre a formação de uma linha vermelha na região teste<sup>112</sup>.

O ensaio *Xpert® C. difficile BT* é um teste qualitativo para a detecção do gene tcdB (toxina B), cdt (toxina binária) e a deleção de um nucleótido na posição 117 do gene tcdC (estirpe de ribotipo 027) de *C. difficile*. Este teste utiliza o método de PCR e é executado no equipamento *GeneXpert®* da *CEPHEID*<sup>110</sup>. Consoante os resultados obtidos para cada um destes parâmetros, a interpretação dos mesmos deverá ser efetuada pelo MPC/TSS, segundo a tabela seguinte<sup>113</sup>:

Tabela 4: Interpretação dos resultados do ensaio *Xpert® C. difficile BT*.

Parâmetros	Resultados					
Gene da Toxina B	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Gene da Toxina Binária	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente
Deleção no gene da estirpe 027	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
Interpretação	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: Adaptado de Pesquisa de *Clostridium difficile* (Instrução de Trabalho)<sup>113</sup>.

▪ Desempenho dos métodos: O teste *RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH* apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98%<sup>111</sup>. O mesmo não acontece no teste *RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B*, que apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de apenas 91%<sup>114</sup> apresentando, por isso, uma elevada taxa de resultados falsos negativos. Por este motivo, nos casos em que o teste anterior tenha apresentado um resultado negativo, é ainda utilizado o teste *Xpert® C. difficile BT* como teste confirmatório, que apresenta uma sensibilidade de 98,8% e uma especificidade de 90,9%<sup>110</sup>.

▪ Interpretação clínica: Os genes que codificam para a toxina A (tcdA) e para a toxina B (tcdB) fazem parte do *locus* de patogenicidade (PaLoc). A maioria das estirpes patogênicas contém ambas as toxinas, contudo, algumas variantes que contêm apenas a toxina B têm sido reconhecidas também como patogênicas, o que tem levado à conclusão de que o principal fator de virulência de *C. difficile* é a citotoxina B<sup>110</sup>.

Algumas estirpes de *C. difficile* também produzem uma toxina binária. O *locus* desta toxina contém dois genes distintos (cdtA e cdtB) e está localizado fora do PaLoc. Ao longo dos anos, em laboratório, têm sido isoladas estirpes produtoras de toxina binária que têm mutações no gene regulador de toxina negativa (tcdC), isto é, uma deleção no nucleótido 117 (tcdCΔ117), consistente com as estirpes de ribotipo 027. A infecção provocada por estas estirpes pode estar associada a uma taxa de mortalidade e morbidade mais elevada, incluindo internamento em unidade de cuidados intensivos e internamento prolongado. Isto deve-se ao facto de algumas estirpes 027 apresentarem uma produção de toxina binária aumentada provocada pelas deleções no gene regulador tcdC, o que leva à produção de mais esporos e, conseqüentemente, a uma maior persistência no ambiente<sup>110</sup>.

## **FILMARRAY**

Os painéis *FilmArray*<sup>®</sup> são testes de diagnóstico qualitativos que se baseiam na deteção e identificação simultânea dos ácidos nucleicos contidos em amostras de bactérias, vírus, fungos ou parasitas. Estes testes utilizam um método de PCR e são utilizados no equipamento *FilmArray*<sup>®</sup> da *BIOFIRE - BIOMÉRIEUX*<sup>115-116</sup>.

### Painel Gastrointestinal

O *FilmArray*<sup>®</sup> *Gastrointestinal Panel* é utilizado em amostras de fezes de indivíduos com sinais e/ou sintomas de infecção gastrointestinal<sup>115</sup>, para identificação dos microrganismos descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Microrganismos identificados através do *FilmArray*<sup>®</sup> *Gastrointestinal Panel*.

Bactéria	Vírus
<i>Campylobacter spp.</i> ( <i>C. jejuni/C. coli/C. upsaliensis</i> ) <i>Clostridium difficile</i> (toxina A/B) <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella spp.</i> Vibrio ( <i>V. parahaemolyticus/V. vulnificus/ V. cholerae</i> ), incluindo a identificação específica de <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adenovírus F 40/41 Astrovírus Norovírus GI/GII Rotavírus A Sapovírus (Genogrupos I, II, IV e V)
<i>E. coli/Shigella spp. causadoras de diarreia</i>	Parasitas
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica (EPEC) <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) lt/st <i>Escherichia coli</i> produtora das toxinas <i>Shiga</i> stx1/stx2 (incluindo a identificação específica de <i>E. coli</i> O157) <i>Shigella/Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	<i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>

Fonte: Adaptado de *FilmArray*<sup>®</sup> *Gastrointestinal Panel*<sup>115</sup>.

### Painel Meningite

O *FilmArray*<sup>®</sup> *Meningitis/Encephalitis Panel* é um painel que utiliza amostras de LCR, obtidas por punção lombar, de indivíduos com sinais e/ou sintomas de meningite e/ou encefalite<sup>117</sup>. Os microrganismos identificados neste painel estão mencionados na Tabela 6.

Tabela 6: Microrganismos identificados pelo *FilmArray*<sup>®</sup> *Meningitis/Encephalitis Panel*.

Bactérias	
<i>Escherichia coli</i> K1	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Vírus	
Citomegalovírus (CMV)	Enterovírus (EV)
Vírus do herpes humano 6 (HHV-6)	Vírus <i>Herpes simplex 1</i> (HSV-1)
Parecovírus humano (HPeV)	Vírus <i>Herpes simplex 2</i> (HSV-2)
Vírus <i>Varicella zoster</i> (VZV)	
Levedura	
<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	

Fonte: Adaptado de *FilmArray*<sup>®</sup> *Meningitis/Encephalitis Panel*<sup>117</sup>.

### Painel Respiratório

O *FilmArray*<sup>®</sup> *Respiratory Panel 2 plus* é um painel usado para identificação dos microrganismos referidos na Tabela 7, a partir de zaragatoas nasofaríngeas de indivíduos com suspeita de infeções do trato respiratório<sup>118</sup>.

Tabela 7: Vírus e bactérias identificados através do *FilmArray® Respiratory Panel 2 plus*.

Vírus	Bactérias
Adenovírus	<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)
Coronavírus (subtipos 229E, HKU1, NL63, OC43 e MERS-CoV)	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)
Metapneumovírus humano	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Rhinovírus/Enterovírus humano	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Vírus Influenza A (subtipos H1, H1-2009 e H3)	
Vírus Influenza B	
Vírus parainfluenza 1, 2, 3 e 4	
Vírus sincicial respiratório	

Fonte: Adaptado de *FilmArray® Respiratory Panel 2 plus*<sup>118</sup>.

### Painel Sépsis

Com o *FilmArray® Blood Culture Identification Panel* são utilizadas amostras de hemocultura identificadas como positivas para a identificação dos microrganismos indicados na Tabela 8. De salientar que os resultados deste painel devem ser interpretados em conjunto com o exame direto<sup>116</sup>.

Tabela 8: Microrganismos e genes de resistência identificados através do *FilmArray® Blood Culture Identification Panel*.

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Leveduras
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Staphylococcus sp.</i>	Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>Genes de resistência aos agentes antimicrobianos</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Proteus spp.</i>	mecA - resistência a meticilina
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>	vanA/B - resistência a vancomicina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	KPC - resistência a carabapenemes
	<i>Neisseria meningitidis</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Fonte: Adaptado de *FilmArray® Blood Culture Identification Panel*<sup>116</sup>.

### **GENEXPERT**

Os ensaios *Xpert®*, são ensaios qualitativos ou semi-quantitativos, realizados no equipamento *GeneXpert®* da *CEPHEID*, para estudos de biologia molecular utilizando o método de RT-PCR. Estes ensaios permitem a amplificação de ácidos nucleicos específicos e, através de *primers* e sondas de hibridação específicas, são capazes de detetar as sequências amplificadas<sup>80,119-123</sup>.

### Xpert® vanA/vanB

O ensaio *Xpert® vanA/vanB* é um teste utilizado para detecção dos genes de resistência à vancomicina (vanA e vanB) de enterococos isolados a partir de amostras de zaragoas retais e perianais. Este ensaio destina-se a auxiliar no reconhecimento, prevenção e controlo da colonização por organismos resistentes à vancomicina em unidades de cuidados de saúde, pelo que não deve ser utilizado para o diagnóstico de infeções por enterococos resistentes à vancomicina<sup>119</sup>.

### Xpert® MRSA NxG

O ensaio *Xpert® MRSA NxG* é um teste que se destina à detecção de DNA de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), a partir de zaragoas nasais. Este ensaio destina-se a ajudar na prevenção e no controlo de infeções por MRSA em Unidades de Saúde, pelo que não deve ser utilizado no diagnóstico, orientação ou monitorização do tratamento de infeções por MRSA, nem ao fornecimento de resultados da suscetibilidade à meticilina. De salientar que, um resultado negativo neste teste não exclui a colonização por MRSA<sup>120</sup>.

### Xpert® Carba-R

O ensaio *Xpert® Carba-R* foi concebido para a detecção e diferenciação das sequências dos genes blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaOXA-48 e blaIMP-1, associados à resistência de bactérias Gram-negativas aos carbapenemes. Este teste é realizado a partir de amostras de zaragoas retais e tem como principal objetivo a detecção de bactérias não suscetíveis aos carbapenemes, que colonizam doentes em Unidades de cuidados de saúde<sup>121</sup>.

### Xpert® Flu

O ensaio *Xpert® Flu* é um teste que se destina à detecção e diferenciação do RNA dos vírus da gripe A, gripe B e gripe H1N1 2009. Este ensaio utiliza amostras de aspirados nasais e zaragoas nasofaríngeas colhidas de pacientes com sinais e/ou sintomas de infeção respiratória. Os resultados negativos não excluem a infeção por vírus da gripe<sup>122</sup>.

### Xpert® HPV

O ensaio *Xpert® HPV* é um teste para a detecção da região E6/E7 do genoma viral (DNA) proveniente do Vírus do Papiloma Humano (HPV). Este ensaio realiza a amplificação de catorze serotipos de HPV de alto risco ao mesmo tempo e identifica especificamente os

serotipos HPV 16 e HPV 18/45. As amostras utilizadas são devem conter células cervicais colhidas para o Teste de Papanicolau (exame citológico)<sup>123</sup>.

#### Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF

O ensaio *Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF* é um teste semi-quantitativo de *nested* PCR. Este ensaio é usado para detecção do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e detecção de mutações do gene *rpoB*, associadas à resistência à rifampicina, em amostras de expetoração, de indivíduos com suspeita clínica de tuberculose (não tratados)<sup>80</sup>.

### **4.2.9. Interpretação dos resultados**

A interpretação conjunta dos resultados disponíveis de exames diretos, de exames culturais, de provas complementares e de testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos é feita pelo MPC/TSS responsável pela validação. É ainda fundamental que este tenha em conta a informação clínica relevante, de modo a cumprir o principal objetivo do setor de Microbiologia: a identificação de microrganismos causadores de infeção no utente, assim como a obtenção do respetivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos<sup>78</sup>.

Os resultados devem ser introduzidos no *modulab* à medida que estiverem disponíveis e a sua validação é feita quando o MPC/TSS entender que existe informação preliminar relevante disponível para validação final ou quando todos os exames estiverem concluídos<sup>78</sup>.

## **URINA**

As infeções do aparelho urinário são das mais frequentes no Homem e são, normalmente, causadas por bactérias saprófitas da flora intestinal, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra<sup>96</sup>.

Em crianças e adultos sem outras patologias associadas, os agentes etiológicos mais frequentes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, mais precisamente *Escherichia coli*. O mesmo não se verifica em doentes internados e com fatores de risco como algaliação permanente, tubos de nefrostomia, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, pois a variedade de agentes etiológicos aumenta e podem surgir infeções por *Pseudomonas*

*spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* e fungos, estes últimos particularmente frequentes em doentes sob antibioterapia<sup>96</sup>.

É ainda importante referir que a urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem através da uretra, durante a micção, arrasta os microrganismos que a colonizam, o que pode induzir a erros na interpretação da urocultura<sup>96</sup>.

- Condições de colheita: Para o diagnóstico de infeção do aparelho urinário são válidas as seguintes amostras de urina: micção “jato médio”, punção de cateter urinário, punção supra-púbica (particularmente indicado em doentes algaliados e crianças, nos quais a interpretação de resultados de exames anteriores foi impossível), drenagem de nefrostomia/ureterostomia e saco coletor pediátrico<sup>96</sup>.

- Exame direto: Exame direto a fresco do sedimento urinário, com observação de elementos celulares relevantes, como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos ou parasitas<sup>91</sup>.

- Exame cultural: O exame cultural deverá ser feito em meio *Cystine Lactose Electrolyte Deficient* (CLED) ou, se a amostra for proveniente das consultas de Obstetrícia ou de colheitas supra-púbicas, semear a urina também em Gelose de Sangue (GS), pela técnica sementeira para quantificação de colónias. A incubação de ambos os meios é feita em estufa a 35°C com condições de aerobiose<sup>91</sup>. Após a incubação deve ser feita a leitura do número de colónias, sendo que uma colónia corresponde a uma concentração de 10<sup>3</sup> UFC/ml, dez colónias correspondem a 10<sup>4</sup> UFC/ml e cem colónias correspondem a 10<sup>5</sup> UFC/ml<sup>96</sup>.

- Interpretação clínica: Numa urina colhida por micção “jato médio” ou por punção de cateter urinário, a valorização dos resultados deverá ter em conta uma série de parâmetros, tais como o método de colheita da urina, o tipo de doente, a sintomatologia, o exame direto do sedimento urinário e os resultados de exames bacteriológicos anteriores. Por isso, quando a colheita é feita por micção e ocorre o crescimento de duas ou mais estirpes bacterianas ou microrganismos, o TSS/MPC deve considerar que houve uma má colheita da urina ou um atraso no transporte e/ou processamento laboratorial da mesma e deve requisitar nova colheita. Assim, nestes tipos de colheita, só se deve valorizar quando existe crescimento apenas de um microrganismo e a contagem de colónias é superior ou igual a 10<sup>5</sup> UFC/ml<sup>96</sup>.

No caso de urina colhida por saco coletor pediátrico, é necessária uma atenção redobrada, pois o exame cultural pode dar resultados falsamente positivos, por provável contaminação com a flora do períneo. Nestes casos os resultados podem ser confirmados, repetindo a colheita de urina por outro método<sup>96</sup>.

Por último, nas amostras de urina colhidas por punção supra-púbica, por se tratar de um produto biológico estéril, deverão ser valorizadas quaisquer microrganismos que cresçam isoladamente, excluindo contaminação por bactérias comensais da pele, independentemente da sua quantificação<sup>96</sup>.

## HEMOCULTURA

Quando uma infecção não é diagnosticada e tratada devidamente e o agente etiológico tem uma grande capacidade infecciosa, este pode espalhar-se pela corrente sanguínea e atingir outros órgãos, dando origem a um quadro de choque séptico ou septicemia<sup>96</sup>.

Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção<sup>96</sup>

- Exame direto: O exame direto é feito por observação microscópica de um esfregaço da hemocultura positivo corado pelo método de Gram<sup>91</sup>.
- Exame cultural: A amostra deverá ser semeada sempre em meio GS e, nos casos de suspeita de infecção por *Brucella sp.*, em meio Gelose de chocolate enriquecida com *PolyViteX* (PVX), pela técnica de sementeira por quadrantes. Quando existe pesquisa de fungos, é ainda necessário semear o produto em Gelose de Sabouraud com cloranfenicol (SAB), pela mesma técnica de sementeira. A incubação dos meios de SAB e PVX é, normalmente, feita em condições de aerobiose, numa estufa a cerca de 35°C e o meio GS, em estufa de CO<sub>2</sub>, com condições de aerobiose e temperatura a 35°C<sup>91</sup>. Após incubação, deve ser realizada uma observação macroscópica da cultura e realizada a identificação e TSA do microrganismo.
  - Outros testes: *FilmArray*<sup>®</sup> *Blood Culture Identification Panel*.
  - Interpretação clínica: A valorização de um resultado de hemocultura depende de vários fatores como o estado de imunocompetência do indivíduo, o agente etiológico identificado, a proporção de hemoculturas positivas sobre o total de hemoculturas recolhidas do mesmo doente e do tempo decorrido para a positividade do resultado. Este último fator torna-se importante porque, geralmente, os microrganismos sugestivos de causar infecção são detetados num prazo inferior a quarenta e oito horas e os microrganismos contaminantes, em prazos maiores<sup>96</sup>.

## CATETER VASCULAR

Muitas das infecções da pele ou da corrente sanguínea, em doentes hospitalizados, podem começar no local onde está colocado o cateter vascular, pelo que o envio deste dispositivo para exame microbiológico tem como principal objetivo avaliar se este é a origem do quadro infeccioso<sup>96</sup>.

- Exame cultural: O cateter deve ser retirado do recipiente de transporte com o auxílio de material esterilizado e colocado na superfície da placa de GS, em condições de assepsia. A técnica usada para sementeira de pontas de cateter é a Técnica de Maki, que consiste em rodar este dispositivo na superfície do meio de cultura com auxílio de uma vareta esterilizada<sup>96</sup>. A incubação deve ser feita a 35°C e em atmosfera de aerobiose e CO<sub>2</sub><sup>91</sup>. Após incubação, caso a cultura se encontre pura e com desenvolvimento de mais de quinze colónias, deve-se proceder à identificação e TSA do microrganismo.

- Interpretação clínica: Os resultados obtidos no exame cultural do cateter devem ser sempre correlacionados com os resultados da hemocultura concomitante, sendo que as estirpes com maior probabilidade de serem agentes patogénicos, independentemente do número presente são *Streptococcus* β-hemolíticos do Grupo A, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. De salientar ainda que não devem ser valorizados clinicamente exames culturais de cateteres que apresentem mais do que três espécies microbianas<sup>96</sup>.

## LCR

A meningite é uma doença transmissível causada pela inflamação das meninges, que são as membranas que protegem o cérebro e a medula espinal. Esta infeção é uma situação clínica grave e potencialmente mortal se não for tratada atempadamente<sup>124</sup>. Por isso, o diagnóstico laboratorial é urgente e requer processamento imediato do produto para determinar o agente etiológico. Geralmente a causa da infeção são bactérias aeróbias, mas na presença de abscesso cerebral o agente etiológico pode ser uma bactéria anaeróbia<sup>96</sup>. Na tabela seguinte estão descritos os agentes etiológicos mais prováveis consoante a idade ou condição do indivíduo infetado.

Tabela 9: Agentes etiológicos de meningite consoante a idade ou condição do indivíduo infetado.

<b>IDADE OU CONDIÇÃO</b>	<b>MICRORGANISMOS</b>
<b>Recém-nascido</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Herpes simplex virus 2</i>
<b>&lt; 2 meses</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>E. coli</i>
<b>&lt; 10 anos</b>	Vírus <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
<b>Adultos jovens</b>	Vírus <i>N. meningitidis</i>
<b>Adultos</b>	<i>S. pneumoniae</i> <i>N. meningitidis</i>
<b>Idosos</b>	<i>S. pneumoniae</i> Bacilos Gram-negativo <i>L. monocytogenes</i>
<b>Imunodeprimidos</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Fonte: Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia<sup>96</sup>.

- **Exame direto:** Esfregação efetuado por espalhamento de uma ou duas gotas de sedimento do LCR numa lâmina esterilizada e corado pelo método de Gram.
- **Exame cultural:** Para a realização do exame cultural, o LCR deverá ser semeado nos seguintes meios: GS, PVX, pela técnica de sementeira por quadrantes, e no meio líquido de enriquecimento BHI, pela técnica de sementeira em meio líquido. Quando existe suspeita de infeção por fungos, o LCR deve ainda ser semeado em meio SAB, pela técnica de sementeira por quadrantes. Os meios GS e PVX devem ser incubados a uma temperatura de 35°C e em atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub>, enquanto que os meios BHI e SAB são incubados em condições de aerobiose, à mesma temperatura<sup>91</sup>. Após incubação, deve ser realizada uma observação macroscópica da cultura e realizada a identificação e TSA do microrganismo.
  - **Outros testes:** *FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel*.
  - **Interpretação clínica:** O aspeto do LCR, embora não seja considerado um exame, funciona como um indicativo de infeção. Normalmente, o LCR é límpido e incolor, contudo, nos processos infecciosos, ocorre o aumento de elementos figurados (células), causando a sua turvação, cuja intensidade varia de acordo com a quantidade e o tipo desses elementos. Assim, nestes casos, qualquer identificação de microrganismo deve ser de valorizar, pelo que o clínico deve ser imediatamente informado, mesmo antes de ser realizado o TSA. A avaliação do aspeto do LCR, conjuntamente com a interpretação do exame direto e cultural, são fundamentais para o diagnóstico de meningite<sup>96</sup>.

## LÍQUIDOS DE SEROSAS

As serosas são membranas húmidas que se encontram nas cavidades do corpo e são constituídas por uma camada parietal, que reveste a parede da cavidade, e pela camada visceral, que cobre as superfícies exteriores dos órgãos contidos na cavidade. As células da serosa segregam fluido seroso, claro e pouco espesso, responsável pela lubrificação das superfícies das camadas visceral e parietal, de modo a que estas deslizem uma sobre a outra facilmente. Este líquido permite a redução da fricção dos órgãos entre si e com as paredes da cavidade onde estão contidos<sup>125</sup>.

As membranas serosas são denominadas de acordo com o local e os órgãos associados. Existem então as seguintes serosas<sup>125</sup>:

Tabela 10: Membranas serosas e respetivos fluídos serosos.

Serosa	Órgãos e cavidades envolvidas	Fluído seroso
<i>Pleura</i>	Cavidade torácica e pulmões	Líquido pleural
<i>Pericárdio</i>	Coração	Líquido pericárdico
<i>Peritoneu</i>	Cavidade abdominal e pélvica e todos os órgãos abdominais	Líquido peritoneal/ascítico
<i>Membrana sinovial</i>	Cavidades articulares e bainhas dos tendões	Líquido sinovial

Fonte: Adaptado de Serosa – Infopédia<sup>125</sup>.

- **Exame direto:** O exame direto deve ser feito através de um esfregaço do sedimento do líquido, corado pelo método de Gram.
- **Exame cultural:** Semear os líquidos pleural, pericárdico, peritoneal e sinovial em meio GS e PVX pelo método de sementeira em quadrantes e, no meio líquido BHI, pelo método de sementeira em meio líquido. Quando existe suspeita de infeção por fungos, a amostra deve ser semeada também em meio SAB. As placas de GS e PVX devem ser incubadas em atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub> e a uma temperatura de 35°C, enquanto que as placas de SAB e os tubos de BHI apenas são incubados em condições de aerobiose, à mesma temperatura<sup>91</sup>. Após incubação, deve ser realizada uma observação macroscópica da cultura e realizada a identificação e TSA do microrganismo.
- **Interpretação clínica:** Em condições fisiológicas, estes líquidos são encontrados em pequenas quantidades nas respetivas cavidades corporais e essa quantidade é regulada por um sistema complexo de dinâmica de fluidos. Quando os mecanismos fisiológicos responsáveis pela formação ou absorção do fluido seroso estão alterados, ocorre um aumento excessivo do mesmo. Assim, a acumulação de líquido ocorre quando a permeabilidade capilar ou a pressão

hidrostática aumentam, quando a pressão oncótica diminui ou quando a drenagem linfática é obstruída, situações que ocorrem na maior parte dos fenómenos infecciosos<sup>126</sup>.

Assim, e tendo em conta que os líquidos orgânicos são normalmente estéreis, qualquer microrganismo encontrado deve ser valorizado. A interpretação final deve ainda ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado<sup>96</sup>

## **EXSUDADOS E COLEÇÕES PURULENTAS**

As infeções localizadas são provocadas por uma grande variedade de microrganismos e, muitas das vezes, conduzem à formação de exsudados purulentos. Por conseguinte, o estudo microbiológico deste tipo de produto biológico tem de ter em consideração os seguintes aspetos<sup>96</sup>:

- Local da infeção;
  - História clínica e dados epidemiológicos;
  - Tipo de infeção;
  - Técnica de colheita.
- Exame direto: O exame direto é feito por esfregaço do produto biológico e coloração pelo método de Gram<sup>91</sup>.
  - Exame cultural: O produto deve ser semeado sempre nos meios sólidos GS e Gelose MacConkey (MAC), pela técnica de sementeira por quadrantes, e no meio líquido BHI, pela técnica de sementeira em meio líquido. No caso de suspeita de infeção por fungos, a sementeira deve ser feita em meio SAB e o produto semeado pela mesma técnica usada nos meios sólidos acima mencionados. A incubação deve ser feita a 35°C, no entanto, nas sementeiras realizadas em MAC, BHI e SAB, a atmosfera deve ser apenas de aerobiose e, na sementeira de GS, a atmosfera deve ser de aerobiose e CO<sub>2</sub>. Após incubação, deve-se analisar as culturas e proceder à identificação do(s) microrganismo(s) presente(s) e respetivo TSA<sup>91</sup>.
  - Interpretação clínica: Perante a variedade de situações clínicas e de agentes microbianos implicados neste tipo de infeções, aquando a valorização das culturas de exsudados ou coleções purulentas, torna-se bastante importante distinguir microrganismos pertencentes à flora da pele (contaminantes), dos agentes potencialmente patogénicos<sup>96</sup>.

## EXSUDADOS OCULARES

As infeções oculares ocorrem quando microrganismos patogénicos invadem qualquer parte do globo ocular ou tecidos vizinhos e, podem ser divididas em infeções das estruturas externas e internas do olho e infeções do sistema lacrimal<sup>96</sup>.

Fazem parte das infeções das estruturas externas do olho: blefarite, que é uma infeção aguda ou crónica da margem da pálpebra, envolvendo pele e pestanas; conjuntivite, infeção da membrana que reveste a córnea (conjuntiva) e, queratite, infeção da córnea<sup>96</sup>.

Nas infeções das estruturas internas do olho, embora seja a única, a endoftalmite (infeção da cavidade ocular e tecido intraocular) é a infeção mais grave da região ocular<sup>96</sup>.

As infeções do sistema lacrimal são: canaliculite, infeção do canal lacrimal, frequentemente associada a obstrução do mesmo; dacriocistite, infeção do saco lacrimal causada, normalmente, por obstrução do canal lacrimal e, dacrioadenite, infeção das glândulas lacrimais<sup>96</sup>.

Por último, dentro das infeções oculares, pode ainda ser encontrada a celulite orbital. Esta infeção é uma infeção sistémica grave, que envolve o tecido orbitário, e que resulta de um trauma, cirurgia, extensão de uma infeção proveniente da região do osso etmoide ou dos seios perinasais ou de disseminação hematogénica<sup>96</sup>.

Para a interpretação correta das culturas é importante ter em conta que, a nível do saco conjuntival, existe uma flora saprófita constituída principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*, no entanto, também podem ser encontrados outras bactérias e fungos<sup>96</sup>.

- Exame direto: O exame direto deve ser feito por esfregaço do exsudado ocular, corado pelo método de Gram<sup>91</sup>.

- Exame cultural: Devido à constante ação de lavagem das lágrimas, normalmente, o número de microrganismos isolados de algumas infeções oculares é baixo, pelo que é recomendada a utilização de um grande inóculo e a sementeira em vários meios de cultura<sup>96</sup>. Por isso, no CHMT, o produto é semeado no meio líquido BHI, por sementeira em meio líquido, e nos meios sólidos GS e PVX ou Gelose seletiva para bactérias do género *Haemophilus* (HAE), por sementeira em quadrantes. No entanto, de acordo com a suspeita clínica, podem ainda ser associados outros meios de cultura, como é o caso do meio SAB para cultura de fungos. A incubação dos meios é feita a uma temperatura de 35°C e as atmosferas usadas são de aerobiose e CO<sub>2</sub> para os meios sólidos e apenas de aerobiose para o meio líquido e SAB<sup>91</sup>.

- Interpretação clínica: Dentro dos principais agentes etiológicos das infeções oculares, destaca-se a espécie *Staphylococcus aureus*, juntamente com algumas espécies do género

*Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*). No entanto, os agentes etiológicos dependem do local da infecção ocular e do estado clínico e idade do indivíduo<sup>96</sup>.

As conjuntivites representam o tipo de infecção ocular mais frequente, principalmente, as conjuntivites bacterianas, podendo ocorrer por inoculação direta/exógena ou por disseminação hematogênica a partir de um foco infeccioso. Para além dos referidos anteriormente, estas infecções podem ainda ser causadas por *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia trachomatis* e outros bacilos Gram-negativos<sup>96</sup>.

No caso das queratites, estas podem apresentar variadas etiologias, no entanto, as bactérias são as principais responsáveis por este tipo de infecção ocular. Esta infecção deverá ser tratada urgentemente, pois na maioria dos casos de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* pode ocorrer a perda do olho em menos de vinte e quatro horas. À parte disto, também podem ser responsáveis pelas queratites microrganismos do género *Acanthamoeba*, fungos leveduriformes ou vírus<sup>96</sup>.

No que toca às infecções do aparelho lacrimal, é de salientar que as canaliculites são, normalmente, provocadas por microrganismos anaeróbios, embora também possam ocorrer infecções mistas por aeróbios e anaeróbios<sup>96</sup>.

## **EXSUDADOS AURICULARES**

O ouvido é formado por três partes: o ouvido externo (orelha e canal auditivo), ouvido médio (tímpano e câmara de ar) e ouvido interno (órgãos da audição e equilíbrio).

Quando ocorre uma inflamação das tubas auditivas estas podem ficar bloqueadas, o que compromete a ventilação do ouvido médio e, conseqüentemente, a criação de um ambiente propício à invasão desse espaço por microrganismos. Por outro lado, este edema impede que algum líquido que esteja contido no canal auditivo (por exemplo, água) seja drenado, favorecendo, mais uma vez, a proliferação de microrganismos patogénicos.

Portanto, a otite é uma infecção no ouvido, causada por vírus ou bactérias e que pode provocar dor, inflamação e acumulação de líquido. As otites podem dividir-se em externa e média. A primeira geralmente é provocada pela entrada de água no ouvido, associada a quadro clínico intenso de otalgia e ocorre em situações de infecção do canal auditivo externo<sup>127</sup>, normalmente por *Pseudomonas aeruginosa*<sup>96</sup>. A otite média corresponde a um processo inflamatório/infeccioso da cavidade do ouvido médio e tímpano e está associada a quadros de obstrução nasal e rinorreia. Normalmente, ocorre em bebés e crianças e apresenta uma sintomatologia que varia desde a sensação de ouvido tapado a otalgia intensa<sup>127</sup>. Os agentes

etiológicos mais frequentes da otite média são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Haemophilus influenzae*, no entanto, podem ainda ser encontrados *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, bactérias da família *Enterobacteriaceae* e bactérias anaeróbios<sup>96</sup>.

- Exame direto: O exame direto deve ser feito por esfregaço do produto biológico, corado pelo método de Gram<sup>91</sup>.

- Exame cultural: O exsudado auricular deve ser semeado pela técnica de sementeira por quadrantes nos meios sólidos GS, PVX ou HAE e pela técnica de sementeira em meio líquido no meio BHI. A incubação dos meios sólidos deve ser feita em estufa com atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub> e o meio líquido em atmosfera de aerobiose sem CO<sub>2</sub>, todos a uma temperatura de 35°C. Quando existe a pesquisa de fungos é necessário ainda fazer a sementeira em meio SAB, pela mesma técnica utilizada para a sementeira dos restantes meios sólidos, e a incubação deve ser feita à mesma temperatura dos restantes meios e em atmosfera de aerobiose<sup>91</sup>.

- Interpretação clínica: A nível laboratorial apenas é possível o diagnóstico de otites de origem bacteriana, no entanto, é de salientar que é importante para a interpretação clínica e valorização das culturas fazer a distinção entre as zaragatoas auriculares de pus com origem no ouvido médio por rutura do tímpano, das zaragatoas para diagnóstico de infeções bacterianas da pele do canal auditivo externo<sup>96</sup>.

## **FEZES**

As infeções do aparelho gastrointestinal são infeções virais, bacterianas ou parasitárias que causam gastroenterite, uma inflamação do trato gastrointestinal (estômago e intestino delgado). Estas infeções têm uma elevada incidência na população em geral, no entanto, levam a uma maior morbilidade em determinados grupos etários, como nas crianças e idosos<sup>96</sup>.

Para a orientação na pesquisa do agente etiológico é necessário ter em conta os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia do indivíduo<sup>96</sup>.

- Exame cultural: Por rotina, neste produto biológico, devem ser pesquisadas as bactérias *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, e *Campylobacter spp.* Tendo isto em conta, os meios de cultura utilizados no CHMT para este tipo de amostras são os meios seletivos MAC e Gelose Hektoen (HEKT), conjuntamente com o meio líquido Selenito. Neste caso, os meios sólidos seletivos devem ser sempre semeados pela técnica de sementeira por quadrantes e o meio líquido pela

técnica de sementeira em meio líquido. Os meios devem ser sempre incubados a uma temperatura de 35°C e em condições de aerobiose<sup>91</sup>. Normalmente, devido à grande variedade de microrganismos existente neste tipo de produto biológico é realizada uma subcultura do meio de enriquecimento (Selenito) para o meio que o MPC/TSS entender ser o mais adequado para cultura do provável agente etiológico da infecção.

Nos casos de teste rápido positivo para pesquisa de *Campylobacter sp.*, deve-se ainda semear o produto no meio Gelose *Campyloset* (CAMPY) e incubado este meio em atmosfera de microaerofilia (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>), a 42°C, durante quarenta e oito a setenta e duas horas<sup>96</sup>. Após incubação, deve ser sempre feita a identificação do microrganismo em cultura e TSA do mesmo.

- Outros testes: Pesquisa de sangue oculto, Exame parasitológico, Pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Clostridium difficile*, FilmArray® *Gastrointestinal Panel*, Xpert® *vanA/vanB* e Xpert® *Carba-R*.

- Interpretação clínica: Os microrganismos responsáveis pelas infecções gastrointestinais têm vindo a alterar-se ao longo do tempo, devido a fatores como o aumento dos movimentos migratórios, maior frequência de viagens intercontinentais, aumento do número de doentes imunodeprimidos e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico cada vez mais rápidos e sensíveis. Assim, torna-se importante a sua correta identificação, bem como a realização do TSA, a fim de evitar a aplicação de terapêutica pouco adequada e a criação de mais resistências aos antimicrobianos<sup>96</sup>.

Uma das causas mais comuns de gastroenterite bacteriana em todo mundo, principalmente em crianças, é a infecção por *Campylobacter sp.*. Para além disso, também os adenovírus e os rotavírus são responsáveis por causar infecções a nível pediátrico<sup>128</sup>.

Outro dos agentes etiológicos de infecções gastrointestinais é a bactéria *Clostridium difficile* que dá origem a uma infecção do cólon chamada colite pseudomembranosa. Esta infecção provoca diarreias intensas e é normalmente contraída em contexto hospitalar, devido à toma de antibióticos. Com o atual surgimento de uma estirpe de *C. difficile* altamente toxinogénica e resistente, responsável por surtos mais graves e frequentes, aumentando a morbidade e mortalidade, tornou-se necessário o uso de técnicas laboratoriais mais avançadas para a sua identificação<sup>128</sup>.

As infecções gastrointestinais são, normalmente, adquiridas através da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogénicos. Um desses microrganismos é a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, a responsável pela chamada diarreia do viajante e uma

das principais causas de diarreia nos países em desenvolvimento. Esta bactéria entra no organismo, geralmente, pela ingestão de água contaminada com fezes humanas ou animais. Existe ainda a estirpe *E. coli* O157:H7 (*E. coli* entero-hemorrágica), produtora da toxina *Shiga*, que provoca uma infecção gastrointestinal com sintomas que incluem diarreia com sangue e vômitos. Esta estirpe de *E. coli*, se não for tratada pode levar a complicações como a síndrome hemolítica urêmica e insuficiência renal. Também as bactérias do gênero *Salmonella* e *Shigella* e a espécie *Yersinia enterocolitica* são responsáveis pelas infecções gastrointestinais de origem alimentar, nomeadamente, através da ingestão de produtos crus. Dento das infecções gastrointestinais podem ainda ser encontradas as intoxicações alimentares, onde o agente etiológico mais comum é *Staphylococcus aureus*, um microrganismo patogénico oportunista que pode ser encontrado em alguns alimentos contaminados<sup>128</sup>.

## **ESPERMA E EXSUDADOS VAGINAL, ENDOCERVICAL, URETRAL E PERINEAL**

A determinação das amostras apropriadas para o diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos potencialmente envolvidos na infecção.

Algumas infecções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é potenciada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita<sup>96</sup>. No entanto, estas infecções também podem ser causadas por microrganismos transmitidos durante uma relação sexual com o parceiro infetado e todas elas provocam sintomatologia como desconforto e corrimento e odor vaginal.

Já as infecções do trato genital masculino são, na maioria dos casos, assintomáticas e, por isso, nem sempre são diagnosticadas, o que potencia o desenvolvimento de complicações como a infertilidade masculina. Dependendo da localização da infecção, a produção, o transporte ou a função dos espermatozoides também pode ficar comprometida.

- **Exame direto:** O exame direto pode ser feito a fresco, para observação da presença ou ausência de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes, mas também por esfregaço do produto biológico, corado pelo método de Gram, para observação da flora existente. Este exame não se aplica para o exsudado perineal<sup>96</sup>.

- **Exame cultural:** O exame cultural em todos os produtos biológicos, à exceção do exsudado perineal, é feito através da sementeira nos meios sólidos GS, Gelose de chocolate com vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim (VCAT) e em SAB ou no meio cromogénico Gelose *Candida* (CAN). No caso do exsudado perineal, este deve ser semeado no

meio cromogéneo específico MRSA. Todos os meios devem ser semeados pela técnica de sementeira por quadrantes, exceto os meios cromogéneos CAN e MRSA, que devem ser semeados pela técnica de sementeira por espalhamento com zaragatoa. Os meios GS e VCAT devem ser incubados em atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub> e os meios SAB ou CAN e MRSA apenas em condições de aerobiose, no entanto, ambos a uma temperatura de 35°C. Após o período de incubação, os microrganismos devem ser identificados e realizado o TSA do provável agente etiológico da infeção<sup>91</sup>.

- Interpretação clínica: A valorização clínica das culturas é efetuada de acordo com a informação clínica e o exame direto.

As infeções genitais femininas mais frequentes são as vulvovaginites, provocadas maioritariamente por *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*, no entanto, microrganismos como *Actinomyces spp.* e *Staphylococcus aureus* têm sido encontrados em infeções associadas ao uso do Dispositivo Intrauterino e tampões, respetivamente. Outra infeção encontrada nos órgãos reprodutores femininos superiores é a doença inflamatória pélvica e que, geralmente, é causada por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, transmitidos durante o ato sexual com um parceiro infetado. A doença inflamatória pélvica pode ser uma infeção do colo do útero (cervicite), do endométrio (endometrite), das trompas de Falópio (salpingite) ou uma combinação das anteriormente mencionadas. Podem ainda ocorrer uretrites, úlceras genitais ou infeção da glândula de Bartholin, causadas por alguns dos microrganismos acima mencionados. É de salientar que se deve ter especial atenção ao quadro fisiológico da mulher, uma vez que as mulheres grávidas podem contrair estas infeções, contudo causadas por uma variedade maior de microrganismos e, se não forem tratadas rapidamente, podem comprometer a saúde materno-fetal<sup>96</sup>.

No caso do aparelho genital masculino, as infeções desenvolvem quadros assintomáticos e, geralmente, permanecem sem diagnóstico, o que pode levar ao comprometimento da fertilidade, a menos que o indivíduo procure tratamento para sintomas específicos. Assim, dependendo da localização da infeção, podemos ter: uretrite, epididimite e úlceras genitais que são, na maioria dos casos, provocadas pelas bactérias *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*. Existem ainda as prostatites e orquites que são causadas, principalmente, por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e por *Pseudomonas spp*<sup>96</sup>.

## **EXSUDADO VAGINAL/RETAL**

Na mulher grávida, as doenças infecciosas podem colocar a gravidez em risco afetando, muitas das vezes, a saúde materno-fetal. Neste estado fisiológico, o sistema imunológico da mulher fica diminuído, de modo a que seja possível o desenvolvimento do feto. Por esse facto, muitos microrganismos oportunistas podem causar infeção no organismo materno, comprometendo a evolução da gestação. Um exemplo disso são os estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*), que podem originar infeções genitais e levar a complicações durante a gravidez ou pós-parto se não forem tratadas.

- Exame cultural: O exame cultural é feito por sementeira por espalhamento com zaragatoa de um exsudado vaginal/retal no meio cromogéneo para o rastreio de estreptococos do grupo B (STRB). Este meio deve ser incubado a 35°C em condições de aerobiose. Após o período de incubação, as colónias desta bactéria aparecerão a rosa no meio de cultura<sup>91</sup>.

- Interpretação clínica: Os estreptococos do grupo B, são bactérias que estão presentes no intestino de todos os seres humanos e que, por contacto, passam do aparelho intestinal ao genital através do períneo. A colonização por estes microrganismos pode ser transitória, crónica ou intermitente e é, frequentemente, encontrada em mulheres grávidas ou em doentes imunodeprimidos. Na grávida, a infeção genital provocada por *S. agalactiae* não causa sintomas específicos, no entanto, no recém-nascido pode originar meningite, sépsis ou pneumonia.

Nos recém-nascidos, a infeção por *S. agalactiae* pode ocorrer ainda dentro do útero, por invasão do líquido amniótico ou na hora do parto, durante a passagem pelo canal vaginal, pelo que as gestantes devem ser tratadas antes do parto.

## **ASPIRADO DOS SEIOS PERINASAIS E EXSUDADOS NASAL E FARÍNGEO**

As infeções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maior parte de etiologia viral, no entanto, também podem ser identificadas bactérias como agentes etiológicos destas infeções. Nestas situações, o diagnóstico bacteriológico torna-se mais dificultado, pois existe uma flora abundante nos locais de recolha de amostras, à exceção dos seios perinasaís<sup>96</sup>.

O trato respiratório superior é composto por estruturas que se localizam fora do tórax, nomeadamente, a cavidade nasal (seios nasais), a cavidade oral, a laringe e a faringe, sendo esta última dividida em nasofaringe, orofaringe e laringofaringe. As infeções que atingem estas estruturas podem então ser causadas por vários agentes patogénicos, tais como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e membros da família

*Enterobacteriaceae*. Estes microrganismos podem constituir uma flora transitória ou estar presentes em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis, pelo que são necessários também fatores do hospedeiro para que haja infecção<sup>96</sup>.

- Exame direto: O exame direto destes produtos biológicos deve ser feito através da observação microscópica de um esfregaço corado pela coloração de Gram<sup>91</sup>.

- Exame cultural: No exame cultural os meios de cultura usados diferem de produto para produto. Assim, as amostras de exsudado nasal devem ser semeadas pela técnica de sementeira por espalhamento com zaragatoa no meio MRSA e o exsudado faríngeo semeado pela técnica de sementeira por quadrantes no meio sólido GS e pela técnica de sementeira em meio líquido no meio BHI. No caso dos aspirados perinasais, os meios sólidos utilizados são GS e PVX ou HAE e SAB (caso seja pedida pesquisa de fungos), semeados pela técnica de sementeira por quadrantes e o meio líquido BHI, semeado pela técnica de sementeira em meio líquido. A incubação de todos os meios sólidos, à exceção do MRSA e SAB, é feita numa estufa a 35°C com atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub> e os meios BHI, MRSA e SAB são incubados numa estufa à mesma temperatura, no entanto, com uma atmosfera apenas de aerobiose. Após incubação, as colónias isoladas sugestivas de estar a originar infecção devem ser identificadas e feito o TSA desse microrganismo<sup>96</sup>.

- Outros testes: Pesquisa de *Streptococcus* do grupo A, *FilmArray*<sup>®</sup> *Respiratory Panel 2 plus*, *Xpert*<sup>®</sup> *MRSA NxG* e *Xpert*<sup>®</sup> *Flu*.

- Interpretação clínica: As infeções mais frequentes do trato respiratório superior são a faringite, laringite, epiglote e sinusite.

Os principais agentes etiológicos de faringite e laringite são vírus. Contudo, a faringite pode ser causada ainda por *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A (*S. pyogenes*) ou por *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico. No caso da laringite, o exame bacteriológico não está indicado, exceto quando há suspeita de difteria ou infecção por *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A.

A epiglote, geralmente, tem uma etiologia bacteriana sendo, maioritariamente, provocada por *Haemophilus influenzae* do tipo B. O diagnóstico deve ser, essencialmente, clínico ou através de hemoculturas, pois a colheita de amostras da epiglote está contraindicada devido a um risco elevado de obstrução aguda das vias aéreas<sup>96</sup>.

Contrariamente às outras infeções, a sinusite, normalmente, tem origem endógena, a partir de microrganismos presentes nas vias aéreas superiores. Nestes casos, a única amostra válida para exame bacteriológico é a obtida por punção dos seios perinasais onde são,

frequentemente, encontrados *Streptococcus pneumoniae* e outros como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos<sup>96</sup>.

## SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS

O trato respiratório inferior é constituído pelos órgãos localizados na cavidade torácica, ou seja, pela parte inferior da traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares.

As infeções nas vias respiratórias inferiores exigem um acompanhamento médico mais próximo e um tratamento mais longo e complexo, pois o agravamento do estado do utente pode acontecer em questão de horas, principalmente em doentes imunocomprometidos. Para além disso, o diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é, frequentemente, dificultado pela contaminação das amostras com a flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade<sup>96</sup>.

- Amostras: Expetoração, secreções brônquicas, lavado brônquico, lavado bronco-alveolar, aspirado transtraqueal, aspirado pulmonar/transtorácico<sup>96</sup>.
- Exame direto: O exame direto deve ser feito por observação microscópica de um esfregaço do produto biológico, corado pelo método de Gram<sup>91</sup>.

No caso de amostras de expetoração e secreções brônquicas, o esfregaço deve ser feito por estiramento de uma porção purulenta e a observação ao microscópio feita com a objetiva de 10x em aproximadamente dez campos, de modo a avaliar a qualidade da amostra tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas da orofaringe e leucócitos. Nestes casos, a amostra deve ser ainda classificada segundo os critérios de Murray e Washington e só deve ser feito o exame cultural das amostras de expetoração/secreções brônquicas que contenham até vinte e cinco células epiteliais e vinte e cinco leucócitos (grupos 4 e 5 da classificação). De salientar que estes critérios não devem ser aplicados em doentes neutropénicos e na pesquisa de outros agentes específicos, tais como *Mycobacterium sp.*, *Legionella sp.*, *Mycoplasma sp.* e fungos<sup>96</sup>.

- Exame cultural: A sementeira destes produtos deve ser feita pela técnica de sementeira por quadrantes em meio GS ou, caso seja pedida a pesquisa de fungos, em meio SAB. A incubação de ambos os meios deverá ser feita a uma temperatura de 35°C, no entanto, o meio SAB em condições de aerobiose e o meio GS em atmosfera de aerobiose com CO<sub>2</sub><sup>91</sup>.
- Outros testes: *Xpert*<sup>®</sup> *MTB/RIF*.
- Interpretação clínica: A maior parte das infeções do trato respiratório inferior é causada por vírus, no entanto, também bactérias e fungos podem ser os responsáveis por este tipo de

infecções. Tendo em conta que a amostra poderá vir contaminada com a flora comensal, é importante saber que microrganismos se deve valorizar para posterior identificação e TSA.

A pneumonia é uma infecção dos tecidos pulmonares e alvéolos, que ficam cheios de secreções purulentas, impedindo a troca de O<sub>2</sub> por CO<sub>2</sub>. Quanto mais alvéolos acometidos, mais grave é o quadro da doença. A pneumonia é uma infecção causada principalmente por bactérias, mas também pode ser provocada por vírus ou fungos. Os agentes etiológicos mais comuns da pneumonia são as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus* e os vírus Parainfluenza, Coronavírus, Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Influenza e Adenovírus<sup>129</sup>.

Outra infecção frequente é a bronquiolite que é uma inflamação dos bronquíolos, contagiosa e que afeta, normalmente, crianças com menos de seis meses. A bronquiolite é causada por vírus, na maioria dos casos pelo VSR, mas também por Rinovírus, Influenza, Parainfluenza e Adenovírus<sup>129</sup>.

A bronquite aguda é uma inflamação generalizada da árvore brônquica e é quase sempre causada por vírus, que infetam a camada interna dos brônquios. Na maioria das vezes, as mesmas viroses que causam as infecções acima descritas, causam também a bronquite aguda. Porém, algumas bactérias também podem causar este tipo de infecção, como é o caso do *Mycoplasma pneumoniae*<sup>129</sup>.

A tuberculose é uma doença infetocontagiosa, normalmente causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e que afeta, principalmente, os pulmões, embora também possa afetar outras partes do corpo. A transmissão deste bacilo é feita diretamente de pessoa para pessoa, através de gotículas de saliva quando a pessoa fala, tosse ou espirra.

## 4.3. Bioquímica

Muitas das doenças humanas resultam de um metabolismo anormal ou de uma perturbação na atividade celular normal, pelo que poderão advir modificações características e significativas do perfil bioquímico dos fluidos corporais. A aplicação da análise bioquímica a diversas espécies químicas (íons inorgânicos/moléculas orgânicas), presentes nos fluidos biológicos, constitui o âmbito do setor de Bioquímica. Por outras palavras, o objetivo deste setor analítico é determinar a concentração de cada analito presente nos vários fluidos biológicos e estabelecer as suas alterações na doença, tendo em vista o diagnóstico, prognóstico, acompanhamento terapêutico e prevenção da doença.

### 4.3.1. Equipamentos

#### ***DxC 700 AU da BECKMAN COULTER***

O *DxC 700 AU* é o principal equipamento utilizado no setor de Bioquímica, para determinação de concentrações de analitos em amostras, através de métodos de colorimetria, aglutinação de látex, elétrodo seletivo de íões e ensaio imunoenzimático homogéneo. Por ser um equipamento destinado a um fluxo de trabalho médio, o *DxC 700 AU* permite que amostras não urgentes sejam processadas automaticamente no módulo do alimentador de *racks*, enquanto amostras prioritárias são processadas na mesa STAT. Este equipamento possui ainda um módulo designado de ISE para determinações de eletrólitos em amostras<sup>130</sup>.



Figura 30: *DxC 700 AU* da BECKMAN COULTER.  
Fonte: *DxC 700 AU* da BECKMAN COULTER -  
Instruções de utilização<sup>129</sup>.

#### ***UNICEL DxI da BECKMAN COULTER***

O sistema *UniCel DxI* é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa, semiquantitativa ou qualitativa de concentrações de analitos contidos em amostras de fluidos corporais. Para esse efeito, este sistema utiliza imunoenaios com deteção quimioluminescente e separação de partículas magnéticas<sup>131,132</sup>.



Figura 31: *UniCel DxI* da BECKMAN COULTER.  
Fonte: Healthcare business news, trends &  
developments<sup>131</sup>.

### **ACCESS 2 da BECKMAN COULTER**

O *Access 2* é um sistema de imunoenensaio automatizado para medição de analitos em amostras, em combinação com reagentes, calibradores e controlo da qualidade. O equipamento é capaz de efetuar análises de soro, plasma, urina e líquido amniótico através de imunoenensaio quimioluminescente mediado por enzimas<sup>133,134</sup>.



Figura 32: Equipamento *Access 2* da *BECKMAN COULTER*.  
Fonte: *Immunoassay Analyzer Access 2 Immunoassay System/Beckman Coulter*<sup>134</sup>.

### **VIDAS® da BIOMÉRIEUX**

O equipamento *VIDAS®* é um imunoanalisador multiparamétrico automatizado, capaz de processar trinta testes em simultâneo devido ao seu sistema individual de pipetagem e processamento. A metodologia de análise utilizada é *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) e a fluorescência obtida é medida num *scanner* ótico fluorimétrico e é proporcional à quantidade de analito na amostra<sup>135</sup>.



Figura 33: *VIDAS®* da *BIOMÉRIEUX*.

### **GEM® PREMIER™ 3000 da WERFEN**

O equipamento *GEM® Premier™ 3000* permite a medição de pH, gases, eletrólitos e metabolitos no sangue arterial ou venoso. Este equipamento, para além de um cartucho de reagentes e o eléctrodo de referência possui, ainda, sensores de pH, pressão de CO<sub>2</sub>, pressão de O<sub>2</sub>, sódio, potássio, cálcio, bicarbonato, glicose, lactato e hematócrito, que são constituídos por membranas quimicamente sensíveis. É através destes sensores que é medido o potencial eléctrico e quantificado cada analito presente na amostra<sup>136</sup>.



Figura 34: *GEM® Premier™ 3000* da *WERFEN*.  
Fonte: *GEM Premier 3000|Werfen em Portugal*<sup>136</sup>.

### 4.3.2. Análises Bioquímica

#### GLUCOSE

A glucose, obtida através do metabolismo dos hidratos de carbono, é a principal fonte de energia do organismo. O sistema nervoso, incluindo o cérebro, depende totalmente da glucose, presente no líquido extracelular circulante, pois não tem capacidade de concentrar ou armazenar glúcidos, pelo que é essencial manter os níveis de glucose dentro de limites estreitos de forma a permitir a sua distribuição tecidual<sup>137</sup>.

Os músculos e o fígado são os maiores reguladores da concentração de glucose, retirando-a de circulação. Contudo, o rim também desempenha uma função muito importante, tanto em situação de carência, como de abundância. A glucose não armazenada e não consumida vai para o rim, onde é filtrada, voltando à circulação quase na totalidade por reabsorção tubular, até atingir o limiar renal<sup>137</sup>.

- Amostra: Soro, urina (amostra aleatória) e LCR.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de glucose no soro, urina ou LCR é utilizado um ensaio enzimático espectrofotométrico, com base no método da hexoquinase<sup>138</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras ictericas e muito lipemicas. As amostras de LCR devem ser processadas o mais rapidamente possível de modo a evitar resultados falsamente baixos<sup>138</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As concentrações de glucose no sangue apresentam flutuações intra-individuais dependentes de vários fatores. Estas flutuações são ainda maiores quando há um descontrolo metabólico, tal como ocorre em vários estados patológicos nos quais a glucose no sangue pode ser elevada (hiperglicemia) ou reduzida (hipoglicemia).

Um estado de hipoglicemia conduz, normalmente, a uma disfunção do sistema nervoso central e, em casos mais extremos, pode levar a um estado de coma. A hipoglicemia está associada a diversas condições patológicas nas quais se incluem a síndrome de insuficiência respiratória no recém-nascido, toxemia da gravidez, defeitos congénitos enzimáticos, síndrome de Reye, ingestão de álcool, disfunção hepática, tumores pancreáticos produtores de insulina (insulinomas), doenças autoimunes com produção de anticorpos anti-insulina, septicemia e insuficiência renal crónica<sup>138</sup>.

Por sua vez, a hiperglicemia ocorre com mais frequência como resultado de uma insuficiência na quantidade ou eficácia da insulina, o que dá origem à diabetes *mellitus*. Esta

patologia é caracterizada pela subida da glucose no sangue até ultrapassar o limiar renal, o que leva a que sejam encontradas concentrações de glucose elevadas também na urina (glicosúria). Assim, a determinação da glucose no sangue é utilizada como ensaio de rastreio e monitorização da terapêutica em casos de diabetes *mellitus* ou na avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono, em casos de diabetes gestacional, hepatite aguda, pancreatite aguda e doença de Addison<sup>138</sup>.

Para além da determinação da glicemia em jejum, há ainda provas que facultam mais informação no despiste de algumas patologias, como é o caso da Prova de Tolerância Oral à Glucose (consultar subcapítulo 4.3.5. *Outros testes*).

## UREIA

A ureia é sintetizada no fígado como o produto final do metabolismo das proteínas e dos aminoácidos. A maior parte da ureia produzida é eliminada por filtração glomerular, sendo depois reabsorvida através do túbulo distal, processo controlado pela hormona antidiurética<sup>139</sup>.

As determinações de ureia e de creatinina no soro são frequentemente realizadas em conjunto para diagnóstico de patologias que afetam a função renal<sup>139</sup>.

- Amostra: Soro e urina (vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação quantitativa de ureia no soro e urina é feita por ensaio cinético com deteção espectrofotométrica<sup>139</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras altamente lipémicas, ictéricas ou com contaminação por amónia interferem com os resultados<sup>139</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Durante a diurese, existe uma reabsorção mínima de ureia para o sangue, ou seja, uma grande quantidade de ureia é eliminada na urina e a concentração de ureia no plasma é reduzida. Em oposição, durante a anti-diurese, nos casos de desidratação, a ureia difunde-se novamente nos túbulos e a sua concentração plasmática aumenta<sup>139</sup>.

A elevação do nível de ureia pode ocorrer devido a causas pré-renais, como é o caso de indivíduos com descompensação cardíaca, catabolismo proteico aumentado e hipovolemia. Essa elevação pode ser também devido a causas renais, nos casos de glomerulonefrite aguda ou crónica, rim poliquístico, necrose tubular e nefrosclerose ou ainda por causas pós-renais, provocadas por obstrução no trato urinário<sup>139</sup>.

## CREATININA

A creatinina é um produto metabólico da creatina e fosfocreatina que se encontram, maioritariamente, nos músculos, o que faz com que a produção de creatinina seja proporcional à massa muscular e varie pouco de dia para dia<sup>140</sup>.

- Amostra: Soro e urina (vinte e quatro horas).
- Metodologia: O ensaio espectrofotométrico de cor cinético usado para a determinação quantitativa de creatinina no soro e urina tem por base o método de Jaffé<sup>140</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras altamente lipémicas devem ser evitadas<sup>140</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As determinações de creatinina são usadas no diagnóstico e tratamento de doenças renais e também podem ser úteis na avaliação da função glomerular e na monitorização da diálise renal. Tanto a medição de creatinina no soro, como a medição de ureia, são utilizadas para distinguir se a azotemia é provocada por uma obstrução pré-renal ou pós-renal. Uma subida dos níveis de ureia no soro, sem aumento concomitante da creatinina sérica identifica a azotemia pré-renal. Em condições pós-renais, ou seja, quando existe obstrução do fluxo urinário provocada por nefrolitíase ou prostatismo, os níveis de creatinina e de ureia do plasma estarão ambos aumentados<sup>140</sup>.

Em oposição ao descrito anteriormente, indivíduos com uma massa muscular reduzida, amputados ou com idade avançada, apresentam níveis séricos de creatinina relativamente baixos<sup>140</sup>.

## SÓDIO, POTÁSSIO E CLORO

Os eletrólitos são substâncias químicas que têm como principais funções a manutenção da pressão osmótica dos fluidos corporais, a regulação da distribuição de água no organismo, a manutenção do pH fisiológico e a regulação das funções cardíaca e muscular. Para além disso, os eletrólitos também se encontram envolvidos em reações de oxidação-redução e participam como partes essenciais, ou como cofatores, nas reações enzimáticas<sup>141</sup>.

- Amostra: Soro ou urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação quantitativa das concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) no soro ou urina é feita no módulo ISE, que integra elétrodos de membrana específicos para cada tipo de iões que podem ser encontrados na amostra<sup>141</sup>.
- Limitações/interferências: A hemólise faz com que o potássio dos glóbulos vermelhos se espalhe no soro, dando resultados incorretamente elevados. Por outro lado, o nível elevado

de lipemia provoca pseudohiponatremia, ou seja, uma concentração falsamente baixa de sódio no soro, pelo que amostras deste tipo também devem ser evitadas. Para além disso, também determinados tipos de drogas e compostos organofílicos podem afetar as determinações dos níveis de eletrólitos<sup>141</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: O equilíbrio eletrolítico é, normalmente, regulado pelo hipotálamo, rins e hormonas como a hormona antidiurética (ADH), a aldosterona e a paratormona (PTH). Quando este equilíbrio não é mantido, ocorrem distúrbios hidroeletrólíticos, que podem representar risco de vida ou sequelas, dependendo da sua magnitude<sup>141</sup>.

No que diz respeito aos distúrbios do sódio, podemos ter um quadro de hiponatremia, caracterizado por concentrações de sódio inferiores aos limites de referência, ou hipernatremia, onde estão presentes concentrações plasmáticas de soro acima dos valores de referência. A hiponatremia é o distúrbio eletrolítico mais comum e pode ser causada por várias condições como desnutrição, hiperglicemia, retenção excessiva de água, hiperlipidemia, perdas renais ou gastrointestinais, entre outras. Normalmente, a hiponatremia é assintomática até que os níveis plasmáticos diminuam para níveis críticos, provocando sintomas, principalmente neurológicos. Por outro lado, a hipernatremia, pode ser causada por desidratação ou aporte excessivo de sódio, o que provoca um desvio de água do compartimento intracelular para o extracelular. Esta situação pode-se tornar particularmente grave quando envolve o sistema nervoso central, pois a hipertonicidade nos capilares sanguíneos frente à barreira hematoencefálica leva a um desvio de água do LCR, presente no interstício cerebral e nos neurónios, para o sistema vascular, provocando obstrução do mesmo e desidratação neuronal<sup>141</sup>.

O potássio é o principal eletrólito intracelular e a relação entre os seus níveis intra e extracelulares é decisivo para a formação do potencial elétrico da membrana. Por este motivo, qualquer alteração significativa na concentração extracelular de potássio pode provocar sérios efeitos, não só na função metabólica, mas também na condução nervosa, com repercussões na musculatura e, principalmente, no ritmo cardíaco. Assim, podem ocorrer os seguintes distúrbios: hipocaliemia e hiperkaliemia. A hipocaliemia é caracterizada por concentrações diminuídas de potássio em circulação e, normalmente, é assintomática. As principais causas deste distúrbio são o aporte reduzido deste ião ou o aumento da sua perda a nível gastrointestinal, renal ou através da sudorese. Por outro lado, a hipernatremia, caracterizada por concentrações plasmáticas aumentadas de potássio, é causada por aporte excessivo, redistribuição interna ou excreção inadequada<sup>141</sup>.

Por último, o cloro é uma substância que se encontra nos fluidos extracelulares do corpo, proveniente, maioritariamente, da ingestão de sal. As suas concentrações em circulação, do mesmo modo que os outros eletrólitos, podem estar reduzidas (hipocloremia) ou aumentadas (hipercloremia). A hipocloremia ocorre, geralmente, como consequência de perdas gastrointestinais ou sudorese e a hipercloremia por um excesso de consumo de sal ou por fatores metabólicos, endócrinos, gastrointestinais, lesões e medicamentos<sup>141</sup>.

## ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas. As purinas sofrem um processo de degradação em hipoxantina a qual, conseqüentemente, se transforma em xantina. Por sua vez, a xantina, por ação irreversível da enzima xantina oxidase, transforma-se em ácido úrico. A maior parte deste processo ocorre no fígado, e o ácido úrico é eliminado através dos rins, sendo a sua concentração no organismo determinada pelo equilíbrio entre a síntese e a eliminação<sup>142</sup>.

- Amostra: Soro e urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação quantitativa de ácido úrico na amostra é feita por ensaio de cor enzimático, com deteção espectralométrica (método de Trinder)<sup>142</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras de indivíduos em terapia com alguns fármacos ou que possuam macroglobulinemia de Waldenström, podem provocar resultados pouco fiáveis usando este método<sup>142</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As determinações de ácido úrico, tanto no soro, como na urina, são utilizadas no diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças renais e metabólicas, incluindo insuficiência renal, gota, leucemia, psoríase, inanição ou outros estados de desnutrição<sup>143</sup>.

A hiperuricemia é a presença de altas concentrações de ácido úrico no sangue, e pode ser classificada como primária (idiopática ou hereditária) e secundária, sendo que ambas implicam uma sobreprodução ou eliminação reduzida de ácido úrico. Em relação à hiperuricemia primária, normalmente, está associada a problemas como gota, síndrome de Lesch-Nyhan e síndrome de Kelley Seegmiller. Já a hiperuricemia secundária pode ser causada pela absorção acrescida de purina nutricional, aumentado a excreção de ácido úrico através da urina, e está associada a inúmeras condições patológicas, incluindo insuficiência renal, doenças mieloproliferativas, doenças hemolíticas, psoríase, policitemia vera, consumo excessivo de álcool, intoxicação por chumbo, dieta rica em purinas, jejum, quimioterapia, entre outros<sup>142</sup>.

Por outro lado, a hipouricemia, ou seja, a presença de baixas concentrações de ácido úrico no sangue, pode resultar da baixa produção de ácido úrico, tal como acontece na xantinúria hereditária, deficiência de nucleósido fosforilase de purina hereditária e terapia com alopurinol. A hipouricemia pode ser causada também pelo aumento da excreção de ácido úrico pelos rins, que pode ocorrer em doenças malignas, SIDA, síndrome de Fanconi, diabetes *mellitus*, queimaduras graves e síndrome hipereosinofílica. Para além do referido, a hipouricemia pode resultar do tratamento com agentes uricosúricos e ingestão de meios de contraste de raios X<sup>142</sup>.

Em relação à quantificação da excreção de ácido úrico urinário, esta é particularmente útil na seleção do tratamento apropriado da hiperuricemia, pois fornece indicação se os doentes devem ser tratados com fármacos uricosúricos para aumentar a excreção renal, ou alopurinol para suprimir a síntese da purina<sup>142</sup>.

## **ALBUMINA**

A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano e tem como funções biológicas o transporte e o armazenamento de proteínas, de forma a manter a pressão oncótica, e atuar como uma fonte de aminoácidos endógenos. A albumina liga e solubiliza compostos não-polares, nomeadamente, bilirrubina e ácidos gordos de cadeia longa, assim como, estabelece a ligação a inúmeros fármacos<sup>144</sup>.

A determinação das concentrações de albumina é útil no diagnóstico de algumas doenças, mas também, na compreensão e interpretação dos níveis de cálcio e magnésio no organismo. Estes iões encontram-se ligados à albumina e, por isso, as reduções dos níveis desta proteína são diretamente responsáveis pela diminuição das respetivas concentrações<sup>144</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de albumina no soro é feita por ensaio de cor espectralométrico<sup>144</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A hiperalbuminemia é a concentração elevada de albumina em circulação e é provocada por desidratação grave e estase venosa excessiva, no entanto, é rara. Por outro lado, a hipoalbuminemia, ou seja, baixa concentração de albumina no sangue, pode ser provocada por síntese inadequada, como nos casos de patologia do fígado ou em dietas com deficiência proteica. Pode ser provocada também por catabolismo acrescido, decorrente de lesões dos tecidos e inflamação, absorção reduzida de aminoácidos, causada por síndromes de

absorção deficiente ou má nutrição, perda de proteínas, como acontece no síndrome nefrótico, enteropatia ou queimaduras e distribuição alterada, nos casos de ascite. Os casos graves de hipoalbuminemia resultam numa séria instabilidade da pressão oncótica intravascular que, por sua vez, conduz ao desenvolvimento de edema<sup>144</sup>.

## **ALBUMINA DE BAIXA CONCENTRAÇÃO**

As alterações na função e estrutura renais ocorrem precocemente em indivíduos com diabetes sendo possível, atualmente, fazer-se o diagnóstico precoce da nefropatia diabética pela detecção da microalbuminúria. A microalbuminúria é, como o próprio nome indica, o surgimento de albumina na urina<sup>145</sup>.

- Amostra: LCR e urina (aleatória ou de vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação da concentração de albumina na urina ou LCR é feita através de método turbidimétrico<sup>145</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras com concentrações de albumina superiores a 2000 mg/dl podem levar a resultados falsamente baixos, devido ao excesso de antígeno na amostra. Por outro lado, amostras com características óticas anormais (turbidez) interferem com os resultados dos testes<sup>145</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: O aumento de albumina na urina é considerado um indicador clinicamente importante da deterioração da função renal em indivíduos diabéticos. Um rastreio regular da perda de albumina urinária é útil para monitorizar indivíduos com diabetes *mellitus* tipo I e tipo II. Além disso, um aumento na excreção de albumina urinária pode ser preditivo de doença renal crónica e identifica um grupo de indivíduos não diabéticos que apresenta um risco acrescido de doenças coronárias<sup>145</sup>.

Através da medição simultânea das concentrações de albumina no soro e no LCR é possível avaliar o grau de permeabilidade da barreira hematoencefálica, no entanto, as determinações de albumina no LCR também podem ser utilizadas para determinar a taxa de IgG/albumina no LCR, um fator importante na diferenciação entre síntese intratecal e síntese localizada de IgG<sup>145</sup>.

## PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas são das moléculas biológicas mais importantes pois, para além de participarem na maior parte dos processos que ocorrem na célula, são elementos estruturais de células e tecidos que sofrem variações na saúde e na doença e, por isso, são úteis no diagnóstico de algumas patologias<sup>146</sup>.

As proteínas totais são um parâmetro analítico, que avalia no seu conjunto, as proteínas no plasma ou noutros fluidos biológicos<sup>146</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de proteínas totais no soro é feita através de um ensaio de cor espectral<sup>147</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As medições de proteínas totais são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como, outras perturbações metabólicas e nutricionais<sup>147</sup>.

Um desvio ao intervalo de referência das proteínas totais séricas, indica a presença de disproteinemia ou uma perturbação do equilíbrio de água no organismo. Estas condições podem ser distinguidas através da análise adicional da eletroforese de proteínas (ver subcapítulo 4.4.5. *Análises Imunologia*) e da determinação do hematócrito<sup>147</sup>.

Concentrações elevadas de proteínas totais (hiperproteinemia) ocorrem em indivíduos com desidratação ou com um aumento de síntese de proteínas e, neste caso, é necessário averiguar se as proteínas produzidas são normais ou anormais<sup>146</sup>.

Por outro lado, a hipoproteinemia, ou seja, a presença de uma baixa concentração plasmática de proteínas, pode ser causada por uma síntese hepática diminuída, excreção aumentada devido a lesão renal, aumento da volemia, ou de origem fisiológica, como por exemplo, a gravidez<sup>146</sup>.

## MICROPROTEÍNAS

A determinação da quantidade de proteínas totais também pode ser feita usando outros fluidos biológicos que não o soro e torna-se importante para o diagnóstico de algumas patologias<sup>148</sup>.

- Amostra: Urina a tempo determinado (doze ou vinte e quatro horas) e LCR.
- Metodologia: A determinação quantitativa das proteínas totais na urina e LCR é feita por ensaio de cor espectral<sup>148</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras de urina contaminadas com hemoglobina ou de indivíduos que tenham sido tratados com substitutos de plasma resultarão num valor falsamente elevado. Por outro lado, a análise de amostras de urina que contenham cadeias leves de imunoglobulina pode dar origem a resultados diminuídos<sup>148</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: A determinação de proteínas totais na urina é importante para o diagnóstico e tratamento de doenças associadas ao funcionamento dos rins, coração e tireoide. Estas doenças são caracterizadas frequentemente por proteinúria, que pode resultar de uma permeabilidade glomerular acrescida (proteinúria glomerular), reabsorção tubular deficiente (proteinúria tubular), concentração acrescida de proteína de baixo peso molecular (proteinúria de sobrecarga) e por secreção anormal de proteína para o trato urinário (proteinúria pós-renal). A proteinúria pode surgir em patologias como gamopatias monoclonais, nefrite, nefropatia diabética e infecções do trato urinário ou ainda como consequência de exercício físico intenso<sup>148</sup>.

Por outro lado, a determinação das proteínas totais no LCR é importante na deteção da permeabilidade acrescida da barreira hematoencefálica às proteínas ou para detetar uma produção intratecal acrescida de imunoglobulinas. A elevação da sua permeabilidade pode advir de determinadas condições, tais como tumor cerebral, hemorragia intracerebral ou inflamação provocada por meningite bacteriana ou viral, encefalite ou poliomielite<sup>148</sup>.

## **BILIRRUBINA TOTAL**

A bilirrubina é um pigmento endógeno, produzido diariamente, sendo que a maior parte tem origem no *heme* da hemoglobina, libertada pela decomposição de eritrócitos senescentes, e o restante resulta da rutura de proteínas que contêm hemoglobina (mioglobina, citocromos, peroxidases) e de uma eritropoiese ineficaz<sup>149</sup>.

Diversas doenças afetam uma ou mais etapas envolvidas na produção, absorção, armazenamento, metabolismo e excreção de bilirrubina, por isso, é importante a determinação da quantidade deste pigmento em circulação<sup>149</sup>.

- Amostra: Soro.

- Condições de colheita: É importante que a conservação e transporte da amostra até ao seu processamento seja feito ao abrigo da luz solar.

- Metodologia: A determinação quantitativa de bilirrubina total no soro é feita por ensaio espectrofotométrico de cor<sup>149</sup>.

▪ Limitações/interferências: Amostras hemolisadas, lipémicas ou de indivíduos em terapia com paracetamol podem gerar falsos resultados<sup>149</sup>.

▪ Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

▪ Interpretação clínica: Dependendo da desordem, as bilirrubinas não conjugada (indireta) e/ou conjugada (direta), contribuem em grande parte para a hiperbilirrubinemia resultante. A hiperbilirrubinemia pode ser classificada da seguinte forma<sup>149</sup>:

1. Icterícia pré-hepática: As doenças de origem pré-hepática, com um predomínio de hiperbilirrubinemia não conjugada, incluem as anemias hemolíticas corpusculares, como por exemplo, talassemia e anemia falciforme; anemias hemolíticas extracorpúsculares, como por exemplo, reação a uma transfusão de sangue; icterícia neonatal e doença hemolítica do recém-nascido.
2. Icterícia hepática: As doenças de origem hepática, com predomínio de hiperbilirrubinemia conjugada, incluem hepatite viral, aguda e crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular.
3. Icterícia pós-hepática: As doenças de origem pós-hepática, com predomínio de hiperbilirrubinemia conjugada, abrangem a colestase extra-hepática, devido a cálculos biliares ou tumores, e rejeição do transplante de fígado.
4. Hiperbilirrubinemias congénitas crónicas: Este tipo de hiperbilirrubinemias podem ser provocadas pela à bilirrubina não conjugada, como a síndrome de Crigler-Najjar e síndrome de Gilbert, mas também pela bilirrubina conjugada, como a síndrome de Dubin-Johnson e síndrome de Rotor. A distinção entre hiperbilirrubinemias congénitas crónicas e as bilirrubinemias adquiridas é conseguida através da determinação das frações de bilirrubina, mas também pela deteção de atividades normais das enzimas do fígado.

## **BILIRRUBINA DIRETA**

Devido ao facto de possuir uma fraca solubilidade na água, a bilirrubina não conjugada (bilirrubina indireta) é transferida para o fígado ligada à albumina. Dentro dos hepatócitos, a bilirrubina indireta conjuga-se com o ácido glucurónico para dar origem à bilirrubina direta, que é excretada na bÍlis juntamente com todos os outros constituintes biliares<sup>150</sup>.

▪ Amostra: Soro.

▪ Metodologia: Para a determinação quantitativa de bilirrubina direta no soro é utilizado o mesmo ensaio fotométrico de cor para a determinação quantitativa da bilirrubina total. No

entanto, nesta reação não é necessário um catalisador pois a bilirrubina direta reage, diretamente, com o diazo-reagente<sup>150</sup>.

- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras hemolisadas ou lipêmicas de modo a não causar interferências no doseamento deste parâmetro<sup>150</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A avaliação da bilirrubina direta revela-se útil na determinação de icterícia hepática e pós-hepática. As hiperbilirrubinemias conjugadas congênitas crônicas incluem a síndrome de Dubin-Johnson e de Rotor<sup>150</sup>.

## **BILIRRUBINA INDIRETA**

A bilirrubina indireta encontra-se em circulação ligada à albumina e a sua quantidade é calculada através da fórmula: [Bilirrubina total] = [Bilirrubina direta] + [Bilirrubina indireta], sendo que as concentrações de bilirrubina total e bilirrubina direta são determinadas pelos métodos anteriormente descritos.

Como também já foi descrito, a determinação da bilirrubina não conjugada é importante no diagnóstico de icterícia pré-hepática.

## **FOSFATASE ALCALINA**

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que está presente em quase todos os tecidos do organismo, mais especificamente nas membranas celulares. A ALP encontra-se em maior concentração no epitélio intersticial, túbulos renais, ossos (osteoblastos), fígado e placenta e está associada ao transporte de lípidos ao longo do intestino e à calcificação dos ossos<sup>151</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de ALP é feita por ensaio de cor cinético, com detecção espectrofotométrica<sup>151</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras muito hemolisadas podem originar resultados que não correspondem à verdadeira concentração da enzima em circulação<sup>151</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Concentrações séricas elevadas de ALP podem resultar de causas fisiológicas ou de patologias do fígado ou dos ossos. Os aumentos fisiológicos de ALP são, normalmente, detetados a partir do segundo trimestre de gravidez, devido à elevação da ALP placentária, ou em crianças em fase de crescimento, devido à elevação da ALP óssea. Por outro

lado, esta elevação pode ser provocada por doença hepatobiliar ou por doenças primárias dos ossos, nomeadamente, osteomalacia, osteogénese imperfeita, intoxicação por vitamina D e tumores ósseos primários. Os níveis de ALP podem ainda estar aumentados em doenças secundárias dos ossos, como metástases esqueléticas ou em doenças como o mieloma múltiplo, acromegalia, insuficiência renal, hipertiroidismo, ossificação ectópica, sarcoidose e fraturas em processo de consolidação. Assim, nas doenças dos ossos, nomeadamente, na doença de Paget, raquitismo por deficiência em vitamina D e doença metastática dos ossos, a atividade da ALP constitui um bom indicador da atividade óssea, caso não esteja presente nenhuma doença crónica do fígado. A ALP pode também estar elevada em algumas doenças metabólicas dos ossos, tais como hiperparatiroidismo, osteopenia ou osteoporose<sup>151</sup>.

Em oposição, são observados valores reduzidos desta enzima em patologias como a hipofosfatase familiar, hipoparatiroidismo, doença óssea adinâmica em doentes a realizar hemodiálise, nanismo pituitário, doença crónica causada por radiação e má nutrição<sup>151</sup>.

## **GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE**

A gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) pertence a um grupo de peptidases que catalisam a transferência de aminoácidos de um péptido para outro. Para a atuação desta enzima é necessário que o péptido contenha um resíduo de glutamato, na região terminal, ligado ao resto do composto através do grupo carboxilo. A  $\gamma$ -GT existe em todas as células do organismo, à exceção das células do músculo, contudo, a enzima existente no soro advém, principalmente, do sistema hepatobiliar<sup>152</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de  $\gamma$ -GT é feita por ensaio de cor cinético, com deteção espectralométrica<sup>152</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A  $\gamma$ -GT aumenta acentuadamente em casos de obstrução biliar intra-hepática ou pós-hepática e é mais sensível que a fosfatase alcalina na deteção de icterícia obstrutiva, colangite e colecistite, sendo que a sua elevação ocorre mais cedo e perdura durante mais tempo<sup>152</sup>.

A  $\gamma$ -GT pode se encontrar elevada também em indivíduos com hepatite infecciosa, fígado gordo, pancreatite aguda e crónica e indivíduos medicados com fármacos anticonvulsivos, nomeadamente, fenitoína e fenobarbital. Como os níveis elevados de  $\gamma$ -GT são registados ainda em doentes com cirrose alcoólica e na maioria das amostras de indivíduos que

consumam grandes quantidades de álcool, a  $\gamma$ -GT desempenha um papel importante na detecção de casos de alcoolismo, lesões do fígado provocadas pelo álcool e na monitorização da abstinência desta droga<sup>152</sup>.

Esta enzima é também útil quando avaliada em conjunto com outros parâmetros, nomeadamente, com as lipoproteínas de alta densidade, em casos de alcoolismo, com a fosfatase alcalina, em casos de doença do fígado provocada pelo álcool ou com a aspartato aminotransferase para avaliar situações de hepatite do recém-nascido ou atresia biliar<sup>152</sup>.

## **ALANINA AMINOTRANSFERASE**

A alanina aminotransferase (ALT), também designada de glutamato piruvato transaminase (GPT), faz parte do grupo das aminotransferases ou transaminases. Este grupo de enzimas é responsável por catalisar a transformação reversível de  $\alpha$ -aminoácidos em cetoácidos pela transferência de grupos amina, em muitos tecidos do corpo humano. A atividade desta enzima é mais específica no fígado do que em qualquer outro tecido do organismo, o que significa que, se houver algum tipo de dano neste órgão, a concentração em circulação desta enzima aumenta. Assim, e visto que a ALT se encontra em maior abundância no citosol dos hepatócitos, o aumento da concentração plasmática de ALT é um bom indicador de detioração na integridade da membrana plasmática do hepatócito, provocando doença parenquimatosa do fígado<sup>153</sup>.

Em suma, as determinações da alanina aminotransferase no soro são utilizadas no diagnóstico de certas doenças hepáticas como, por exemplo, hepatites virais e cirrose, mas também de determinadas doenças cardíacas<sup>154</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de ALT é feita por ensaio espectrofotométrico cinético<sup>153</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras altamente lipémicas podem interferir positivamente com a absorvência medida durante a reação. Por outro lado, os doentes em tratamento com sulfassalazina deverão informar o laboratório que estão a realizar tratamento, pois os resultados podem ser falsamente baixos<sup>153</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Níveis elevados de ALT no soro podem ser detetados numa variedade de doenças do foro hepático, incluindo hepatite, cirrose e outras variantes da doença do fígado (por exemplo, colestase extra-hepática) antes do desenvolvimento de sintomas

clínicos evidentes, nomeadamente, icterícia, o que reflete a importância da determinação quantitativa desta enzima no soro. Podem ser também observados aumentos moderados dos níveis de ALT após a ingestão de álcool ou da administração de drogas/fármacos, entre as quais se incluem a penicilina, salicilatos e opiáceos. Valores extremamente elevados (cinquenta vezes superiores ao limite de referência), estão associados a diagnósticos de hepatite vírica aguda, perturbações de perfusão e necrose aguda do fígado devido à ingestão de toxinas, incluindo paracetamol e tetracloreto de carbono<sup>153</sup>.

## **ASPARTATO AMINOTRANSFERASE**

A aspartato aminotransferase (AST) ou glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), assim como a ALT, pertence ao grupo das aminotransferases. No entanto, ao contrário da ALT, a AST encontra-se numa vasta variedade de tecidos, entre os quais se incluem o fígado, músculo cardíaco, sistema músculo-esquelético, cérebro, rins, pulmões, pâncreas, eritrócitos e leucócitos. Esta enzima, embora presente em vários tecidos, encontra-se em maior quantidade no fígado e no sistema músculo-esquelético<sup>155</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de AST no soro é utilizado um ensaio espectrofotométrico cinético<sup>155</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras altamente lipémicas podem ultrapassar a absorvência da reação. Devem ser evitadas amostras hemolisadas, visto que a concentração de AST nos eritrócitos é aproximadamente quinze vezes superior à do soro normal, o que pode levar a resultados falsamente elevados<sup>155</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação das concentrações de AST em circulação encontra-se indicada no diagnóstico, diferenciação e monitorização de doença hepatobiliar, enfarte do miocárdio e lesão músculo-esquelética, mas também como parte de exames de rastreio clínico. Concentrações séricas elevadas de AST são encontradas em indivíduos com hepatite vírica, necrose hepática, cirrose, colestase extra-hepática, distrofia muscular progressiva, dermatomiosite, pancreatite aguda, doença hemolítica, gangrena, lesões por esmagamento muscular e embolia pulmonar<sup>155</sup>.

A avaliação da atividade de AST relativamente à atividade da ALT, feita através do coeficiente de Rittis (AST/ALT), constitui um bom indicador da gravidade e natureza de lesões no fígado. Assim, coeficientes inferiores a 1,0 indicam lesão média do fígado e estão

particularmente associados a doenças de natureza inflamatória (hepatites agudas). Quanto aos coeficientes superiores a 1,0, normalmente, indicam doença grave do fígado, envolvendo habitualmente necrose (hepatites crônicas)<sup>155</sup>.

Por outro lado, o aumento moderado de AST pode ocorrer após a ingestão de álcool ou da administração de drogas, entre as quais se inclui a penicilina, salicilatos ou opiáceos, pelo que é necessário o histórico clínico do indivíduo e outros exames médicos para que se possa fazer um diagnóstico correto<sup>155</sup>.

## COLINESTERASE

A colinesterase é uma enzima responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina, que é libertada nos terminais nervosos para mediar a transmissão dos impulsos nervosos durante a sinapse. A degradação da acetilcolina é fundamental para que ocorra um novo impulso nervoso, ou seja, sem essa degradação não ocorre a repolarização do nervo e, por conseguinte, o nervo não consegue submeter-se a novo processo de despolarização<sup>156</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de colinesterase é feita através de um ensaio de cor cinético, com deteção por espectrofotometria<sup>156</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Os valores de colinesterase sérica são úteis como indicador de intoxicação por inseticida, para diagnóstico de doentes com formas atípicas da enzima, ou como um teste de função hepática. A atividade da colinesterase é inibida por uma vasta gama de compostos, que quando absorvidos em quantidade suficiente podem anular a ativação da acetilcolinesterase presente nos tecidos nervosos, podendo levar a complicações e, em casos extremos à morte por intoxicação. No entanto, é possível, avaliar a atividade da colinesterase, através da sua determinação sérica, antes da ocorrência dos primeiros sintomas ou efeitos neuromusculares, o que facilitará no diagnóstico atempado de intoxicações<sup>156</sup>.

A medição da atividade da colinesterase sérica também pode ser usada como medida da capacidade de sintetização do fígado, pois esta estará diminuída em casos de hepatite aguda, cirrose avançada e carcinoma com metástases no fígado<sup>156</sup>.

Por outro lado, o aumento dos níveis de colinesterase pode ser observado na diabetes *mellitus*, cardiopatia coronária, hiperlipoproteinemia tipo IV, síndrome de Gilbert e em indivíduos com a variante de Cynthiana, uma variante familiar que resulta em níveis de colinesterase superiores ao normal<sup>156</sup>.

## ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ECA)

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) é uma glicoproteína que converte a angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor do sistema renina-angiotensina. A ECA também inativa a hormona bradicinina<sup>157</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação da atividade sérica da ECA é feita por ensaio enzimático cinético<sup>157</sup>.
- Limitações/interferências: Não é recomendada a utilização de amostras lipêmicas ou hemolisadas, pois pode interferir no ensaio. A toma de Captopril, um medicamento utilizado para o tratamento da hipertensão e alguns tipos de insuficiência cardíaca congestiva, inibe a atividade da ECA, pelo que deve ser tido em conta esse fator aquando da interpretação os resultados<sup>157</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700 da BECKMAN COULTER.*
- Interpretação clínica: Níveis elevados de atividade de ECA são encontrados no soro de indivíduos com sarcoidose ativa e, ocasionalmente, em recém-nascidos prematuros com síndrome de dificuldade respiratória. Esta elevação é também observada em adultos com tuberculose, doença de Gaucher, lepra e muitas outras condições patológicas que envolvem os pulmões e o fígado. Por isso, para fins de diagnóstico, os resultados obtidos devem sempre ser avaliados juntamente com a história clínica do indivíduo, exames e outras constatações clínicas<sup>157</sup>.

## AMILASE

As amilases são um grupo de enzimas que hidrolisa, de forma aleatória, ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  não terminais de polissacarídeos<sup>158</sup>, de forma a facilitar a sua digestão. No organismo, a amilase encontra-se presente em diversos órgãos e tecidos, no entanto, em concentrações mais elevadas no pâncreas, onde a enzima é sintetizada. A amilase pancreática é, posteriormente, secretada através do canal pancreático, no duodeno, onde participa da digestão intestinal dos hidratos de carbono. As glândulas salivares também segregam  $\alpha$ -amilase, que inicia a hidrólise do amido quando o alimento ainda se encontra na boca e no esófago<sup>159</sup>.

- Amostra: Soro e urina (aleatória ou a tempo determinado).
- Metodologia: A determinação quantitativa de  $\alpha$ -amilase no soro e urina é feita por ensaio de cor cinético, medido por espectrofotometria<sup>159</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700 da BECKMAN COULTER.*

▪ Interpretação clínica: As doenças que levam a um aumento da  $\alpha$ -amilase no soro incluem: pancreatite aguda, parotidite, alcoolismo, insuficiência renal e doenças como a hepatite vírica, SIDA, febre tifoide, sarcoidose e traumatismo no abdómen superior. Este aumento pode também verificar-se após um procedimento de colangiopancreatografia endoscópica retrógrada, pelo que não é aconselhável a utilização de resultados para diagnóstico se esta situação se verificar<sup>159</sup>.

Na pancreatite aguda, a amilase aumenta cinco a seis horas após o início dos sintomas e permanece elevada durante dois a cinco dias, no entanto, o aumento da atividade plasmática não reflete a gravidade da doença e vice-versa. Isto significa que uma ampla destruição do pâncreas pode não causar um aumento significativo da concentração plasmática da  $\alpha$ -amilase pancreática. Por outro lado, pode ser observada hipoamilasemia em indivíduos com fibrose quística avançada, doença hepática grave e pancreatectomia<sup>159</sup>.

A excreção desta enzima é feita nos rins, por filtração glomerular, no entanto, cerca de metade do que é excretado é reabsorvido pelos túbulos. Esta reabsorção é significativamente reduzida em casos de lesões tubulares transitórias, após queimaduras, ou na presença de cetoacidose diabética e pancreatite aguda, resultando num aumento da eliminação da  $\alpha$ -amilase e presença de proteinúria. A medição da  $\alpha$ -amilase na urina é ainda indicada na investigação de hiperamilasemia associada a macroamilasemia ou insuficiência renal<sup>159</sup>.

## **LIPASE**

A lipase é uma enzima produzida nas células acinares do pâncreas e é responsável pela hidrólise dos triglicéridos em glicerol e ácidos gordos. A medição de lipase em circulação é utilizada, exclusivamente, para a investigação de anomalias do pâncreas, nos casos de pancreatite<sup>160</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de lipase no soro é utilizado um ensaio de cor cinético<sup>160</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras lipémicas e ictéricas. Por outro lado, a libertação de lipoproteína lipase e de lipase hepática após a administração intravenosa ou subcutânea de heparina pode provocar um aumento da atividade da lipase medida, contudo, sem a presença de problemas pancreáticos. Também os indivíduos que tenham ingerido doses tóxicas de paracetamol, podem apresentar um resultado falsamente baixo para neste parâmetro.

A colheita imediatamente após ou durante a administração de Metamizol (Dipirona) poderá gerar resultados falsamente baixos de lipase<sup>160</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Normalmente, a lipase sérica pode ser elevada na pancreatite aguda ou em episódios agudos de pancreatite crônica e pancreatite obstrutiva. Contudo, é de salientar que a destruição grave das células acinares, nas últimas fases da pancreatite crônica, geralmente, resulta numa redução da quantidade desta enzima na circulação, o que faz com que a avaliação clínica deva ser feita com base em todos os exames médicos e não só baseada na determinação deste parâmetro<sup>160</sup>.

A hiperlipasemia, ou seja, a presença de altas concentrações de lipase no sangue, está presente na síndrome abdominal aguda do quadrante superior, mais concretamente na úlcera duodenal perfurante, divertículo duodenal, colecistite e oclusão intestinal. Também se verificam ligeiros aumentos desta enzima na cetoacidose diabética, hepatite viral, parotidite epidémica, febre tifoide e sarcoidose, ou seja, em patologias onde, normalmente, existe envolvimento pancreático. Os níveis de lipase também podem encontrar-se elevados em indivíduos com insuficiência renal, assim como, em indivíduos sujeitos a pancreatografia endoscópica retrógrada ou a tratamento com opiáceos<sup>160</sup>.

## **PROTEÍNA C REATIVA**

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda<sup>161</sup>, produzida pelo fígado, e a sua função fisiológica é ligar-se à fosfocolina, expressa na superfície de células lesionadas, para ativar o sistema complemento e fagócitos, funcionando como uma opsonina. Por se tratar de um marcador de inflamação bastante sensível, as suas determinações têm utilidade na avaliação clínica de estados de stress, traumatismo, infeções, intervenções cirúrgicas, disfunções inflamatórias, ou outras patologias associadas<sup>162</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa da proteína C reativa no soro é feita por ensaio imunoturbidimétrico<sup>161</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras com características óticas anormais, especialmente turvação, ou que contenham anticorpos heterofílicos, pois podem causar interferências no ensaio<sup>161</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

▪ Interpretação clínica: Com este método, a proteína C reativa pode ser medida até concentrações muito baixas, todavia, devido à sua não especificidade e à vasta variação interindividual, a interpretação dos resultados deve ser feita cuidadosamente, ou seja, comparando sempre os resultados obtidos com valores anteriores ou outros marcadores<sup>161</sup>.

Os níveis de proteína C reativa no soro podem encontrar-se bastante elevados após enfarte do miocárdio, lesão, infecção, inflamação, cirurgia ou proliferação neoplásica. O aumento ocorre num período de vinte e quatro a quarenta e oito horas e os níveis podem chegar a ser duas mil vezes o normal. Por outro lado, no sangue do cordão umbilical as concentrações de proteína C reativa são muito baixas, pelo que a medição dos níveis de proteína C reativa no sangue de recém-nascidos torna-se uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce de infecções<sup>161</sup>.

## **PROCALCITONINA**

A procalcitonina é a pró-hormona polipeptídica da calcitonina. A calcitonina é produzida pelas células C da glândula tiroideia em resposta ao estímulo hormonal, enquanto que a procalcitonina, apesar de ser, principalmente, sintetizada por estas células tiroideias, também pode ser produzida nos tecidos neuroendócrinos de outros órgãos, como os pulmões e os intestinos, em resposta a um estímulo pró-inflamatório de origem bacteriana<sup>163</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação de procalcitonina no soro é feita por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*, usando a técnica ELFA<sup>163</sup>.
- Limitações/interferências: Algumas amostras que contêm anticorpos dirigidos contra os componentes do reagente podem provocar interferências no teste<sup>163</sup>.
- Equipamento: VIDAS® da BIOMÉRIEUX.
- Interpretação clínica: Em função do quadro clínico do indivíduo, e tendo em conta que o intervalo de medição do teste é de 0,05 a 200 ng/ml, uma concentração de procalcitonina superior a 0,1 ng/ml pode significar a presença de uma infecção bacteriana, que necessita de tratamento. Em indivíduos que apresentem uma concentração de procalcitonina superior a 0,5 ng/ml, para além da presença de infecção de origem bacteriana, ainda apresentam elevado risco de desenvolver sépsis severa ou choque séptico. No entanto, é importante fazer a avaliação juntamente com o quadro clínico e outros exames pois, em indivíduos recém-nascidos, politraumatizados, queimados ou com choque cardiogénico, também ocorre um aumento da procalcitonina sem que ocorra qualquer agressão infecciosa<sup>163</sup>.

Por outro lado, a determinação da procalcitonina em circulação pode ainda auxiliar na monitorização do tratamento com antibióticos em doentes com infeções do trato respiratório inferior, como pneumonia, doença pulmonar obstrutiva crónica e bronquite aguda<sup>163</sup>.

## COLESTEROL TOTAL

O colesterol é um lípido, com elevado peso molecular, que pode ser produzido endogenamente ou entrar no organismo através da dieta. O colesterol é a molécula inicial de muitas vias metabólicas, sendo indispensável como componente das membranas celulares e lipoproteínas, como precursor dos ácidos biliares, na síntese das hormonas esteroides e vitamina D<sup>164</sup>.

O colesterol é transportado, principalmente, em duas classes de lipoproteínas, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais desempenham um papel oposto na patogénese das perturbações lipídicas<sup>165</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Para a determinação de colesterol total, o utente deverá realizar um jejum de dez a doze horas antes de realizar a colheita<sup>165</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de colesterol no soro é feita através de um ensaio de cor enzimático<sup>165</sup>.
- Limitações/interferências: Para a realização deste ensaio devem ser evitadas amostras ictéricas. Podem ainda ocorrer interferências em amostras de indivíduos com overdose de paracetamol e que estejam a ser tratados com N-acetilcisteína ou Metamizol (Dipirona)<sup>165</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As determinações de colesterol são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças ateroscleróticas das artérias coronárias, mas também no diagnóstico de doenças metabólicas que envolvem lípidos e lipoproteínas<sup>165</sup>.

Segundo o Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol devem ser tidos em conta os seguintes valores de referência no que toca a risco de doença cardiovascular:

Tabela 11: Intervalos de referência para os níveis de risco de doença cardiovascular.

Intervalos de referência	Níveis de risco
< 200 mg/dl	Desejável
200 – 239 mg/dl	Limite elevado
≥ 240 mg/dl	Alto

Fonte: *Cholesterol* - Instruções de utilização AU<sup>165</sup>.

Atualmente, existe ainda uma correlação de valores muito diminuídos de colesterol total com a incidência de cancro<sup>164</sup>. As concentrações totais de colesterol sérico dependem de muitos fatores, incluindo a idade, gênero, dieta, atividade física, doenças hepáticas e outras doenças metabólicas<sup>166</sup>, pelo que devem ser tidos em conta aquando a interpretação dos resultados obtidos.

## **LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE**

As lipoproteínas são proteínas responsáveis pelo transporte dos lípidos do local onde estas proteínas são sintetizadas (fígado ou intestino) até aos tecidos. São constituídas por lípidos não polares, (triglicéridos e colesterol esterificado) que formam o núcleo, permanecendo os lípidos mais polares (colesterol livre e fosfolípidos) à superfície, juntamente com uma ou mais proteínas, as apoproteínas. Todas as lipoproteínas são constituídas pelos mesmos lípidos básicos, variando na sua quantidade relativa e na origem dos triglicéridos, ou seja, as quilomicras são constituídas por triglicéridos exógenos, enquanto que todas as outras lipoproteínas são constituídas por triglicéridos endógenos. A sua constituição varia, também, no conteúdo em apoproteínas<sup>164</sup>.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) transportam cerca de 25% do colesterol total do soro e este colesterol está inversamente associado à incidência de doença coronária. No transporte reverso do colesterol, a absorção e transporte deste lípido do tecido periférico para o fígado atua como um fator protetor contra o desenvolvimento de placas arterioscleróticas, o que faz com que a determinação do colesterol presente nas HDL seja essencial para a interpretação das determinações do colesterol de cada indivíduo bem como, avaliar o fator de risco de doenças coronárias<sup>167</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Em relação ao jejum devem ser consideradas as mesmas condições que o descrito para a determinação de colesterol total.
- Metodologia: A determinação quantitativa do colesterol das HDL no soro é feita através de um ensaio de cor enzimático<sup>167</sup>.
- Limitações/interferências: Na quantificação do colesterol presente nas HDL é necessário ter em conta o valor dos triglicéridos, pois este ensaio só é realizável se o valor deste parâmetro for inferior a 1000 mg/dl. A colheita imediatamente após ou durante a administração de Metamizol (Dipirona), assim como, a presença de metabolitos de Paracetamol, poderá dar origem a resultados falsamente baixos para este parâmetro<sup>167</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Uma baixa quantidade de colesterol das HDL representa um fator de risco de doença coronária, independentemente da concentração de colesterol total. A medição do colesterol das HDL é utilizada no reconhecimento precoce do risco de aterosclerose, podendo também ser utilizada na monitorização de indivíduos em tratamento de dislipidemias<sup>167</sup>.

## **LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) transportam cerca de 70% do colesterol plasmático total e a única apoproteína presente é a B-100<sup>164</sup>. O colesterol presente nas LDL constitui a maior parte da molécula que, por sua vez, é formada através da ação da lipoproteína lipase nas lipoproteínas de densidade muito baixa<sup>168</sup>.

Vários estudos demonstraram que este colesterol desempenha um papel preponderante no desenvolvimento de cardiopatia coronária, devido às suas propriedades aterogénicas. A avaliação do colesterol das LDL permite o reconhecimento precoce do risco de desenvolvimento de aterosclerose e pode ser usada para monitorizar a resposta à terapia com fármacos redutores de lípidos<sup>168</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa do colesterol presente nas LDL é feita através de um ensaio de cor enzimático<sup>168</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras com uma quantidade de triglicéridos superior a 1000 mg/dl, de indivíduos com hiperlipoproteinemia do tipo III ou de indivíduos que estejam a receber tratamento com misturas de lípidos artificiais causam interferência no ensaio<sup>168</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: De todas as variáveis de lípidos e lipoproteínas, o colesterol que constitui as LDL é o que possui uma associação mais forte com a mortalidade por doenças coronárias, ou seja, uma combinação de níveis altos de colesterol das LDL e níveis de triglicéridos elevados, forma um quadro de elevado risco de desenvolvimento de doença coronária. Para além disso, níveis elevados de colesterol nas LDL estão associados ao risco acrescido de doenças cardiovasculares e hiperlipidemia familiar. Em oposição ao cenário anterior, reduzidos níveis de colesterol das LDL podem ser registados em situações de má absorção e má nutrição<sup>168</sup>.

## TRIGLICÉRIDOS

Os triglicéridos (TAG) são os ésteres do glicerol mais prevalentes na alimentação, constituindo cerca de 95% do armazenamento tecidual das gorduras, e são os ésteres predominantes no plasma. Os TAG são digeridos no duodeno e íleo proximal e, pela ação das lipases pancreáticas e intestinais, na presença de ácidos biliares, são hidrolisados a glicerol, monoglicéridos e ácidos gordos<sup>164</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Assim como a determinação do teor colesterol, também a determinação dos níveis séricos de triglicéridos tem de ser feita com um jejum de dez a doze horas.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de triglicéridos no soro é utilizado um ensaio enzimático de cor<sup>169</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras altamente ictéricas ou lipémicas<sup>169</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As determinações quantitativas de triglicéridos são utilizadas para o diagnóstico e tratamento de indivíduos com pancreatite aguda e crónica, diabetes *mellitus*, nefrose, obstrução biliar extra-hepática e outras doenças que envolvem o metabolismo dos lípidos ou desordens endócrinas. Esta determinação também pode ser utilizada, em conjunto com outros parâmetros, para avaliação dos fatores de risco para a arteriosclerose e doença coronária<sup>169</sup>.

## CREATINA QUINASE

A creatina quinase (CK) é um dímero composto por subunidades M (músculo) e/ou B (cérebro) que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB que, por sua vez, catalisam a fosforilação reversível da creatina por adenosina trifosfato (ATP)<sup>170</sup>.

Em indivíduos saudáveis, a atividade total de CK consiste sobretudo em CK-MM, enquanto que as outras isoenzimas apenas estão presentes em quantidades extremamente reduzidas ou não são detetáveis aquando a determinação<sup>170</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: É importante que, após a amostra de sangue coagular e passar pelo processo de centrifugação, o soro seja imediatamente removido, no sentido de minimizar a hemólise e a contaminação por adenilato quinase, presente nos glóbulos vermelhos.

- Metodologia: Para a determinação quantitativa de creatina quinase é usado um ensaio espectrofotométrico cinético<sup>170</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras hemolisadas causam interferências na reação<sup>170</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação quantitativa de CK é utilizada, sobretudo, no diagnóstico e tratamento de enfarte do miocárdio, revelando-se também o indicador mais sensível em caso de lesões musculares<sup>170</sup>.

A CK aumenta sempre que se verifique necrose ou regeneração muscular. Por conseguinte, esta enzima encontra-se elevada na maioria das miopatias, como é o caso da distrofia muscular de Duchenne, e em condições associadas à necrose muscular, nomeadamente, rabdomiólise. A CK total também pode aumentar em doenças do sistema nervoso central como, por exemplo, na Síndrome de Reyes, sendo que um aumento acentuado em circulação é, normalmente, indicador da gravidade da encefalopatia<sup>170</sup>.

Por outro lado, a determinação de CK total também pode ser utilizada para diagnóstico de enfarte do miocárdio, através da medição de amostras em série, obtidas aquando a admissão e quatro, oito e doze horas após a mesma. Estes quatro valores obtidos podem ser compilados numa reta de modo a avaliar se a concentração de CK aumenta ou diminui ao longo do tempo. Uma duplicação das concentrações de CK por hora, durante esse período, permite distinguir um enfarte agudo do miocárdio da ausência de enfarte<sup>170</sup>.

## **ISOENZIMA MB DA CREATINA QUINASE**

Como referido anteriormente, a enzima creatina quinase é um dímero composto por subunidades M (músculo) e/ou B (cérebro), que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB<sup>170</sup>.

A CK-BB predomina no cérebro, próstata, intestinos, pulmões, rins, bexiga, útero, fígado, tiroide e placenta. Por outro lado, a CK-MM encontra-se, predominantemente, no músculo esquelético e músculo cardíaco e a CK-MB está presente no miocárdio e também na musculatura esquelética, embora em menor quantidade<sup>171</sup>.

A variação da concentração de CK-MB em circulação torna-se, portanto, um bom indicador de presença ou ausência de enfarte do miocárdio, o que se torna ainda mais relevante quando analisada em conjunto com outros parâmetros significativos<sup>171</sup>.

- Amostra: Soro.

- Condições de colheita: Assim como para a determinação da quantidade de CK, é importante que, após a amostra de sangue coagular e passar pelo processo de centrifugação, o soro seja imediatamente removido, no sentido de minimizar a hemólise e a contaminação por adenilato quinase, presente nos glóbulos vermelhos<sup>171</sup>.

- Metodologia: O teste utilizado é um teste de imunoinibição enzimática da subunidade M para a determinação quantitativa da isoenzima CK-MB no soro<sup>171</sup>.

- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras lipémicas, hemolisadas e altamente ictéricas. Podem ainda surgir outros interferentes, como é o caso da existência de macro-CK (forma atípica) na amostra<sup>171</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700 da BECKMAN COULTER.*

- Interpretação clínica: A atividade da CK total pode aumentar também após danos no miocárdio, como referido anteriormente, com um aumento significativo nas frações CK-MM e CK-MB. Com isto, o aumento proporcional da fração CK-MB depende, então, da dimensão dos danos no miocárdio e do historial de incidências deste tipo no indivíduo<sup>170</sup>.

Para diagnóstico de enfarte do miocárdio podem ainda ser utilizadas as alterações da proporção de CK-MB e CK-MM na amostra, que atingirão o seu máximo cerca de uma hora e meia após o enfarte. Por ser um biomarcador de diagnóstico rápido, a CK-MB deve ser utilizada para um diagnóstico precoce de enfarte, no entanto, para a confirmação do mesmo, é recomendado que se utilize também um biomarcador que proporcione resultados numa fase posterior como, por exemplo, troponina cardíaca<sup>170</sup>.

Finalmente, quando a fração de CK-MB se encontra diminuída é provável que estejam presentes lesões músculo-esqueléticas. Por outro lado, quando esta fração se encontra muito aumentada, poderá indicar a presença de macro-CK<sup>171</sup>.

## **LACTATO DESIDROGENASE**

A lactato desidrogenase (LDH) é uma oxidoredutase que catalisa a oxidação reversível do L-lactato em piruvato. Esta enzima é formada por cinco isoenzimas (LDH-1 a LDH-5) e está presente no citoplasma de todas as células do organismo<sup>172</sup>.

Tendo em conta que a concentração de LDH nos tecidos é muito superior à existente no plasma, a ocorrência de danos numa pequena porção de tecido pode conduzir a um aumento significativo na atividade de LDH no soro, o que faz com que a determinação da sua concentração em circulação seja um bom indicador de lesões tecidulares<sup>172</sup>.

- Amostra: Soro.

- Condições de colheita: A amostra de soro deverá ser separada do coágulo o mais rapidamente possível.
- Metodologia: É utilizado um ensaio espectrofotométrico cinético para a determinação quantitativa de lactato desidrogenase na amostra de soro<sup>172</sup>.
- Limitações/interferências: Não devem ser utilizadas amostras altamente lipêmicas, pois podem causar interferência na leitura da absorvência. As amostras hemolisadas também não devem ser usadas para determinação de LDH, porque os eritrócitos contêm uma atividade desta enzima superior à encontrada no soro<sup>172</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Atividades de elevada especificidade da enzima são, normalmente, observadas no fígado, músculo cardíaco, sistema músculo-esquelético, rins e nos eritrócitos<sup>172</sup>.

O enfarte do miocárdio está associado a uma grande elevação da LDH total em circulação e só se encontram concentrações semelhantes em casos de miocardite, arritmias cardíacas ou substituição de prótese de válvula<sup>172</sup>.

Nas lesões do fígado podem ser observados aumentos da atividade de LDH, no entanto, não são tão relevantes como os aumentos na atividade das aminotransferases. As concentrações de LDH são, sobretudo, elevadas na hepatite tóxica acompanhada de icterícia, na hepatite vírica e mononucleose infecciosa. Por outro lado, a razão LDH/AST pode ser utilizada para diferenciar a icterícia pré-hepática, provocada por hemólise ou diseritropoiese, da icterícia hepática<sup>172</sup>.

Um nível elevado de LDH também pode ser observado na distrofia muscular de Duchenne, anos antes dos sintomas clínicos aparecerem, na atrofia muscular espinal de Aran-Duchenne e Kugelberg-Welander, dermatomiosite, polimiosite e como resultado de exercício físico intenso<sup>172</sup>.

Outras doenças que podem originar níveis elevados de LDH incluem enfarte renal, febre hemorrágica coreana, doença glomerular crônica, embolia/insuficiência pulmonar e anemias hemolíticas e megaloblásticas (a determinação de LDH representa um método fiável na quantificação da extensão da hemólise)<sup>172</sup>.

## **MIOGLOBINA**

A mioglobina é uma hemoproteína das células dos músculos estriados, esqueléticos e cardíaco. Esta hemoproteína liga-se reversivelmente ao oxigénio de modo a aumentar o

transporte nas mitocôndrias, desempenhando um papel importante no metabolismo celular aeróbico<sup>173</sup>. Quando as células do músculo cardíaco são danificadas, ocorre a ruptura das membranas celulares, o que faz com que proteínas como a mioglobina sejam libertadas no sistema vascular, tornando-a num marcador precoce de lesão do miocárdio<sup>173</sup>.

- Amostra: Plasma.
- Condições de colheita: A amostra de plasma deve ser obtida através do uso de heparina de lítio como anticoagulante<sup>173</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de mioglobina no plasma é feita por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich* com detecção por quimioluminescência<sup>173</sup>.
- Limitações/interferências: Os indivíduos que estão regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos que interferem com o ensaio<sup>173</sup>.
- Equipamento: *ACCESS 2* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A mioglobina é o marcador biológico mais precoce da necrose do miocárdio. Isto acontece porque o seu peso molecular é reduzido, o que possibilita uma difusão mais rápida no sangue quando comparada com enzimas como a CK ou a LDH. No entanto, valores elevados de mioglobina também podem ser encontrados em indivíduos com trauma extenso, intoxicação, insuficiência renal em fase terminal, miocardite, doenças infecciosas e miopatias, pelo que se torna útil a avaliação destes valores juntamente com o quadro clínico<sup>173</sup>.

Não sendo específica do músculo cardíaco, a mioglobina é um ótimo marcador negativo, pois permite rejeitar qualquer suspeita de enfarte agudo do miocárdio após dois testes consecutivos negativos<sup>173</sup>.

Devido à rápida eliminação pelos rins, o aumento repentino na concentração de mioglobina sérica em indivíduos com enfarte agudo do miocárdio é seguido por uma queda rápida, verificando-se valores dentro dos limites de referência passadas vinte e quatro horas do enfarte. Esta normalização permite uma rápida detecção das recorrências ou de uma difusão do enfarte<sup>173</sup>.

## **TROPONINA I DE ALTA SENSIBILIDADE**

As troponinas são proteínas que modulam a interação entre a actina e a miosina, mediada por cálcio, nas células musculares. A troponina I inibe a adenosina trifosfatase da actomiosina e pode ser encontrada em três isoformas: uma associada aos músculos esqueléticos de contração rápida, outra aos músculos esqueléticos de contração lenta e ainda outra ao músculo cardíaco.

A isoforma de troponina I presente no músculo cardíaco tem uma elevada especificidade para este tecido, o que a torna um marcador cardíaco de alta sensibilidade para lesões do miocárdio<sup>174</sup>.

- Amostra: Soro ou plasma.
- Condições de colheita: As amostras de plasma devem ser obtidas com uso ao anticoagulante heparina de lítio<sup>174</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de troponina I cardíaca em soro/plasma é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>174</sup>.
- Limitações/interferências: Os indivíduos que contactem regularmente com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos, que interferem com o imunoensaio. Amostras que contenham fator reumatoide, fosfatase alcalina endógena, fibrina e proteínas capazes de se ligarem à fosfatase alcalina usada no ensaio podem provocar interferências e originar resultados errados<sup>174</sup>.
- Equipamento: *ACCESS 2* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: No enfarte do miocárdio, os níveis de troponina I de alta sensibilidade aumentam nas horas seguintes ao aparecimento de sintomas cardíacos, atingindo um pico após doze a dezasseis horas, e podem permanecer elevados durante quatro a nove dias<sup>174</sup>.

Por outro lado, também outras patologias não isquémicas podem causar aumentos de troponina, como por exemplo, insuficiência cardíaca congestiva, hiper e hipotensão, arritmias, embolia pulmonar, septicemia, miocardite, exercício de alta intensidade, toxicidade medicamentosa, rabdomiólise com lesão cardíaca, entre outras. Contudo, estas patologias raramente demonstram o padrão clássico de subida e descida dos níveis séricos de troponina, característico do enfarte do miocárdio, o que torna importante a monitorização em série quando o quadro clínico não é evidente. Assim, a troponina I de alta sensibilidade deve ser medida após a admissão e, em seguida, seriada em intervalos regulares para demonstrar um aumento e/ou uma descida nos valores<sup>174</sup>.

## **NT-PROBNP**

O péptido natriurético do tipo B (BNP) é uma neuro-hormona produzida nos cardiomiócitos em resposta a um aumento do esforço da parede do miocárdio provocada pelo aumento do volume ou pressão. Quando ocorre um esforço deste tipo, o gene BNP é ativado, o que resulta na produção da molécula precursora proBNP que, por sua vez, libertará o fragmento

C terminal, também designado de BNP, e o fragmento N terminal, o NT-proBNP. Embora as concentrações séricas de BNP, ativo biologicamente, e de NT-proBNP, inativo, estejam correlacionadas, os níveis de NT-proBNP são superiores ao BNP devido a diferenças na semivida destes dois péptidos<sup>175</sup>.

A neuro-hormona BNP, juntamente com outras neuro-hormonas, tem como função a regulação da homeostase intravascular, através do antagonismo do sistema renina-angiotensina, provocando vasodilatação, o aumento da secreção de sódio renal (natriúria) e a diurese<sup>175</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: O doseamento de NT-proBNP no soro é feito por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*, aplicando a técnica ELFA<sup>175</sup>.
- Limitações/interferências: Em amostras que contenham anticorpos direcionados contra os componentes do reagente podem ser detetadas algumas interferências<sup>175</sup>.
- Equipamento: VIDAS® da BIOMÉRIEUX.
- Interpretação clínica: Níveis elevados de NT-proBNP estão associados a uma disfunção ventricular e à gravidade da insuficiência cardíaca. No entanto, um diagnóstico apoiado noutras evidências clínicas é importante, uma vez que os níveis de NT-proBNP também são elevados noutras condições que afetam a função ventricular, tais como, embolia pulmonar, hipertensão, valvulopatia, cardiomiopatia, arritmias, septicemia, anemia e AVC<sup>175</sup>.

Para além do valor diagnóstico, o NT-proBNP tem também um valor prognóstico numa variedade de contextos clínicos, incluindo dispneia aguda, insuficiência cardíaca crónica e doença coronária isquémica, principalmente, com níveis normais de troponina<sup>175</sup>.

## CÁLCIO TOTAL

O cálcio sérico total é composto por três frações: cálcio livre ou ionizado; cálcio ligado a proteínas (albumina e globulinas); e cálcio ligado a complexos (fosfatos, citrato e bicarbonatos)<sup>176</sup>.

As ações metabólicas do cálcio, a nível extracelular, são a mineralização óssea, a coagulação e a excitabilidade neuromuscular. Por outro lado, a nível intracelular, o cálcio está presente na ativação neuronal, contração muscular, secreção de hormonas, regulação da transcrição génica e da atividade metabólica e atua como segundo mensageiro para hormonas e fatores de crescimento<sup>177</sup>.

- Amostra: Soro e urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Condições de colheita: A centrifugação dos tubos e separação da amostra deverá ser feita o mais rapidamente possível de modo a evitar a absorção de cálcio pelos eritrócitos. Por

sua vez, a urina deve ser colhida a tempo determinado (vinte e quatro horas) e acidificada com ácido clorídrico (HCl) 6M<sup>176</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de cálcio total no soro ou urina é feita através de um ensaio fotométrico de cor<sup>176</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras de urina com um valor de pH inferior a 1,5 poderão originar resultados com uma tendência negativa<sup>176</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700 da BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação quantitativa de cálcio total é usada no diagnóstico e monitorização do tratamento da doença da paratiroide, bem como de diversas doenças ósseas, doença renal crónica, urolitíase e tetania (contrações musculares intermitentes ou espasmos)<sup>176</sup>.

A hipercalcemia, ou seja, uma concentração elevada de cálcio no sangue, está presente em patologias como a hipervitaminose D, hiperparatiroidismo, doença neoplásica, hipertiroidismo, doença de Addison ou terapia com diuréticos. A hipercalcemia pode resultar em sinais e sintomas como o aumento da contratilidade da musculatura lisa, litíase renal, calcificações em vários órgãos e tecidos, assim como, poliúria, cefaleias, polidipsia e irritabilidade<sup>177</sup>.

Por sua vez, uma redução das concentrações de cálcio em circulação (hipocalcemia), pode ter como etiologia o hipoparatiroidismo, deficiência em vitamina D ou magnésio, pancreatite aguda, transfusões massivas de sangue citratado e infeções graves. A hipocalcemia pode ainda ser fictícia devido a uma hipoalbuminemia. Os sinais mais evidentes em indivíduos com hipocalcemia são a tetania muscular e laringoespasma, assim como, o adormecimento das extremidades, alterações cardiovasculares (hipotensão) e comportamentais (irritabilidade). Em casos extremos podem também ser observadas crises convulsivas e aumento da excitabilidade neuromuscular<sup>177</sup>.

A determinação de cálcio na urina é utilizada no diagnóstico diferencial da hipercalcúria de absorção e da hipercalcúria causada por hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, doença de Paget ou da calciúria por perda renal de cálcio observada na acidose tubular renal<sup>178</sup>.

## **FÓSFORO**

Em circulação no organismo, a maioria do fosfato existe sob a forma inorgânica, ligado a proteínas e o restante em formas complexas e livres. As concentrações de fosfato no soro dependem da dieta e da variação na secreção de hormonas como, por exemplo, a PTH<sup>179</sup>.

Por outro lado, o fosfato intracelular ocorre, sobretudo, sob a forma de fosfato orgânico, mas também existe uma pequena fração sob a forma de fosfato inorgânico que, por se tratar de um substrato para fosforilação oxidativa, participa em reações relacionadas com a produção de energia metabólica. No que toca ao fosfato extracelular, este é maioritariamente fosfato inorgânico presente, por exemplo em minerais, e desempenha uma importante função na estrutura óssea<sup>179</sup>.

- Amostra: Soro e urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Condições de colheita: No caso da amostra de urina a tempo determinado, esta deverá ser acidificada com HCl 6M antes de ser analisada<sup>179</sup>.
- Metodologia: É usado um ensaio espectrofotométrico para a determinação quantitativa de fósforo inorgânico no soro e urina<sup>179</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras altamente hemolisadas de modo a que não haja interferências no decorrer do ensaio<sup>179</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A hipofosfatemia, ou seja, a presença de baixas concentrações de fosfato em circulação, é bastante comum em doentes hospitalizados, nomeadamente, nos doentes submetidos a intervenções cirúrgicas. A hipofosfatemia pode ser provocada por uma ingestão ou absorção reduzida de fosfato como, por exemplo, no caso de deficiência de vitamina D, ou ainda por má absorção, utilização de quelantes de fosfato orais e hiperparatiroidismo primário. Também pode ocorrer hipofosfatemia devido a uma excreção aumentada de fosfato, como em casos de hiperparatiroidismo secundário, transplante pós-renal e desnutrição ou pela sua redistribuição no organismo como, por exemplo, recuperação de cetoacidose diabética e alcalose respiratória<sup>179</sup>.

Em oposição, encontra-se a hiperfosfatemia, ou seja, a presença de concentrações elevadas de fosfato no soro, que pode ser provocada por um aumento da ingestão como, por exemplo, no caso de terapia intravenosa de fosfato. Assim como na hipofosfatemia, também a hiperfosfatemia pode resultar de uma excreção anómala, neste caso, uma excreção reduzida, em indivíduos com insuficiência renal aguda ou crónica, hipoparatiroidismo e intoxicação por vitamina D ou por uma redistribuição de fosfato que ocorre, normalmente, em casos de destruição celular neoplásica, rabdomiólise e insolação<sup>179</sup>.

## MAGNÉSIO

O magnésio é um ião que participa em diversas reações enzimáticas importantes no organismo, quer como parte integrante de metaloenzimas, quer como um ativador de algumas dessas reações, e desempenha um papel importante na glicólise, respiração celular e transporte de cálcio transmembranar. Este ião é regulado sobretudo pela velocidade da excreção renal a qual, juntamente com o cálcio, está sujeita aos efeitos da hormona da paratiroide. Assim, o aumento da reabsorção de cálcio conduz à inibição competitiva da absorção de magnésio<sup>180</sup>.

- Amostra: Soro e urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Condições de colheita: As amostras de urina devem ser acidificadas com HCl 6M<sup>180</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de magnésio no soro e urina é feita por ensaio de cor fotométrico<sup>180</sup>.
- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras hemolisadas, pois os eritrócitos possuem uma elevada concentração de magnésio, o que produzirá resultados falsamente elevados<sup>180</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As determinações quantitativas de magnésio são utilizadas no diagnóstico e tratamento da hipomagnesemia e hipermagnesemia, ou seja, a presença de concentrações baixas ou elevadas em circulação, respetivamente<sup>180</sup>.

A manifestação que melhor caracteriza a deficiência de magnésio é a diminuição da função neuromuscular, definida por sinais de hiperirritabilidade, tetania, convulsões e alterações eletrocardiográficas. Normalmente, a hipomagnesemia é observada em casos de diabetes, alcoolismo crónico, diurese forçada, hipertiroidismo, hipoparatiroidismo, hipocalcemia, má absorção e pancreatite aguda<sup>180</sup>.

Por outro lado, níveis elevados de magnésio no soro podem ser detetados em casos de insuficiência renal, desidratação, acidose diabética grave e doença de Addison<sup>180</sup>.

## AMÓNIA

A amónia é uma substância tóxica para o organismo, derivada do catabolismo dos aminoácidos e da ação das bactérias intestinais sobre as proteínas da dieta. Esta substância é convertida em ureia nos hepatócitos (fígado), o que faz com que se torne não tóxica. Em circunstâncias normais, a concentração de amónia em circulação é reduzida, no entanto, devido a alterações do seu metabolismo e, conseqüente, aumento em circulação, pode ter um efeito

tóxico no sistema nervoso central, sendo as perturbações neurológicas as manifestações clínicas mais frequentes<sup>181</sup>.

- Amostra: Plasma.
- Condições de colheita: O plasma deve ser obtido por colheita de sangue venoso em tubo com heparina de lítio como anticoagulante (não utilizar heparina de amónia). Idealmente, o tubo de colheita deve chegar ao laboratório totalmente cheio de sangue e mergulhado em gelo. A amostra deverá ser centrifugada a uma temperatura reduzida (frio) o mais depressa possível e, caso não seja necessário o seu processamento de imediato, o plasma deverá ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 4°C<sup>181</sup>.
- Metodologia: A determinação da amónia plasmática é feita por ensaio enzimático direto<sup>181</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras hemolisadas não devem ser utilizadas, uma vez que os eritrócitos contêm níveis de amónia superiores aos do plasma, o que poderá interferir com o resultado<sup>181</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Níveis elevados de amónia podem ser o resultado de erros congénitos do metabolismo ou secundários a outras condições<sup>181</sup>.

Os erros congénitos do metabolismo são a principal causa de amónia elevada em bebés e resultam, normalmente, de deficiências enzimáticas no ciclo da ureia. Por outro lado, doenças hereditárias que afetam o metabolismo dos aminoácidos dibásicos (lisina e ornitina) e que envolvam o metabolismo de ácidos orgânicos, também podem produzir níveis elevados de amónia em circulação<sup>181</sup>.

A amónia elevada pode ainda ser observada na insuficiência hepática grave, como a que pode ocorrer na síndrome de Reye, hepatite viral ou cirrose<sup>181</sup>.

## **FERRO**

O ferro é um elemento químico que participa numa variedade de processos essenciais no organismo, desde os mecanismos de oxidação celular, ao transporte e fornecimento de oxigénio para as células do organismo<sup>182</sup>.

O ferro é um dos elementos constituintes das cromoproteínas transportadoras do oxigénio, a hemoglobina e a mioglobina, assim como, de várias enzimas (citocromo oxidases e peroxidases). O ferro do organismo pode ainda ser encontrado em flavoproteínas e

metaloproteínas, bem como, armazenado na forma de ferritina ou a ser transportado ligado à transferrina<sup>182</sup>.

- Amostra: Soro.

- Condições de colheita: As amostras devem ser colhidas de manhã e o indivíduo deve estar em jejum, visto que os valores de ferro podem baixar ao longo do dia. Após a colheita, o soro deve ser separado rapidamente dos glóbulos vermelhos, de modo a minimizar a hemólise<sup>182</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de ferro no soro é feita através de um ensaio de cor fotométrico. De referir que a concentração de ferro medida no soro, com esta metodologia, é referente apenas ao ferro que se encontra ligado à transferrina, ou seja, não inclui as concentrações de ferro presentes na hemoglobina circulante<sup>182</sup>.

- Limitações/interferências: Devem ser evitadas amostras lipémicas e hemolisadas, pois podem produzir resultados incorretos<sup>182</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: A concentração de ferro no soro é baixa em grande parte dos indivíduos com anemia ferropénica, doenças inflamatórias agudas ou crónicas, hemorragia aguda ou recente, doença maligna, desnutrição ou nefrose. A concentração de ferro no soro diminui acentuadamente também em doentes que tenham iniciado um tratamento para a anemia como, por exemplo, tratamento de anemia megaloblástica com vitamina B12<sup>182</sup>.

Por outro lado, as concentrações de ferro são superiores às normais em doenças por sobrecarga de ferro, nomeadamente, hemocromatose ou intoxicação após administração de ferro por via oral ou parenteral. Os níveis de ferro também podem ser elevados em casos de hepatite e leucemia aguda, intoxicação por chumbo, talassemia ou em casos de mulheres que façam contraceção oral, pelo que para efeitos de diagnóstico, os resultados devem ser sempre avaliados em conjunto com o historial clínico do indivíduo, os restantes exames e outras informações relevantes para a interpretação do resultado<sup>182</sup>.

## **FERRITINA**

A ferritina é uma proteína esférica, de grandes dimensões, capaz de ligar de quatro mil a cinco mil átomos de ferro. Esta proteína é encontrada sobretudo no citoplasma das células do sistema reticuloendotelial, mas também em circulação no soro, pelo que se estabeleceu que a concentração sérica de ferritina é diretamente proporcional às reservas totais de ferro do

organismo. Por este motivo, os níveis de ferritina sérica começaram a ser usados como instrumento de diagnóstico para a avaliação dos níveis de ferro no organismo<sup>183</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis séricos de ferritina é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>183</sup>.
- Limitações/interferências: Nos ensaios que utilizam anticorpos, existe a possibilidade de interferência de anticorpos heterófilos contidos na amostra do indivíduo<sup>183</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: De um modo geral, as concentrações variam com a idade e o sexo, sendo que o resultado deve ser sempre interpretado tendo isso em consideração<sup>183</sup>.

A determinação das concentrações séricas é especialmente útil no diagnóstico de anemia ferropénica, onde se encontram valores baixos desta proteína, e no diagnóstico de hemocromatose e hemossiderose, onde os valores se encontram muito elevados. No entanto, níveis elevados de ferritina também são encontrados em indivíduos com uma inflamação crónica, doenças hepáticas, insuficiência renal crónica e com determinadas doenças neoplásicas<sup>183</sup>.

## **TRANSFERRINA**

A transferrina é a principal proteína transportadora de ferro no plasma. Esta proteína possui dois sítios de ligação para o ferro e é, em grande parte, sintetizada pelo fígado<sup>184</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de transferrina numa amostra é feita por ensaio imunoturbidimétrico<sup>184</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A medição dos níveis de transferrina é útil no diagnóstico diferencial da anemia, pois apresentar-se-ão elevados em amostras de indivíduos com anemia ferropénica<sup>184</sup>.

Na atransferrinemia congénita, os níveis de transferrina reduzidos são acompanhados pela sobrecarga de ferro, pois esta é uma anemia hipocrómica grave resistente à terapia de ferro. Concentrações reduzidas de transferrina também podem ser encontrados em condições associadas a uma acentuada perda de proteínas, tais como, síndrome nefrótica, estados de deficiência de proteínas e na doença hepática crónica. A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa e, por isso, diminui durante qualquer estado inflamatório ou de malignidade.

Por outro lado, níveis elevados de transferrina podem ser encontrados em mulheres grávidas ou que façam administração de estrogênio<sup>184</sup>.

A determinação de transferrina sérica também é utilizada em conjunto com a determinação de ferro para calcular a saturação de transferrina<sup>184</sup>.

## ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma vitamina essencial para o crescimento das células e a síntese de DNA. Esta vitamina está presente numa grande variedade de alimentos e é absorvida pelo intestino delgado sendo, posteriormente, armazenada no fígado<sup>185</sup>.

Uma deficiência em ácido fólico pode ser a causa de anemia megaloblástica e, em casos extremos, levar ao desenvolvimento de graves problemas neurológicos<sup>185</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de ácido fólico no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>185</sup>.
- Limitações/interferências: Existe a possibilidade de interferência com o ensaio se as amostras contiverem anticorpos heterófilos<sup>185</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A deficiência em ácido fólico, que se traduz em níveis baixos desta vitamina em circulação, pode ser causada por um consumo dietético insuficiente, má absorção ou utilização excessiva desta vitamina<sup>185</sup>.

O ácido fólico e a vitamina B12 são importantes na síntese da metionina, um dos aminoácidos essenciais. Uma deficiência de uma destas vitaminas provoca uma má absorção da outra vitamina por parte dos eritrócitos, levando ao aparecimento de anemia megaloblástica. Por outro lado, a deficiência de ácido fólico também pode ocorrer durante a gravidez ou em indivíduos com problemas de alcoolismo, hepatite ou outras doenças hepáticas<sup>185</sup>.

## VITAMINA B12

A vitamina B12, também designada de cobalamina, é uma coenzima que se obtém através da ingestão de produtos de origem animal e que está envolvida em duas funções metabólicas muito importantes para o crescimento celular e para a síntese do DNA: a síntese da metionina e a conversão de metilmalonil-CoA em succinil-CoA<sup>186</sup>.

Quando ingerida, a vitamina B12 liga-se ao fator intrínseco, presente no suco gástrico do estômago, que permite a sua absorção para a circulação no íleo. Uma vez em circulação, a vitamina B12 é armazenada no fígado de onde só sairá consoante as necessidades metabólicas do organismo. Assim como a deficiência em ácido fólico, também a carência desta vitamina pode provocar a anemia megaloblástica ou problemas neurológicos<sup>186</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de vitamina B12 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>186</sup>.
- Limitações/interferências: Os indivíduos que estão regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos que interferem com o imunoensaio<sup>186</sup>.
- Equipamento: UNICEL Dxi da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A anemia megaloblástica é causada, principalmente, pela menor capacidade de síntese do DNA, provocada por um défice de vitamina B12 ou ácido fólico, como já explicado anteriormente. No entanto, a deficiência de vitamina B12 pode ser provocada por muitas situações e necessita de ser esclarecida para que se possa proceder ao tratamento da anemia pelo método mais adequando. Assim, uma das causas mais frequentes deste défice é a alteração na secreção do fator intrínseco, que provoca uma absorção insuficiente de vitamina B12 por parte do íleo. Contudo, a carência de vitamina B12 pode ser causada também por gastrectomia, má absorção devido a cortes cirúrgicos ou por processos inflamatórios e infeções bacterianas no intestino delgado<sup>186</sup>.

Por outro lado, são encontradas concentrações elevadas de vitamina B12 durante a gravidez ou em indivíduos que tomem contraceptivos orais e complexos multivitamínicos ou que possuam patologias mieloproliferativas, como a leucemia mieloide crónica e a leucemia mielomonocítica<sup>186</sup>.

### 4.3.3. Fármacos

#### CARBAMAZEPINA

A carbamazepina é uma substância utilizada no tratamento de determinados tipos de convulsões (epilepsia). A epilepsia é uma perturbação que se caracteriza por duas ou mais crises convulsivas, que ocorrem quando as informações do cérebro para os músculos não se processam

devidamente através das vias nervosas do organismo. A carbamazepina ajuda a controlar o processamento dessas informações, mas também regula as funções dos nervos em doenças neurológicas, tais como, a nevralgia do trigêmeo, ou em certas situações psiquiátricas como, por exemplo, episódios de perturbações de humor bipolares. A utilização da carbamazepina está ainda indicada na síndrome da abstinência alcoólica, na neuropatia diabética dolorosa e na diabetes insípida central<sup>187</sup>.

A terapêutica com carbamazepina é acompanhada através da determinação da concentração deste fármaco em circulação, de modo a detetar quaisquer indícios de dosagem inadequada ou toxicidade<sup>188</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: A altura correta para a colheita de uma amostra após a última dose do fármaco é influenciada por fatores farmacocinéticos, como a posologia, o modo de administração, a terapêutica medicamentosa concomitante e variações biológicas que afetem a eliminação do fármaco. Se se pretender medir a concentração sérica mínima, a colheita deve ser feita imediatamente antes da toma da próxima dose<sup>189</sup>.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de carbamazepina no soro, é utilizada uma técnica de imunoensaio enzimático homogéneo, nomeadamente, *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique* (EMIT)<sup>189</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A monitorização das concentrações séricas de carbamazepina, combinada com uma avaliação clínica cautelosa, é a forma mais eficaz de melhorar o controlo das convulsões, reduzir o risco de toxicidade e minimizar a necessidade de mais medicação anticonvulsiva. No entanto, é necessário ter em conta que existem fatores que podem influenciar a relação entre as concentrações séricas de carbamazepina e a resposta clínica, como por exemplo, o tipo e a gravidade das convulsões, a idade, o estado geral de saúde e a utilização de outros fármacos. A concentração de carbamazepina no soro depende ainda da hora de administração da última dose, do modo de administração, da terapêutica medicamentosa concomitante, do estado da amostra, da hora de colheita e de variações individuais no que diz respeito à absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Estes parâmetros devem ser considerados durante a interpretação dos resultados, juntamente com o histórico médico do doente, estado clínico e outros dados relevantes<sup>189</sup>.

## FENITOÍNA

A fenitoína é um fármaco que pertence ao grupo dos anticonvulsivos e a monitorização das suas concentrações séricas, combinada com uma avaliação clínica cuidadosa, é a forma mais eficaz de melhorar o controlo das convulsões, reduzir o risco de toxicidade e minimizar a necessidade de ajustes na medicação anticonvulsiva<sup>190</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Assim como outros fármacos anticonvulsivos, a altura correta para a colheita de uma amostra, após a última dose do fármaco, é influenciada por fatores farmacocinéticos. Assim, a amostra deve ser colhida, preferencialmente, no espaço de duas a quatro horas após uma dose inicial intravenosa ou, se a finalidade for representar o nível mínimo em circulação, a colheita deve ser feita imediatamente antes da toma da próxima dose<sup>190</sup>.
- Metodologia: Para a análise quantitativa de fenitoína no soro é utilizado um ensaio EMIT<sup>190</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A fenitoína é segura e eficaz apenas num intervalo estreito de concentrações séricas e estas correlacionam-se melhor com a atividade farmacológica do que com a dosagem. Isto acontece devido às diferenças individuais no que toca à absorção, metabolismo, estado da doença, medicação concomitante e adesão ao tratamento, pelo que a monitorização da concentração sérica ajuda o clínico a ajustar a posologia<sup>190</sup>.

Por outro lado, o sistema enzimático hepático, responsável pela metabolização da fenitoína, pode ficar saturado, mesmo dentro do intervalo terapêutico do fármaco. Quando isto acontece, pequenas alterações na dosagem podem causar uma acumulação de fármaco e, conseqüentemente, toxicidade clínica<sup>190</sup>.

## ÁCIDO VALPROICO

O ácido valproico é um fármaco anticonvulsivo<sup>191</sup>, que está indicado para o tratamento de convulsões de ausência, outras convulsões generalizadas e convulsões parciais. A monitorização das concentrações séricas de ácido valproico é útil para avaliar a adesão do doente ao tratamento ou para explicar alterações no controlo das convulsões ou na toxicidade do fármaco, visto que é difícil obter e manter concentrações terapêuticas de ácido valproico no soro, dada a acentuada variabilidade farmacocinética inter e intraindividuais. A farmacocinética

pode sofrer alterações devido a idade, gravidez, insuficiência renal, disfunção hepática, outros fármacos, níveis baixos de albumina, entre outros fatores<sup>192</sup>.

O ácido valproico apresenta também parâmetros farmacocinéticos que o tornam suscetível a interações medicamentosas com outros fármacos coadministrados, incluindo outros antiepiléticos, o que pode provocar a inibição das enzimas metabolizantes do fármaco no fígado. Quando estes fármacos são adicionados ou eliminados do plano terapêutico de um doente, a *clearance* e a concentração do ácido valproico podem sofrer alterações, exigindo um ajuste posológico<sup>192</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Para a obtenção de uma concentração sérica de ácido valproico que melhor represente o nível tecidual máximo, deve ser feita uma colheita entre uma a três horas após a administração de uma dose oral. No entanto, deve-se ter em conta que a altura correta para a colheita de uma amostra após a última dose do fármaco é influenciada por fatores farmacocinéticos. A colheita de uma amostra que represente o nível mínimo deve ser feita imediatamente antes da toma da próxima dose<sup>192</sup>.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa de ácido valproico (livre e ligado a proteínas) no soro, é utilizada a técnica EMIT<sup>192</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: O aumento da fração livre do fármaco, ou seja, da fração biologicamente ativa, causado pela saturação dos locais de ligação às proteínas ou por estados de doença que alteram essa ligação, pode influenciar a relação entre a concentração sérica do ácido valproico e a resposta clínica. Mesmo que a concentração total do fármaco se situe dentro do intervalo terapêutico, o doente pode exibir sintomas de toxicidade. Normalmente, as reações adversas associadas a concentrações elevadas de ácido valproico são a depressão do sistema nervoso central, tremores, trombocitopenia e aumento dos parâmetros dos testes de função hepática. As concentrações muito elevadas de ácido valproico também aumentam o risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade fatal, estupor, coma ou edema cerebral<sup>192</sup>.

A concentração de ácido valproico no soro depende da hora de administração da última dose, da hora de colheita da amostra, dos estados de doença que afetam a *clearance* do fármaco, da idade, da terapêutica medicamentosa concomitante e de variações individuais no que diz respeito à absorção, distribuição e eliminação, como já referido anteriormente. Portanto, estes parâmetros devem ser considerados durante a interpretação dos resultados<sup>192</sup>.

## LÍTIO

O lítio é uma substância normalmente usada na clínica para tratamento de psicoses maníaco-depressivas, pois atua de forma a melhorar a absorção dos neurotransmissores, o que produz um efeito sedativo no sistema nervoso central. Administrada sob a forma de carbonato de lítio, esta substância é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal e os seus níveis no soro atingem o pico passadas duas a quatro horas da toma de uma dose oral. A sua semivida no organismo é de quarenta e oito a setenta e duas horas e é eliminado pelos rins num processo de excreção semelhante à do sódio<sup>193</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Como referido, o pico de concentração desta substância no organismo é atingido duas a quatro horas após a administração da substância pelo que, se a finalidade for avaliar os níveis máximos de substância em circulação, é aconselhada a colheita nesse intervalo<sup>193</sup>.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa das concentrações de lítio no soro é utilizado um método espectrofotométrico<sup>193</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação das concentrações de lítio no soro é realizada, essencialmente, para garantir a efetividade da terapêutica e evitar a toxicidade no organismo. Normalmente, os sintomas iniciais de intoxicação incluem apatia, sonolência, letargia, dificuldades no discurso, tremores irregulares, espasmos, fraqueza muscular e ataxia, no entanto, aparecem tardiamente. Em oposição à sintomatologia, os níveis séricos elevados numa amostra colhida após doze horas da administração de uma dose deste fármaco são marcadores precoces de risco de intoxicação. Nesta avaliação é importante ter em conta também que uma função renal insuficiente pode prolongar o tempo de eliminação do fármaco<sup>193</sup>.

## TEOFILINA

A teofilina é um fármaco antiasmático usado no tratamento da asma crónica e de doenças broncoespásmicas<sup>194</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: A altura correta para a colheita deve ter em conta os fatores farmacocinéticos que a influenciam, nomeadamente, a posologia, o modo de administração, a terapêutica medicamentosa concomitante e variações biológicas que afetem a eliminação do fármaco<sup>194</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de teofilina no soro é feita usando um ensaio EMIT<sup>194</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: O tratamento crônico da asma e de outras doenças broncopásmicas requer um ajuste da dosagem de teofilina a cada indivíduo. Por vezes, alterações da terapêutica medicamentosa concomitante ou variações na eliminação do fármaco podem provocar uma alteração no intervalo terapêutico do fármaco e levar ao surgimento de efeitos secundários, sintomas não controlados ou alterações da *clearance* do fármaco. No entanto, os efeitos tóxicos nem sempre são precedidos por sintomas, o que torna a monitorização da teofilina sérica importante em indivíduos em tratamento com este fármaco<sup>194</sup>.

De salientar ainda que, para um tratamento eficaz, alguns indivíduos necessitam de níveis séricos situados fora do intervalo de referência, pelo que os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros sinais e sintomas clínicos<sup>194</sup>.

## CICLOSPORINA

A ciclosporina é um peptídeo cíclico hidrofóbico, de origem fúngica, que possui propriedades imunossupressoras. Apesar do seu mecanismo de ação ainda estar a ser investigado, a ciclosporina parece influenciar o metabolismo dos linfócitos T, resultando no enfraquecimento do sistema imunitário<sup>195</sup>.

As propriedades imunossupressoras da ciclosporina tornam-na um fármaco muito eficaz para tratamento de certas doenças autoimunes e na redução da incidência de rejeição dos tecidos após o transplante de órgãos. A terapêutica com ciclosporina tem uma segurança e eficácia máximas num intervalo de concentrações reduzido, podendo originar vários efeitos adversos se a concentração deste fármaco no organismo não for monitorizada<sup>195</sup>.

- Amostra: Sangue total.

- Condições de colheita: A colheita de sangue venoso deve ser feita para um tubo de colheita contendo EDTA como anticoagulante. As amostras devem ser ainda identificadas com a hora da colheita e a hora de administração da última dose do fármaco<sup>195</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis séricos de ciclosporina é feita por imunoensaio enzimático homogéneo<sup>195</sup>.

- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: Não existe um intervalo terapêutico fixo para a ciclosporina no sangue total, pois fatores como a complexidade do estado clínico, as diferenças individuais na

sensibilidade aos efeitos imunossupressores e nefrotóxicos do fármaco, a administração simultânea de outros imunossupressores (carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, eritromicina, rifampicina, cimetidina, cetoconazol), o tipo de transplante, o tempo após o transplante, entre outros, dão origem a diferentes necessidades para a obtenção de níveis sanguíneos ótimos de ciclosporina<sup>195</sup>.

Os efeitos adversos mais críticos devido a dosagem inadequada consistem na rejeição de órgãos, se a dosagem for menor, ou nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, cuja probabilidade aumenta, proporcionalmente, à concentração do fármaco. Uma vez que a absorção e o metabolismo hepático do fármaco variam muito de doente para doente, é necessário um ajuste, caso a caso, da medicação, de modo a que não haja risco de toxicidade. Por outro lado, a medição das concentrações de ciclosporina no sangue total, associada a outros dados laboratoriais e à avaliação clínica, constitui a melhor abordagem para maximizar a imunossupressão e minimizar os efeitos secundários nos recetores de transplantes de órgãos<sup>195</sup>.

## **DIGOXINA**

A digoxina é um fármaco glicosídeo, frequentemente prescrito para o tratamento de doentes com insuficiência cardíaca congestiva, bem como, alguns tipos de arritmias cardíacas. Os glicosídeos cardíacos possuem uma baixa relação terapêutica, ou seja, existe uma diferença muito reduzida entre a dosagem terapêutica e níveis tóxicos para os tecidos, pelo que é fundamental a monitorização dos seus níveis em circulação<sup>196</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de digoxina no soro é feita por ensaio imunoturbidimétrico<sup>196</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras altamente lipémicas devem ser evitadas. Existe ainda a possibilidade de interferência pela presença de anticorpos anti-rato na amostra<sup>196</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A intoxicação por digoxina é um problema comum, no entanto, bastante grave em termos clínicos, que resulta de uma combinação de múltiplos fatores intra e interindividuais. Por outras palavras, existe uma variabilidade assinalável de respostas à mesma dose do fármaco por parte de cada indivíduo, o que resulta, frequentemente, em níveis imprevisíveis de fármaco em circulação<sup>196</sup>.

Um dos problemas que surge frequentemente, é o facto de a sintomatologia de intoxicação, por defeito ou excesso de dosagem, ser impercetível das condições iniciais para as

quais o fármaco foi prescrito. Assim, a monitorização dos níveis de digoxina no soro, combinada com outros dados clínicos, constituem valiosas informações para o clínico, no sentido de ajustar a dosagem, de modo a conseguir um ótimo resultado terapêutico e, em simultâneo, evitar níveis de dosagem tóxicos<sup>196</sup>.

## ACETAMINOFENO

O acetaminofeno é um fármaco geralmente utilizado como analgésico e antipirético<sup>197</sup>.

Quando consumido em doses excessivas, o acetaminofeno pode ter efeitos tóxicos a nível hepático e renal.<sup>197</sup> Para além disso, este fármaco pode também causar necrose tubular aguda, pancreatite e necrose miocárdica<sup>198</sup>. Em todos estes casos, o indivíduo apresenta poucos ou mesmo nenhuns sintomas logo após a superdosagem. A evidência clínica de danos hepáticos e renais ocorre, normalmente, passadas mais de vinte e quatro horas da ingestão deste fármaco, o que faz com que o tratamento profilático (acetilcisteína) já não seja eficaz. Posto isto, o único indicador confiável de diagnóstico precoce é fornecido pela medição quantitativa do nível sérico de acetaminofeno<sup>197</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: A amostra deverá ser colhida, pelo menos quatro horas após a ingestão do fármaco, de forma a garantir que as concentrações séricas atinjam o pico. A ingestão de grandes quantidades de acetaminofeno pode resultar em níveis séricos com atraso do pico, pelo que, nesses casos, devem ser obtidas várias amostras. Por outro lado, e se o tempo decorrido desde a ingestão não for conhecido, a semivida do acetaminofeno poderá ser estimada através da colheita de duas ou mais amostras de sangue em intervalos de duas a três horas<sup>197</sup>.
- Metodologia: Para a análise quantitativa de acetaminofeno no soro é utilizada a técnica de EMIT<sup>197</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A concentração de acetaminofeno no soro depende do tempo decorrido desde a ingestão do fármaco, da terapêutica medicamentosa concomitante, da condição da amostra, do tempo decorrido desde a colheita da amostra, bem como, de variações individuais na absorção, distribuição, biotransformação e excreção do fármaco, pelo que estes parâmetros devem ser considerados aquando da interpretação dos resultados. Numa superdosagem de acetaminofeno, uma única determinação do nível sérico, fornece uma boa indicação da necessidade da aplicação da terapêutica profilática. De notar que, no caso de

alcoólicos, pessoas em terapia anticonvulsivante de longo prazo ou que façam uso de isoniazida, os efeitos tóxicos de acetaminofeno ocorrem a doses menores<sup>197</sup>.

A semivida do acetaminofeno também pode ser utilizada para avaliar a possível hepatotoxicidade e pode ser estimada sem conhecer o tempo decorrido desde a ingestão do fármaco. Se a semivida exceder as quatro horas, é possível ocorrer necrose hepática, no entanto, se a semivida exceder as doze horas, a severidade dos efeitos tóxicos é maior, o que poderá levar a coma hepático<sup>197</sup>.

## **GENTAMICINA**

A gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos que é, frequentemente, administrado por via intravenosa<sup>199</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: Assim como noutros fármacos já descritos anteriormente, a altura correta para a colheita de uma amostra, após a última dose do fármaco, é influenciada por fatores farmacocinéticos, pelo que se se pretende uma amostra representativa dos níveis mínimos de fármaco em circulação, a colheita deverá ser feita imediatamente antes da administração da próxima dose<sup>200</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de gentamicina no soro é feita usando um ensaio EMIT<sup>200</sup>.
- Limitações/interferências: Neste ensaio não é possível quantificar de forma fiável amostras que contenham gentamicina em combinação com netilmicina ou sisomicina. Concentrações elevadas de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como, por exemplo, penicilinas e cefalosporinas, inativam a gentamicina *in vivo* e *in vitro*, pelo que as amostras terão de ser analisadas imediatamente após a receção ou então congeladas, para prevenir a inativação da gentamicina *in vitro* e uma consequente quantificação reduzida<sup>200</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A concentração sérica de gentamicina correlaciona-se melhor com a atividade antibacteriana do que a dosagem, ou seja, uma dose padrão deste fármaco nem sempre produz um nível sérico previsível. Isto deve-se ao facto de a concentração do fármaco depender de vários fatores como a hora de administração da última dose, o modo de administração, a terapêutica medicamentosa concomitante, o estado da amostra, a hora de colheita e de variações individuais no que diz respeito à absorção, distribuição, biotransformação e excreção da gentamicina<sup>200</sup>.

Por outro lado, a gentamicina tem um intervalo estreito de concentrações séricas seguras e eficazes, pelo que a exposição a concentrações elevadas durante um período prolongado pode provocar insuficiência renal ou ototoxicidade. Por poder ser difícil distinguir a nefrotoxicidade causada pela gentamicina dos sintomas de uma doença renal subjacente, os doentes com compromisso da função renal devem ser monitorizados enquanto se mantiverem sob terapêutica com este fármaco. Além disso, os doentes com compromisso da função renal eliminam a gentamicina mais lentamente do que os doentes com uma função renal normal<sup>200</sup>.

Por todos estes motivos, a monitorização das concentrações séricas de gentamicina, combinada com uma avaliação clínica cuidadosa, é a forma mais eficiente de garantir uma terapêutica adequada sem risco de toxicidade<sup>200</sup>.

## **VANCOMICINA**

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico utilizado no tratamento de infeções. Cada doente exhibe um elevado grau de variabilidade em resposta a uma determinada dose de vancomicina, pelo que a sua monitorização plasmática pode ajudar a evitar toxicidade<sup>201</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: A hora correta para a colheita da amostra, após a última administração do fármaco, é influenciada por fatores farmacocinéticos, no entanto, para obter uma concentração de vancomicina que melhor represente o nível tecidual máximo, a amostra deverá ser colhida entre trinta minutos e duas horas após a administração (vancomicina – pico). No entanto, se o clínico pretender avaliar a concentração mínima de vancomicina no organismo (vancomicina – vale), esta deverá ser colhida imediatamente antes da próxima administração deste fármaco<sup>201</sup>.
- Metodologia: A análise quantitativa da vancomicina é feita através de um ensaio EMIT<sup>201</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A concentração de vancomicina no soro depende da hora e do modo de administração da última dose, da terapêutica medicamentosa concomitante, do estado e da hora de colheita da amostra e de variações individuais no que respeita à absorção, distribuição, biotransformação e excreção, pelo que estes parâmetros devem ser considerados durante a interpretação dos resultados<sup>201</sup>.

O risco de ototoxicidade e nefrotoxicidade da vancomicina é acrescido em indivíduos com compromisso da função renal e que estejam a receber terapêutica concomitante com

aminoglicosídeos. Juntamente aos indivíduos com as patologias descritas anteriormente, também os indivíduos com compromisso da função hepática, em diálise, com obesidade mórbida, crianças e idosos devem ser monitorizados frequentemente enquanto estiverem sob terapêutica com vancomicina<sup>201</sup>.

#### 4.3.4. Toxicologia

##### ÁLCOOL ETÍLICO

O teste de alcoolemia é, normalmente, utilizado em casos médico-legais relacionados com o consumo ou abuso de substâncias tóxicas. O álcool etílico (etanol) pode ser letal ou contribuir para a ocorrência de diversos tipos de acidentes<sup>202</sup>, pelo que a medição dos níveis de álcool é utilizada para determinar incapacidade legal, para fins forenses, no diagnóstico e tratamento de dependência e em cenários de emergência para detetar envenenamento por esta substância<sup>203</sup>.

O álcool ingerido é absorvido no estômago, mas, maioritariamente, na parte superior do intestino delgado. A velocidade de absorção depende de quanto tempo o indivíduo se encontra em jejum, no entanto, a maior parte das vezes, uma hora após a ingestão, penetra em todos os tecidos do corpo de forma proporcional ao teor de água. Visto que o álcool se distribui de modo uniforme pela água do organismo, a sua concentração no sangue após a administração de uma dose conhecida pode ser estimada indiretamente através da medição de concentrações na urina, soro ou plasma<sup>203</sup>.

No que toca à eliminação desta substância do organismo, a maioria ocorre através do metabolismo no fígado e o restante é excretado pelos pulmões, rins e nas fezes<sup>203</sup>.

Quando a ingestão é feita em grandes quantidades é possível que alguns dos efeitos tóxicos do álcool possam surgir como, por exemplo, defeitos de nascença (síndrome alcoólica fetal) em recém-nascidos de progenitoras alcoólatras. Podem ainda surgir algumas complicações como tensão arterial elevada, insuficiência hepática, muitas vezes levando à morte, e deterioração mental. Adicionalmente, o comportamento induzido pelo álcool é um fator relevante na maioria dos acidentes e assassínios<sup>203</sup>.

- Amostra: Soro, plasma ou urina.
- Condições de colheita: É necessário ter em conta algumas condições para a realização desta colheita. Primeiramente, não se deve utilizar álcool ou outros desinfetantes voláteis na

colheita ou conservação de amostras de sangue. Utilizar, preferencialmente, cloreto de benzalcônio, iodo ou outros desinfetantes aquosos adequados. É importante também garantir que o tubo de amostra é mantido bem fechado para evitar a evaporação desta substância<sup>203</sup>.

Os tubos com fluoreto e oxalato conservam o álcool ao impedirem a glicólise, pelo que são os aditivo e anticoagulante preferenciais quando é utilizada amostra de plasma<sup>203</sup>.

Por outro lado, não são necessários conservantes para amostras de urina, pelo que estas deverão ser conservadas refrigeradas com o mínimo espaço possível de ar no respetivo recipiente. No entanto, é necessário a verificação do pH destas amostras, pois o pH de análise deve-se situar entre os 3,0 e os 11,0<sup>203</sup>.

- **Metodologia:** O ensaio para determinação quantitativa da concentração de álcool etílico no soro, plasma ou urina, é um ensaio cinético e baseia-se numa reação enzimática<sup>203</sup>.
- **Equipamento:** *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- **Interpretação clínica:** A dosagem letal para crianças foi estabelecida em 3 g/kg de peso corporal, mas uma quantidade inferior pode ser letal na presença de hipoglicemia induzida ou interações medicamentosas<sup>203</sup>.

Em relação aos níveis para adultos e consequentes complicações, estes podem variar consoante o indivíduo se trata de um consumidor esporádico ou crónico. As complicações correspondentes com cada nível estão representadas no quadro seguinte<sup>203</sup>.

*Tabela 12:* Níveis de álcool no sangue e consequentes complicações em indivíduos consumidores esporádicos ou consumidores crónicos.

Nível	Consumidor esporádico	Consumidores crónicos
<b>100 mg/dl</b> (0,10% ou 1,0 g/L)	Alcoolizados	Sinais mínimos
<b>200-250 mg/dl</b> (0,20-0,25% ou 2,0-2,5 g/L)	Perda de estado de alerta, início de estado letárgico	Esforço necessário para manter o controlo emocional e motor
<b>300-350 mg/dl</b> (0,30-0,35% ou 3,0-3,5 g/L)	Estupor a coma	Sonolência e lentidão
<b>&gt;500 mg/dl</b> (>0,50% ou >5,0 g/dl)	Possível morte	Coma

Fonte: *Emit® II Plus Ethyl Alcohol Assay*<sup>203</sup>.

## TESTE TOXICOLÓGICO

O exame toxicológico é um teste que tem como objetivo detetar a ingestão ou exposição a substâncias tóxicas ou drogas num determinado período específico.

O *Multi-Drug One Step Multi-line Screen Test Device* é um teste toxicológico que é capaz de detetar anfetaminas, antidepressivos tricíclicos, barbitúricos, benzodiazepinas, canabinóides, metanfetaminas, cocaína, opiáceos/morfina e metadona em amostras de urina<sup>204</sup>.

- Amostra: Urina (aleatória).

- Metodologia: A detecção qualitativa de múltiplas drogas e/ou metabolitos na urina é feita por imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral, baseado no princípio da ligação competitiva. Neste ensaio, as drogas presentes na amostra competem com o respetivo conjugado por locais de ligação aos anticorpos específicos, ou seja, se uma droga presente na amostra de urina estiver abaixo da concentração de *cut-off* do teste, não ocorrerá a saturação dos locais de ligação do seu anticorpo específico. Desta forma, o anticorpo reagirá com o conjugado e aparecerá uma linha colorida visível na região de teste para a droga específica (resultado negativo). Ao contrário disso, quando a presença da droga está acima da concentração de *cut-off*, esta irá saturar os locais de ligação do anticorpo e, por conseguinte, a linha colorida não se irá formar na região de teste (resultado positivo)<sup>204</sup>.

Para controlo do procedimento, deverá aparecer sempre uma linha colorida na região de controlo que indica que o teste foi bem realizado (volume de amostra correto e cromatografia sem interferentes)<sup>204</sup>.

- Limitações/interferências: Este teste não distingue entre drogas de abuso e determinados medicamentos. Adulterantes nas amostras podem produzir resultados incorretos, independentemente do método analítico usado. Um resultado negativo pode não indicar urina livre de droga, pois podem ocorrer resultados negativos em amostras onde a droga está abaixo do nível de *cut-off* do teste. Por outro lado, um resultado positivo pode ser obtido a partir de determinados alimentos ou suplementos alimentares<sup>204</sup>.

- Procedimentos: O dispositivo de teste deverá ser posicionado numa superfície nivelada. Com o conta-gotas na vertical, transferir três gotas inteiras de urina para cada poço de amostra. A leitura dos resultados deve ser feita passados cinco minutos e nunca depois dos dez minutos<sup>204</sup>.

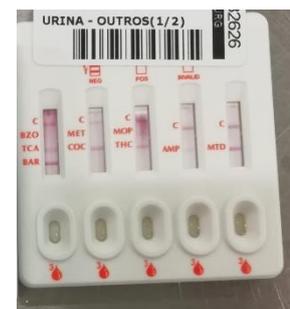


Figura 35: *Multi-Drug One Step Multi-line Screen Test Device* (urina) realizado durante o estágio.

## BENZODIAZEPINAS

As benzodiazepinas são fármacos sedativos/hipnóticos estruturalmente semelhantes que incluem fármacos de uso corrente, tais como, as clorodiazepinas (diazepam e oxazepam)<sup>205</sup>.

As diferentes benzodiazepinas são absorvidas a taxas distintas e o momento do seu efeito psicoativo varia conforme a taxa de absorção. Estas substâncias são, normalmente, ingeridas por via oral e são metabolizadas pelo fígado, de onde surgem alguns metabolitos farmacologicamente ativos. É ainda de referir que as benzodiazepinas potenciam os efeitos de outros supressores do sistema nervoso central, tais como o álcool etílico<sup>205</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: O ensaio para análise qualitativa e semiquantitativa de benzodiazepinas específicas e metabolitos desta substância no soro utiliza a técnica EMIT<sup>205</sup>.
- Limitações/interferências: Um resultado positivo neste ensaio indica a presença de benzodiazepinas, mas não indica, nem mede, o nível de intoxicação. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou ictéricas podem originar interferências no ensaio<sup>205</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Uma amostra que apresente uma alteração do valor de absorvência ( $\Delta A$ ) igual ou superior ao  $\Delta A$  do calibrador “baixo” deve ser interpretada como positiva, ou seja, a amostra contém benzodiazepinas. Por sua vez, uma amostra que apresente uma alteração do valor de absorvência ( $\Delta A$ ) inferior ao  $\Delta A$  do calibrador “baixo” deve ser interpretada como negativa. Este caso pode ocorrer em duas situações, ou a amostra não contém qualquer uma das benzodiazepinas que são detetadas por este ensaio, ou as benzodiazepinas estão presentes em concentrações inferiores às do calibrador “baixo”<sup>205</sup>.

É possível ainda efetuar determinações semiquantitativas de benzodiazepina através deste ensaio, utilizando uma curva de calibração com os valores de  $\Delta A$  dos calibradores negativo, baixo e médio, em função das concentrações respetivas de diazepam em cada calibrador. Só assim os valores de  $\Delta A$  das amostras positivas podem ser comparados com a curva de calibração<sup>205</sup>.

#### **4.3.5. Outros testes**

##### **PROVA DE TOLERÂNCIA ORAL À GLUCOSE**

A Prova de Tolerância Oral à Glucose (PTOG) é utilizada, principalmente, para o diagnóstico de diabetes quando os níveis de glicemia são ambíguos, durante a gravidez (entre as vinte e quatro e as vinte e oito semanas) ou para estudos epidemiológicos. Esta prova deve ser realizada de manhã, precedida de jejum de oito a catorze horas e após, pelo menos, três dias

de regime alimentar não restritivo e habitual atividade física. Durante a prova o indivíduo não poderá fumar e deve permanecer sentado. É ainda aconselhável que seja registada a presença de fatores que possam influenciar a interpretação dos resultados, como medicação, presença de infeções, etc<sup>206</sup>.

▪ Procedimento<sup>206</sup>:

1. Deve ser realizada uma colheita de sangue em jejum, o mais rapidamente possível.
2. Processamento da amostra.
3. Análise do resultado. Em adultos e crianças, se o resultado de glicemia for inferior a 126 mg/dl, pode-se proceder à realização da prova. No caso das grávidas, a prova só será efetuada se o valor da glicemia for inferior a 92 mg/dl. Em indivíduos com valores superiores aos acima mencionados, não deve ser realizada a prova.
4. Administração de glucose via oral. A solução que deverá ser administrada a adultos e grávidas contém 75 g de glucose em 300 ml de água. No caso de crianças, estas só devem ingerir a quantidade de solução que corresponda a 1,75 g de glucose por 1 kg de peso corporal, sendo que nunca pode ultrapassar a quantidade de glucose recomendada para um adulto (75 g). Em ambos os casos, a solução deve ser ingerida num período de cinco minutos e a contagem do tempo inicia-se a partir do momento em que se começa a beber a solução.
5. A nova colheita de sangue deve ser feita passadas duas horas da ingestão da solução, em casos de adultos ou crianças. No caso da mulher grávida, são necessárias duas novas colheitas passadas uma e duas horas após ingestão da solução.

▪ Crítérios de avaliação/diagnóstico:

**Diabetes mellitus**<sup>206</sup>:

Tabela 13: Critérios de classificação de anomalias no metabolismo dos hidratos de carbono, segundo a OMS e DGS.

	Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ)*	Tolerância Diminuída à Glucose (TDG)*	Diabetes mellitus
Glicemia em jejum	≥110 mg/dl e <126 mg/dl	<126 mg/dl e	≥126 mg/dl ou
Glicemia 2 horas após ingestão de 75 g de glucose (PTOG)	————	≥140 mg/dl e <200 mg/dl	≥200 mg/dl ou
Glicemia ocasional	————	————	≥200 mg/dl e sintomas clássicos

\*Nota: Tanto a AGJ como a TDG identificam grupos de indivíduos que se encontram em estadios distintos da alteração do metabolismo da glucose e para os quais existe um risco aumentado de vir a sofrer de diabetes mellitus.

Fonte: Provas de Tolerância à Glucose Oral (Protocolo)<sup>206</sup>.

### **Diabetes gestacional:**

A diabetes gestacional refere-se à intolerância aos hidratos de carbono que resulta numa hiperglicemia de gravidade variável, que tem início ou é diagnosticada durante a gravidez. É geralmente transitória, desaparecendo com o fim da gestação, no entanto, se não for controlada, poderá comprometer o desenvolvimento do feto e dar origem a uma futura diabetes *mellitus*. Todas as grávidas com diabetes gestacional devem ser submetidas a uma nova PTOG, seis a oito semanas após o parto (PTOG para adultos), para a sua reclassificação. Se a prova for normal, estas mulheres serão classificadas como tendo uma anormalidade prévia de tolerância à glucose, caso contrário, serão classificadas de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Direção Geral de Saúde (DGS) como tendo diabetes *mellitus* ou TDG<sup>206</sup>.

De referir que as mulheres com diabetes *mellitus* prévia à gravidez, devem ser tratadas de acordo com essa classificação e não como tendo diabetes gestacional. Para além disso, mulheres grávidas que apresentem um valor de glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dl ou  $>200$  mg/dl em qualquer hora do dia, são excluídas deste rastreio, devendo ser consideradas diabéticas<sup>206</sup>.

O diagnóstico definitivo é sempre baseado nos valores da PTOG e requer que um ou mais valores sejam iguais ou superiores aos indicados na tabela seguinte<sup>206</sup>.

Tabela 14: Critérios de diagnóstico de diabetes gestacional.

Horas	Glicemia (mg/dl)
Jejum (0)	$\geq 92$
1	$\geq 180$
2	$\geq 153$

Fonte: Provas de Tolerância à Glucose Oral (Protocolo)<sup>206</sup>

Esta prova consiste em avaliações seriadas da glicemia plasmática, antes e após uma dose de glucose, ou seja, avalia a *clearance* da glucose em circulação após uma sobrecarga (administração oral de glucose) definida e em condições controladas. Nesta prova, antes da administração da glucose, é efetuada uma colheita de sangue e urina (tempo zero) e, após a administração de glucose, devem ser feitas colheitas de sangue de trinta em trinta minutos até decorridos cento e vinte minutos da toma da sobrecarga. Consoante os valores obtidos a cada colheita, podem ser tiradas conclusões acerca do bom funcionamento hepático, gástrico ou hormonal<sup>137</sup>.

## GASIMETRIA

A gasimetria arterial é um exame para avaliação do equilíbrio ácido-base e níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> no sangue. Este exame é, normalmente, requisitado sempre que o quadro clínico seja indicativo de alterações de ventilação/oxigenação, no equilíbrio ácido-base ou hidroeletrólítico, especialmente em indivíduos com doenças pulmonares obstrutivas crônicas, e também no acompanhamento de doentes sujeitos a oxigenoterapia<sup>207</sup>.

- Amostra: Sangue arterial.
- Condições de colheita: A colheita de uma amostra de sangue arterial é um procedimento efetuado apenas pelo médico. A punção deverá ser feita na artéria radial, junto ao punho, ou no caso de impossibilidade, na artéria braquial ou femoral.
- Metodologia: Através de sensores específicos são determinados os parâmetros, como o pH, a pressão parcial de CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>), a pressão parcial de O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>), hematócrito, e as concentrações de sódio, potássio, cálcio, glucose e lactato<sup>136</sup>.
- Equipamento: *GEM® PREMIER™ 3000* da *WERFEN*.
- Interpretação clínica: O equilíbrio hidroeletrólítico é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise, rins e várias hormonas (descritas no capítulo seguinte). Ligado ao equilíbrio hidroeletrólítico está ainda o equilíbrio ácido-base que, normalmente, é controlado e mantido por sistemas tampão através dos rins e do sistema pulmonar. Quando ocorre um desequilíbrio ácido-base, o pH do organismo (7,35-7,45) é alterado, provocando uma acidose ou alcalose. Estes desequilíbrios podem ser agudos ou crônicos e ocorrer em diferentes estados de gravidade, podendo os mecanismos regulatórios/compensatórios do organismo não serem suficientes para reverter o quadro. Estas condições podem ser classificadas em distúrbios ácido-base respiratórios e distúrbios ácido-base metabólicos, consoante o fator que está em desequilíbrio<sup>207</sup>.

A acidose respiratória ocorre quando os níveis de PCO<sub>2</sub> arterial aumentam, devido à eliminação ineficaz do O<sub>2</sub><sup>208</sup>. Esta condição é caracterizada por um quadro de hipoventilação e, normalmente, está associada ao consumo de drogas, oxigenoterapia na doença pulmonar obstrutiva crônica, crise asmática, pneumonia, traumatismo cranioencefálico, entre outros<sup>207</sup>. Em oposição, a alcalose respiratória é caracterizada por uma redução da PCO<sub>2</sub> que, geralmente, ocorre em consequência da hiperventilação alveolar<sup>208</sup>. As etiologias da alcalose respiratória são variadas e incluem hipoxia, doença pulmonar, asma, efeitos de medicamentos, ventilação mecânica, distúrbios do sistema nervoso central, doenças metabólicas, gravidez e síndrome de hiperventilação<sup>207</sup>.

Em relação aos distúrbios metabólicos, temos a acidose metabólica, caracterizada por uma diminuição no nível de bicarbonato do plasma, e/ou um aumento acentuado do *gap* aniônico sérico (diferença entre catiões e aniões). Quando o *gap* aniônico está normal, a etiologia da acidose é, normalmente, gastrointestinal ou renal. Ao invés disso, se o *gap* aniônico estiver aumentado, a acidose pode ser causada por cetoacidose diabética, cetoacidose alcoólica, acidose láctica, doença renal ou ingestão de substâncias como o ácido salicílico. Por outro lado, a alcalose metabólica é consequência de distúrbios que causam a perda de iões de hidrogénio do corpo ou do aumento do bicarbonato em circulação. Isto acontece, frequentemente, devido à perda de secreção gástrica (por exemplo, vômitos e diarreia) e excesso de mineralocorticoides<sup>207</sup>.

## 4.4. Imunologia

A Imunologia é uma ciência cujo objeto de estudo principal é o sistema imunitário e todos os mecanismos de defesa do organismo contra qualquer agente externo ou interno que perturbe o equilíbrio biológico. O setor de Imunologia é responsável por detectar a presença de antígenos e/ou anticorpos em amostras biológicas e quantificar essa resposta do organismo a agentes patogênicos, de modo a auxiliar no diagnóstico de patologias associadas ao sistema imunitário como, por exemplo, as alergias e as doenças autoimunes.

### 4.4.1. Equipamentos

#### ***IMAGE® 800 da BECKMAN COULTER***

O equipamento *IMAGE® 800* é um analisador químico de proteínas projetado para a quantificação *in vitro* de componentes de fluidos biológicos. As metodologias de medição do sistema são a taxa de turbidimetria e a taxa de nefelometria. No nefelômetro é medido o aumento da intensidade da luz dispersa por partículas suspensas em solução, a um comprimento de onda de 670 nm. Por outro lado, no turbidímetro é medida a diminuição da intensidade da luz dispersa por partículas suspensas numa solução, a um comprimento de onda de 940 nm<sup>209</sup>.



Figura 36: Equipamento *IMAGE® 800* da *BECKMAN COULTER*.

#### ***MAGLUMI® 800 da SNIBE DIAGNOSTICS***

O equipamento *MAGLUMI® 800* possui um sistema de ensaio por quimioluminescência para detecção de metabolitos em amostras de soro<sup>210</sup>.



Figura 37: Equipamento *MAGLUMI® 800* da *SNIBE DIAGNOSTICS*.  
Fonte: *Maglumi® Snibe Co., Ltd.*<sup>210</sup>.

#### ***MAGO® 4S da DIAMEDIX***

O equipamento *MAGO® 4S* é um analisador capaz de executar testes com base em metodologias diferentes, nomeadamente, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *ImmunoFluorescent Assay* (IFA). Neste equipamento são utilizados *kits* desenvolvidos pela *EUROIMMUN* para diagnóstico de doenças autoimunes e infeções.

## **PHADIA® 250 da THERMOFISHER SCIENTIFIC**



Figura 38: Equipamento Phadia® 250 da THERMOFISHER SCIENTIFIC.  
Fonte: Phadia™ 250 Instrument | Thermo Fisher Scientific<sup>212</sup>.

O Phadia® 250 é um equipamento automático usado para a realização de testes de diagnóstico *in vitro* ImmunoCAP® e EliA™, em áreas clínicas de alergologia e autoimunidade, respetivamente. A fase sólida dos ensaios ImmunoCAP® possui uma grande quantidade de antígenos ou anticorpos específicos acoplados covalentemente, que reagem com a molécula de interesse contida na amostra. Por outro lado, a fase sólida dos ensaios EliA™ tem a capacidade de extração de moléculas de analito da amostra, uma vez que é coberta por antígenos específicos na sua superfície<sup>211,212</sup>.

### **4.4.2. Marcadores Tumorais**

#### **ANTIGÉNIO CARCINOEMBRIONÁRIO**

O Antígeno Carcinoembrionário (CEA), é uma glicoproteína da superfamília das imunoglobulinas com funções de adesão celular. Esta proteína é, normalmente, produzida durante o desenvolvimento fetal e acaba por desaparecer antes do nascimento. Contudo, o CEA pode ser encontrado em indivíduos com tumores, principalmente, com cancro colorretal<sup>213</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: Para a determinação quantitativa da concentração de CEA em circulação é usado um ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*, que utiliza dois anticorpos monoclonais anti-CEA e um substrato quimioluminescente<sup>213</sup>.
- Limitações/interferências: Os doentes que estão regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou a técnicas de diagnóstico que utilizam imunoglobulinas podem produzir anticorpos, que interferem com o imunoensaio. Os níveis de CEA podem estar elevados em indivíduos com doenças não malignas e fumadores<sup>213</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A determinação da concentração de CEA sérico torna-se muito útil no prognóstico e tratamento de doenças malignas, especialmente, de cancro colorretal. As determinações seriadas podem ser utilizadas para monitorizar os doentes quanto à evolução, regressão ou recorrência do cancro após o tratamento. Níveis persistentemente elevados deste

marcador tumoral, após a terapêutica ou a intervenção cirúrgica, indica que existe doença residual ou recorrência, enquanto que níveis dentro dos valores de referência podem indicar que a intervenção foi bem-sucedida<sup>213</sup>.

### CA 15.3

O *cancer antigen* (CA) 15.3 é uma glicoproteína de superfície da família das mucinas, codificada pelo gene *MUC1*. As mucinas, presentes nos epitélios glandulares normais de vários órgãos, têm como principal função proteger e lubrificar as células vizinhas<sup>214</sup>.

Em mulheres com cancro da mama, a mucina MUC1, presente nas glândulas mamárias, torna-se glicosilada. Esta glicosilação provoca um aumento exacerbado de expressão desta proteína, o que faz com que seja libertada na circulação<sup>214</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de antígeno CA 15.3 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>214</sup>.
- Limitações/interferências: Os doentes que estão regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou a técnicas de diagnóstico que utilizam imunoglobulinas podem produzir anticorpos que interferem com o imunoensaio. Podem também ser observadas concentrações elevadas no soro de indivíduos com patologias benignas, grávidas ou com outras doenças não neoplásicas<sup>214</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação deste antígeno serve como um auxílio na monitorização do tratamento de doentes com cancro da mama. Os níveis do antígeno CA 15.3 podem estar elevados em muitas mulheres com carcinoma epitelial mamário, mas também em mulheres com cancro pulmonar, ovárico, pancreático e colorretal e em condições não malignas, tais como, tumor benigno da mama e do fígado, cirrose e hepatite<sup>214</sup>.

O aumento das concentrações do antígeno CA 15.3 pode indicar evolução da doença, enquanto que uma diminuição desses níveis pode estar associada à regressão da mesma<sup>214</sup>.

### CA 125

O antígeno CA 125 é uma glicoproteína semelhante às mucinas e está presente em concentrações elevadas nalguns tumores malignos do ovário<sup>215</sup>.

O cancro do ovário tende a ser assintomático nos seus estadios iniciais, quando há maior probabilidade de cura, o que faz com que muitas mulheres já se encontrem em estadios mais avançados no momento do diagnóstico. Juntamente com os níveis de CA 125, os fatores que contribuem para um prognóstico favorável desta doença são a idade reduzida das doentes, estadio inicial da doença, tumor bem diferenciado e volume circunscrito antes da cirurgia<sup>215</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de antígeno CA 125 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>215</sup>.
- Limitações/interferências: Os indivíduos que estão frequentemente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou a técnicas de diagnóstico que utilizam imunoglobulinas podem produzir anticorpos, que interferem com o ensaio. Concentrações elevadas podem ser observadas no soro de indivíduos com tumores não malignos, assim como, com cancro do ovário ou outras doenças metastáticas<sup>215</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação das concentrações do antígeno CA 125 em circulação são indicadas para o acompanhamento de mulheres com cancro do ovário, isto significa que, os níveis do antígeno CA 125 não têm valor prognóstico quando usados para rastreio ou para diagnóstico. Contudo, os níveis do antígeno CA 125 podem ser utilizados na monitorização da resposta terapêutica, estando elevados quando ocorre uma resposta baixa à terapia ou uma evolução da doença e diminuídos quando a resposta terapêutica é positiva<sup>215</sup>.

Os níveis de CA 125 também podem estar elevados noutras doenças, incluindo tumores benignos ou malignos, tais como, endometriose, cancro do pulmão e outras condições como a gravidez. Por outro lado, um valor abaixo do limite *cut-off* não indica a ausência de cancro do ovário, pelo que é fundamental que sejam considerados outros testes para a monitorização do cancro<sup>215</sup>.

## CA 19.9

O antígeno CA 19.9 é uma mucina relacionada ao sistema de grupo sanguíneo de Lewis e a sua produção está associada a tumores sintetizados pelas células pancreáticas e pelos epitélios gástrico, salivar, do cólon e endométrio<sup>216</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de antígeno CA 19.9 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>216</sup>.

- Limitações/interferências: Concentrações elevadas de antígeno CA 19.9 podem ser observadas no soro de indivíduos com cancro do pâncreas ou outras doenças malignas<sup>216</sup>.

Os doentes em contacto permanente com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos, que interferem com o imunoensaio. É ainda de referir que este ensaio é sensível a interferência de elevados níveis de biotina, substância presente em suplementos alimentares destinados a prevenir a queda de cabelo e a melhorar o crescimento das unhas<sup>216</sup>.

- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.

- Interpretação clínica: Para que seja possível a interpretação correta dos resultados obtidos, os indivíduos devem expressar o antígeno do sistema de grupo sanguíneo de Lewis, caso contrário, não serão capazes de produzir o antígeno CA 19.9, mesmo na presença de doença maligna<sup>216</sup>.

Os níveis do antígeno CA 19.9 são, normalmente, usados como um auxílio na monitorização da resposta à terapia de doentes com cancro do pâncreas, o que significa que níveis constantemente elevados podem indicar uma baixa resposta à terapêutica ou evolução da doença, enquanto que níveis diminuídos podem indicar uma resposta favorável à terapêutica<sup>216</sup>.

Para além do cancro do pâncreas, este antígeno também pode estar presente no cancro colorretal, hepatocelular, do ducto biliar, do estômago e do esófago, assim como, em doenças não cancerosas como a cirrose, colangite, hepatite, pancreatite e patologias gastrointestinais não malignas<sup>216</sup>.

## **$\alpha$ -FETOPROTEÍNA**

A  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína de cadeia simples que se assemelha à albumina e, juntas, constituem as principais proteínas em circulação no feto. A produção de AFP ocorre, principalmente, no fígado fetal e no saco vitelino e é detetada pela primeira vez em circulação trinta dias após a concepção. Na décima terceira semana de gestação, a AFP alcança uma concentração máxima em circulação, que diminui gradualmente até ao nascimento<sup>217</sup>.

A presença de AFP em circulação é encontrada apenas em mulheres grávidas ou em indivíduos com determinadas doenças malignas<sup>217</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de AFP no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>217</sup>.

- Limitações/interferências: Os indivíduos que têm contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou a técnicas de diagnóstico que utilizam imunoglobulinas podem produzir anticorpos que interferem com o imunoensaio<sup>217</sup>.

- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: A medição dos níveis de AFP é utilizada como auxílio na monitorização do tratamento de doentes com tumores produtores de AFP, quando os resultados são interpretados em conjunto com o quadro clínico do indivíduo. Níveis elevados deste marcador tumoral são encontrados em indivíduos com carcinoma hepático primário, assim como, outras doenças malignas como, por exemplo, o carcinoma testicular não-seminomatoso. No entanto, níveis elevados podem ocorrer também em condições não-neoplásicas como a ataxia telangiectasia, a tirosinemia hereditária, doenças hepáticas não malignas (hepatite viral aguda, hepatite crónica e cirrose) e durante a gravidez, pelo que este marcador não deve ser utilizado para diagnóstico ou rastreio de doença cancerígena, mas sim como auxílio no prognóstico e tratamento destas doenças<sup>217</sup>.

Para além disso, juntamente com outros testes, a determinação da concentração de AFP pode ser usada também em testes de rastreio pré-natal, para a avaliação do risco de o feto possuir síndrome de Down (trissomia 21)<sup>217</sup>.

## **β2-MICROGLOBULINA**

A β2-microglobulina é uma proteína de membrana presente em todas as células nucleadas, principalmente linfócitos, e está associada às cadeias pesadas de proteínas do MHC de classe I. Devido ao seu tamanho reduzido, esta proteína é capaz de atravessar a membrana glomerular, sendo depois completamente reabsorvida nos túbulos proximais<sup>218</sup>.

- Amostra: Soro e urina.

- Condições de colheita: Nas amostras de urina, o pH deve ser ajustado entre seis e oito, pois a β2-microglobulina degrada-se facilmente em pH inferior a 6<sup>218</sup>.

- Metodologia: A determinação quantitativa de β2-microglobulina na amostra é feita pelo método turbidimétrico<sup>218</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras hemolisadas, lipémicas ou contaminadas causam interferências nos resultados<sup>218</sup>.

- Equipamento: *IMAGE® 800* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: Os níveis séricos de β2-microglobulina podem sofrer um aumento devido a uma excessiva produção ou à redução da sua filtração glomerular<sup>218</sup>.

O aumento da produção desta proteína pode estar relacionado com uma grande quantidade de patologias, em especial do sistema imunitário linfoide, neoplasias hematológicas, infecções víricas ou doenças autoimunes. Por este facto, a  $\beta$ 2-microglobulina não deve ser usada como marcador de diagnóstico de nenhuma patologia, mas sim como um marcador de prognóstico de patologias como, por exemplo, o mieloma múltiplo<sup>218</sup>.

Por outro lado, a sua medição na urina torna-se um bom marcador de disfunção renal, uma vez que, níveis séricos aumentados com níveis urinários baixos indicam que o distúrbio está associado aos glomérulos e níveis séricos reduzidos, mas elevados na urina, poderão indicar lesão ou doença nos túbulos renais.

## ENOLASE ESPECÍFICA DO NEURÓNIO

A enolase específica do neurónio (NSE) é uma isoenzima da enolase. A NSE é a principal proteína cerebral e a sua expressão ocorre tardiamente no processo de diferenciação dos neurónios, o que a torna num marcador útil para a avaliação da maturação neural e também num marcador bioquímico para tumores derivados destas células<sup>219</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de NSE é feita por imunoensaio quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>219</sup>.
- Limitações/interferências: Os indivíduos com uma exposição regular a animais ou que tenham recebido imunoterapia recentemente podem conter anticorpos, que podem originar valores falsamente elevados ou reduzidos. De referir que a hemólise também interfere nos resultados, uma vez que, os eritrócitos contêm NSE<sup>219</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A NSE encontra-se elevada, principalmente, no soro de indivíduos com tumores neuroendócrinos pouco diferenciados, como o cancro do pulmão, neuroblastomas, insulinomas, carcinoma medular da tiroide e tumor carcinoide gastrointestinal. Para fins de diagnóstico, estes resultados devem ser sempre avaliados e verificados em conjunto com o histórico médico, os exames clínicos e outras informações clínicas relevantes, pelo que a principal aplicação clínica do doseamento da NSE é a monitorização destes tumores quanto à resposta à quimioterapia ou na deteção de recidivas precoces<sup>219</sup>.

## PSA (TOTAL E LIVRE)

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína de cadeia simples<sup>220</sup> que funciona como serina protease e é produzido pelas células epiteliais da próstata<sup>221</sup>. O PSA pode estar presente no tecido epitelial normal, hiperplásico benigno e prostático maligno, assim como, no fluido prostático e no plasma seminal<sup>220</sup>. Quando ocorre um trauma ou uma doença que provoque uma anomalia na estrutura da glândula prostática pode ocorrer uma passagem de PSA para a corrente sanguínea<sup>221</sup>.

O PSA pode ser encontrado no soro em três formas distintas: PSA complexado com a  $\alpha 2$ -macroglobulina e PSA complexado com a  $\alpha 1$ -antiquimotripsina, ambos inibidores da serina protease, e PSA livre. A primeira forma não demonstra possuir reatividade imunológica, no entanto, as últimas duas formas podem ser detetadas imunologicamente e são denominadas, conjuntamente, como PSA total<sup>220,221</sup>.

A medição das formas de PSA em circulação é útil para diferenciar o cancro da próstata de outras doenças prostáticas benignas<sup>221</sup>, assim como, detetar o cancro da próstata nos estadios iniciais, quando ainda está limitado à glândula e é possível um tratamento eficaz<sup>220</sup>.

- Amostra: Soro.
- Condições de colheita: As amostras devem ser colhidas antes de intervenções na próstata, tais como, toque retal, massagem da próstata, ultrassom transretal e biópsia da próstata<sup>220,221</sup>.
- Metodologia: As determinações quantitativas dos níveis de PSA total e PSA livre são feitas por ensaios imunoenzimáticos quimioluminescentes do tipo *sandwich*<sup>220,221</sup>.
- Limitações/interferências: Assim como nos outros imunoenaios os indivíduos que estão regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos interferentes e consequentemente produzir resultados errados. Também os fármacos inibidores da  $\alpha$ -redutase ou outros usados no tratamento de hiperplasia benigna da próstata podem afetar os níveis de PSA em alguns doentes<sup>220,221</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: Os níveis séricos de PSA (livre e total) devem ser usados em conjunto com informações disponíveis a partir da avaliação clínica do doente e de outros métodos de diagnósticos, tais como, o toque retal. Concentrações elevadas de PSA total no soro podem sugerir a presença de cancro da próstata, no entanto, o diagnóstico apenas poderá ser confirmado quando for realizada a biópsia prostática<sup>220</sup>.

Para além disso, as determinações dos níveis séricos de PSA livre e total devem ser utilizadas em conjunto para calcular a relação entre PSA livre e PSA total, expressa em

percentagem e designada de PSA livre percentual. Esta relação, juntamente com outros exames complementares, ajuda a distinguir o cancro da próstata de outras doenças prostáticas<sup>221</sup>, como hiperplasia benigna da próstata ou condições inflamatórias da próstata e/ou dos tecidos adjacentes<sup>220</sup>, em homens a partir dos cinquenta anos, que apresentem níveis de PSA total dentro dos limites de referência e cujos resultados do exame do toque retal não sugeriram a existência de cancro. Por outro lado, entre os indivíduos com concentrações elevadas de PSA, os homens com cancro da próstata tendem a ter valores de PSA livre percentual menores que os dos homens com doenças benignas<sup>221</sup>.

O PSA livre percentual também pode ser utilizado na avaliação do risco, pois valores baixos deste parâmetro estão associados a um risco mais elevado de cancro<sup>221</sup>. Por outro lado, a medição dos valores de PSA também pode ser útil como marcador para monitorizar estadios clínicos avançados ou na deteção de tumor residual e cancro recorrente após uma prostatectomia radical<sup>220</sup>.

#### CA 72.4

O antigénio CA 72.4 é uma glicoproteína encontrada na superfície de muitas células tumorais e é expressa numa vasta gama de carcinomas. Normalmente, esta proteína não é encontrada nos tecidos de um indivíduo adulto saudável, com exceção do endométrio secretor<sup>222</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa do antigénio CA 72.4 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>222</sup>.
- Limitações/interferências: Nas amostras contaminadas com bactérias ou inativadas pelo calor os resultados podem não ser confiáveis. As amostras de indivíduos contendo anticorpos humanos anti-rato em concentrações elevadas podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>222</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: O antigénio CA 72.4 é usado para diagnosticar cancro gástrico e cancro epitelial do ovário. Contudo, pode ainda ser usado, em combinação com os marcadores CA 19.9 e CEA, para monitorização da terapia e avaliação da evolução da doença após cirurgia de indivíduos com cancro colorretal e/ou gástrico. O CA 72.4 apresenta-se ainda como um bom marcador para deteção de doença em estadios avançados e pode ainda ser usado para

monitorizar a recorrência ou metastização nos casos que apresentaram níveis séricos elevados deste marcador antes da cirurgia<sup>222</sup>.

### **CYFRA 21.1**

O CYFRA 21.1 é um antigénio formado por um fragmento de citoqueratina 19 e é utilizado como marcador tumoral para o cancro do pulmão. Este antigénio é uma proteína ácida expressa em células tumorais, que entra na circulação sanguínea após a apoptose da célula tumoral<sup>223</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de CYFRA 21.1 no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>223</sup>.
- Limitações/interferências: A contaminação bacteriana, a inativação pelo calor, a hemólise e a lipemia das amostras podem afetar os resultados deste ensaio. Também as amostras de indivíduos que contêm anticorpos humanos anti-rato podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>223</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: Após a apoptose das células cancerígenas do pulmão, os níveis séricos de CYFRA 21.1 aumentam, juntamente, com a concentração de outros marcadores tumorais como, por exemplo, o CEA. Isto significa que os níveis pré-operatórios de CYFRA 21.1 estão relacionados com o estadio do tumor, na medida que, quanto mais elevado for o nível de expressão deste antigénio, maior será o estadio e o tamanho do tumor<sup>223</sup>.

Este marcador tumoral é ainda usado para avaliar o efeito prognóstico do tratamento de indivíduos com cancro do pulmão sendo que, níveis mais baixos em circulação significam uma melhor resposta à quimioterapia<sup>223</sup>.

### **ANTIGÉNIO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

O antigénio do carcinoma de células escamosas (SCCA) é uma glicoproteína codificada por dois genes homólogos, *SCCA1* e *SCCA2*, implicados no processo de proliferação do tumor<sup>224</sup>.

Os carcinomas de células escamosas (SCC), também conhecidos como carcinomas epidermoides, são o conjunto de cancros que resultam de células escamosas. Estas células encontram-se na superfície de alguns órgãos do corpo, principalmente, do sistema respiratório

e digestivo. Apesar de pertencerem aos SCC, os carcinomas de diferentes órgãos podem apresentar sintomas, prognóstico e resposta ao tratamento diferentes<sup>224</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de SCCA no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>224</sup>.
- Limitações/interferências: A contaminação bacteriana, inativação pelo calor, hemólise e lipemia das amostras podem deturpar os resultados para este ensaio. Também as amostras que contêm anticorpos humanos anti-rato podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos, quando estes estão presentes em concentrações séricas extremamente elevadas<sup>224</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A expressão de SCCA aumenta em todos os carcinomas de célula escamosas, incluindo os do colo do útero, pulmão, cabeça e pescoço, esôfago e reto, mas também em indivíduos com insuficiência renal e com distúrbios cutâneos não malignos, pelo que se torna fundamental a análise do quadro clínico e de outros exames complementares para o correto diagnóstico. A concentração sérica de SCCA está diretamente relacionada com o estadio da doença, a presença ou ausência de fatores de risco, a resposta terapêutica e o resultado oncológico (benigno ou maligno)<sup>224</sup>.

#### 4.4.3. Análises Tiroide

O eixo hipotálamo-hipófise-tiroide regula a síntese, a libertação e a ação das hormonas tiroideias<sup>225</sup>. A Hormona Libertadora de Tirotropina (TRH) é libertada pelo hipotálamo em resposta às concentrações de hormonas da tiroide livres na circulação e circula do órgão de onde é sintetizada para a adeno-hipófise, através do sistema veia porta, dando início à síntese e libertação de Tirotropina ou Hormona Estimulante da Tiroide (TSH). O órgão alvo para a TSH é a glândula tiroide, onde se liga ao seu recetor<sup>226</sup>, e estimula a síntese, o armazenamento, a secreção e o metabolismo da tiroxina (T4) e da triiodotironina (T3)<sup>225-227</sup>. Uma vez libertadas na circulação, a maior parte de T4 e T3 ligam-se a proteínas transportadoras, como a globulina de ligação de tiroxina (TBG) e a albumina<sup>227</sup>.

A T4 e a T3 que não se encontra ligadas às proteínas transportadoras (livres) são as hormonas biologicamente ativas, importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento do ser humano e na manutenção da temperatura corporal, estimulando a produção de calor.

Além disso, estas hormonas estão implicadas em todos os processos do metabolismo dos hidratos de carbono, bem como, de determinadas etapas do metabolismo dos lípidos e das vitaminas<sup>225,227</sup>.

### **T3 (TOTAL E LIVRE)**

A T3 é a principal hormona tiroideia biologicamente ativa<sup>225</sup> e é apenas a parte livre que está imediatamente disponível para ligar ao recetor e estimular uma resposta do órgão alvo ou dos tecidos<sup>226</sup>.

De toda a T3 circulante, somente uma pequena proporção provém da secreção direta da glândula tiroide e a restante fração resulta da deiodinação enzimática de T4 para T3 pelos tecidos periféricos<sup>227,228</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de T3 total e livre é feita por ensaio imunoenzimático competitivo, com deteção por quimioluminescência<sup>225,226</sup>.
- Limitações/interferências: Nestes dois ensaios é necessário ter em conta que podem ocorrer interferências provocadas pela presença de anticorpos heterófilos ou por elevados níveis de biotina na amostra<sup>225,226</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação da concentração sérica de T3 total é importante no diagnóstico dos distúrbios da tiroide. Concentrações elevadas de T3 total podem ser encontradas na doença de Graves e em muitas outras patologias que causam hipertiroidismo. Por outro lado, concentrações reduzidas estão presentes em indivíduos com patologias que provocam hipotiroidismo primário, como é o caso da tiroidite de Hashimoto e o hipotiroidismo neonatal, ou em indivíduos com hipotiroidismo secundário, causado por disfunções do eixo hipotálamo-hipófise<sup>225,226</sup>.

Por sua vez, a medição de T3 livre é útil quando ocorrem alterações dos valores de T3 total, devido a mudanças nas proteínas de ligação com as hormonas tiroideias, nomeadamente, nos casos de TBG alterada ou de baixas concentrações de albumina. Para além disso, é necessário ter em conta que as doenças metabólicas não-tiroideias também podem causar alterações nos níveis de T3 livre, pelo que os resultados devem ser sempre interpretados em conjunto com outros parâmetros. Nestes casos deve-se dar especial atenção a indivíduos que façam terapia com medicamentos anticonvulsivantes, pois estes podem provocar uma redução dos níveis de T3 livre, causados por um aumento do metabolismo hepático. Contrariamente aos

anteriores, indivíduos submetidos a terapêutica com heparina podem apresentar níveis elevados de T3 livre<sup>225</sup>.

#### **T4 (TOTAL E LIVRE)**

A medição dos níveis de T4 total fornece uma informação fidedigna do estado da tiroide quando não existem problemas de ligação às proteínas transportadoras desta hormona. Contudo, mudanças nessas proteínas podem ocorrer, o que afeta as concentrações de T4 total em circulação, deixando apenas inalterada a concentração da hormona livre<sup>227</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de T4 total e livre é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente<sup>227</sup>. No entanto, o ensaio para determinação da T4 total é um imunoensaio competitivo e para determinação da T4 livre é um imunoensaio do tipo *sandwich*<sup>228</sup>.
- Limitações/interferências: Indivíduos que estão permanentemente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos que interferem com os imunoensaios<sup>227,228</sup>. Por outro lado, durante a gravidez, o ensaio para determinação de T4 total pode originar resultados falsamente baixos<sup>227</sup>.
- Equipamento: UNICEL Dxi da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: As determinações de T4 livre e T4 total são importantes na confirmação do diagnóstico de distúrbios da tiroide. Assim, as concentrações de T4 total encontram-se elevadas em indivíduos com doença de Graves, hipotiroidismo secundário, tiroidite subaguda ou nódulo tóxico. Níveis reduzidos de T4 total ocorrem em casos de hipotiroidismo primário, como a tiroidite de Hashimoto e o hipotiroidismo neonatal, ou em casos de hipotiroidismo secundário<sup>227</sup>. Por outro lado, níveis altos de T4 livre comprovam o diagnóstico clínico de hipertiroidismo, enquanto níveis muito baixos desta fração podem confirmar um diagnóstico de hipotiroidismo. Os resultados devem ser sempre analisados juntamente com o quadro clínico e outros exames, pois alterações nos níveis de T4 livre também podem estar presentes noutras patologias<sup>228</sup>.

#### **TSH**

A síntese e a segregação de TSH são estimuladas pela TRH, produzida pelo hipotálamo em resposta aos níveis baixos de T3 e T4 em circulação. Em oposição, níveis elevados de T3 e

T4 suprimem a produção de TSH. Este sistema de *feedback* negativo é feito pelo eixo hipotálamo-hipófise-tiroide e qualquer alteração no seu funcionamento pode influenciar os níveis de TSH, T4 e T3 em circulação<sup>229</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de TSH é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>229</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras que contenham substâncias interferentes, como fator reumatoide, fosfatase alcalina endógena, fibrina e proteínas capazes de se ligarem à fosfatase alcalina, assim como, anticorpos heterófilos são suscetíveis de causar resultados errados no imunoensaio<sup>229</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A medição de TSH é utilizada para avaliação do estado da tiroide.

A TSH é, normalmente, medida em conjunto com outras hormonas ou anticorpos da tiroide para: detetar ou excluir casos de hipotiroidismo ou hipertiroidismo; monitorizar o tratamento; monitorizar indivíduos com cancro da tiroide em tratamento e avaliar a resposta ao teste de estimulação com TRH. Níveis reduzidos de TSH podem estar presentes na doença de Graves e no hipertiroidismo subclínico ou em doenças tiroideias gestacionais e pós-parto<sup>229</sup>.

## ANTICORPO ANTI-RECETOR DA TSH

O recetor da TSH é uma proteína que quando ligada a essa hormona estimula a produção de T4 e T3. Normalmente, este recetor é encontrado na superfície das células epiteliais da tiroide, mas também está presente no tecido adiposo e fibroblastos<sup>230</sup>.

Nas doenças autoimunes, as subunidades do recetor de TSH circulantes podem funcionar como antigénio sendo, por isso, o alvo de autoanticorpos, nomeadamente, os anticorpos anti-recetor da tirotropina (TRAb). Estes anticorpos podem estimular (TSAb) ou inibir (TBAb) a secreção das hormonas tiroideias, originando a doença de Graves ou o hipotiroidismo, respetivamente. No caso da doença de Graves, a estimulação do recetor da TSH pelos anticorpos TSAb origina hiperplasia da tiroide e, conseqüentemente, hipertiroidismo, enquanto que no hipotiroidismo, os anticorpos TBAb competem com a TSH pelos locais de ligação ao recetor, bloqueando o efeito biológico da TSH<sup>230</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de TRAb no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>230</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos humanos anti-rato, contaminação bacteriana ou inativadas pelo calor podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>230</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A determinação da concentração de TRAb em circulação auxilia na detecção ou exclusão do hipertiroidismo autoimune. Além disso, esta medição também pode ser usada para monitorizar a terapêutica aplicada na doença de Graves, ou auxiliar no diagnóstico de hipertiroidismo neonatal transitório, resultante da passagem destes anticorpos da mãe com esta doença para o feto<sup>230</sup>.

## **TIROGLOBULINA**

A tiroglobulina é uma glicoproteína, armazenada na glândula tiroide, que funciona como uma pró-hormona na síntese da T4 e da T3. A libertação de T4 e T3 na circulação acontece quando as proteases dos lisossomas separam a T4 e a T3 da tiroglobulina<sup>231</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de tiroglobulina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>231</sup>.
- Limitações/interferências: Podem ocorrer interferências em amostras que contenham anticorpos heterófilos e elevados níveis de biotina. Também as amostras que contenham anticorpos anti-tiroglobulina estão suscetíveis a produzir resultados erróneos (falsamente elevados), de modo que todas as amostras devem ser rastreadas para estes anticorpos e as amostras que resultarem positivas devem ser interpretadas tendo isso em conta<sup>231</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A tiroglobulina pode aparecer elevada em diversos distúrbios que provocam a destruição do tecido da tiroide, como é o caso da tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, adenoma da tiroide, tiroidite subaguda e carcinoma da tiroide<sup>231</sup>.

Por outro lado, e tendo em conta que a tiroglobulina apenas é encontrada na tiroide, a concentração sérica desta pró-hormona diminuirá para níveis muito baixos após uma tiroidectomia total ou subtotal ou outra terapêutica bem-sucedida do tecido cancerígeno da tiroide. Nestes casos, um aumento dos níveis séricos de tiroglobulina poderá significar reincidência da doença<sup>231</sup>.

## ANTICORPO ANTI-TIROGLOBULINA

Os anticorpos anti-tiroglobulina são autoanticorpos que podem estar presentes em indivíduos com doenças autoimunes da tiroide<sup>232</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis séricos de anticorpos anti-tiroglobulina é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>232</sup>.
- Limitações/interferências: Este ensaio é sensível a interferência de elevados níveis de biotina, assim como, a presença de anticorpos heterófilos na amostra<sup>232</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: Estes autoanticorpos podem ser detetados em indivíduos com doença de Graves, mas são mais prevalentes em indivíduos com tiroidite de Hashimoto<sup>232</sup>.

## ANTICORPO ANTI-PEROXIDASE TIROIDEIA

A peroxidase tiroideia é uma glicoproteína de membrana, presente somente nos tirócitos (células epiteliais foliculares secretoras). Esta enzima catalisa as reações de oxidação do iodeto em resíduos de tirosina, contidos na tiroglobulina, importantes para a síntese de T3 e T4. A peroxidase tiroideia é um dos antigénios mais importantes da glândula tiroide, o que faz com que possam ocorrer mecanismos autoimunes com produção de autoanticorpos anti-peroxidase tiroideia (TPOAb)<sup>233</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis séricos de TPOAb é feita por ensaio imunenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>233</sup>.
- Limitações/interferências: Neste imunoenensaio existe a possibilidade de interferência de anticorpos heterófilos contidos na amostra<sup>233</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A determinação dos níveis de TPOAb é, atualmente, o teste mais sensível para a deteção de doenças autoimunes da tiroide<sup>233</sup>.

São observados níveis elevados destes autoanticorpos em indivíduos com tiroidite de Hashimoto ou com doença de Graves. No entanto, podem também ser encontrados níveis aumentados de TPOAb em indivíduos com doenças autoimunes não tiroideias, como a anemia perniciosa, a diabetes *mellitus* do tipo I ou outras patologias que ativam o sistema imunitário<sup>233</sup>.

Assim, a detecção de TPOAb é utilizada como um parâmetro auxiliar no diagnóstico dos distúrbios autoimunes da tiroide e permite que o clínico consiga distinguir entre distúrbios autoimunes da tiroide e bócio ou hipotireoidismo não autoimune<sup>233</sup>.

## CALCITONINA

A calcitonina é uma hormona polipeptídica produzida pelas células parafoliculares (células C) da tiroide. A sua principal função é a redução do cálcio em circulação, sendo por isso um antagonista dos efeitos da PTH, e participa no metabolismo fosfo-cálcico. A secreção de calcitonina é estimulada pelo aumento do cálcio sérico, gastrina e pentagastrina, o que faz com que iniba a atividade dos osteoclastos nos ossos e a reabsorção de cálcio e fosfato pelas células do túbulo renal, permitindo a sua excreção na urina<sup>234</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de calcitonina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>234</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras de indivíduos que tenham anticorpos humanos anti-rato em concentrações elevadas podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos. Também a contaminação bacteriana ou a inativação de calor das amostras podem afetar os resultados deste ensaio<sup>234</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A calcitonina pode ser usada para diagnóstico como um marcador tumoral do cancro medular da tiroide, pois níveis elevados desta hormona estão presentes em indivíduos com esta patologia. Este marcador pode ainda ser usado em amostras de biópsia de lesões suspeitas para avaliar se são metástases do cancro original. No entanto, concentrações aumentadas de calcitonina também podem indicar outras doenças, tais como hiperplasia das células C e outras neoplasias não tiroidianas, insuficiência renal aguda e crónica, hipercalcemia, hipergastrinemia e outros distúrbios gastrointestinais e doença pulmonar<sup>234</sup>.

#### 4.4.4. Análises Endocrinologia

##### HORMONA LUTEINIZANTE E HORMONA FOLÍCULO-ESTIMULANTE

A hormona luteinizante (LH) e a hormona folículo-estimulante (FSH) são hormonas compostas por duas subunidades glicoproteicas denominadas alfa e beta, sendo que a primeira apresenta estrutura similar às restantes gonadotrofinas (hCG e TSH) e a segunda tem uma estrutura específica de cada uma destas hormonas, contribuindo para a sua especificidade fisiológica e imunológica. A LH e FSH são produzidas pelas células gonadotrópicas do lobo anterior da hipófise e segregadas de forma pulsátil em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH), segregada pelo hipotálamo<sup>235,236</sup>.

Nas mulheres, a libertação de LH e FSH estimula a maturação final do folículo, a rutura folicular e, conseqüentemente, a ovulação. Nos homens, a LH é responsável pela estimulação das células intersticiais (ou células de Leydig) para a produção de testosterona<sup>235</sup>, enquanto que a FSH estimula a espermatogénese, através de recetores nas células de Sertoli, presentes nos túbulos seminíferos dos testículos<sup>236</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa das concentrações de LH e FSH no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>235,236</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras de indivíduos que estejam regularmente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem conter anticorpos, que interferem com os imunoensaios<sup>235,236</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: Normalmente, as concentrações de LH e FSH são determinadas para auxiliar no diagnóstico de distúrbios menstruais, infertilidade ou de problemas de desenvolvimento puberal<sup>235,236</sup>.

Nas mulheres, concentrações baixas de LH e FSH podem indicar uma insuficiência pituitária ou uso de contraceptivos orais, enquanto que concentrações elevadas destas hormonas estão associadas a hipogonadismo, provocado por menopausa, ooforectomia (remoção dos ovários), síndrome ovárica prematura ou síndrome de Turner. Por outro lado, a razão LH/FSH tem sido bastante utilizada para ajudar no diagnóstico da síndrome do ovário poliquístico<sup>235,236</sup>.

Nos homens, concentrações elevadas de LH e FSH podem indicar insuficiência testicular ou anorquia, quando associadas a hipogonadismo, mas também insuficiência nas células de Sertoli, originando a síndrome de Klinefelter<sup>235,236</sup>.

## **ESTRADIOL**

O estradiol é um estrogênio natural e a principal hormona sexual feminina, importante na regulação do ciclo menstrual. Em mulheres não grávidas, o estradiol é segregado pelos ovários e pelo corpo lúteo, no entanto, este também pode ser produzido, em quantidades mínimas, pelas glândulas suprarrenais e, nos homens, pelos testículos. As concentrações de estradiol em circulação variam ao longo do ciclo menstrual feminino, aumentando antes da ovulação e diminuindo à medida que os níveis de LH aumentam. As concentrações desta hormona voltam a aumentar durante a fase de crescimento endometrial, juntamente com os níveis de progesterona<sup>237</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de estradiol no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo competitivo<sup>237</sup>.
- Limitações/interferências: A presença de anticorpos heterófilos, fator reumatoide, fosfatase alcalina endógena, fibrina e proteínas capazes de se ligarem à fosfatase alcalina, pode gerar interferências com os resultados do ensaio<sup>237</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: Os níveis de estradiol são, normalmente, utilizados para avaliar o estado de maturação folicular em mulheres e têm sido fundamentais para a avaliação do desenvolvimento sexual em crianças, da anovulação e/ou amenorreia, da síndrome do ovário poliquístico, das causas de infertilidade e menopausa, mas também para a monitorização do processo de fertilização *in vitro*<sup>237</sup>.

Por outro lado, nos homens, a presença de concentrações de estradiol elevadas é indicativa de síndromes de feminização, como a ginecomastia<sup>237</sup>.

## **PROGESTERONA**

A progesterona é uma hormona esteroide produzida em baixas quantidades pelo córtex suprarrenal, tanto dos homens como das mulheres. Nas mulheres, esta hormona é produzida principalmente pelo corpo lúteo, durante o ciclo menstrual, e pela placenta, durante a gravidez<sup>238</sup>. O principal sítio de ação da progesterona, durante a fase lútea, é o útero, preparando-o para a implantação e suporte do desenvolvimento fetal, através do aumento do leito vascular e redução da atividade do miométrio. Durante a gravidez, a progesterona é necessária para a manutenção da placenta<sup>239</sup>.

A progesterona tem um papel importante em todo o organismo, pois para além de hormona, também é o precursor dos estrogénios, androgénios e dos esteroides adrenocorticais<sup>238</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de progesterona no soro é feita por ensaio imunoenzimático de ligação competitiva com deteção por quimioluminescência<sup>238</sup>.
- Limitações/interferências: Existe a possibilidade de interferência no ensaio quando amostras contêm anticorpos heterófilos<sup>238</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: De um modo geral, o aumento da concentração de progesterona indica que a mulher se encontra na fase lútea do ciclo ovárico ou poderá ainda indicar gravidez. Durante a gravidez, as concentrações séricas desta hormona mantêm-se relativamente constantes até à oitava semana de gestação, pelo que, valores diminuídos de progesterona neste período podem significar complicações. Os níveis séricos de progesterona (reduzidos), juntamente com os níveis séricos de LH (reduzidos), são importantes para o diagnóstico de disfunção da fase lútea após a ovulação<sup>238</sup>.

### **17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA**

A progesterona pode ainda ser sintetizada em 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona ou androstenediona. A 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona é uma hormona esteroide que funciona como intermediário químico na biossíntese de outros esteroides endógenos, incluindo androgénios, estrogénios, glucocorticoides, mineralocorticoides e neurosteroides<sup>239</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona no soro é feita por ensaio imunoenzimático competitivo com deteção por quimioluminescência<sup>239</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos anti-rato, com contaminação bacteriana ou inativadas pelo calor podem produzir resultados falsamente elevados ou reduzidos<sup>239</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A determinação de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona é importante para a avaliação de indivíduos com hiperplasia adrenal congénita, pois as hidroxilases produzidas são disfuncionais, levando a uma acumulação desta hormona em circulação. Por outro lado, a determinação de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona também é usada para a avaliação da atividade do

corpo lúteo durante a gravidez, uma vez que, a progesterona também é produzida pela placenta e, por isso, não é um bom indicador<sup>239</sup>.

## **TESTOSTERONA (TOTAL E LIVRE)**

A testosterona é uma hormona esteroide, sintetizada a partir do colesterol<sup>240</sup> e segregada, maioritariamente, pelas células de Leydig ou intersticiais dos testículos do homem<sup>241</sup> e, em menores quantidades, pelos ovários da mulher ou pelas glândulas suprarrenais em ambos os géneros<sup>240</sup>. A quantidade de testosterona sintetizada é regulada e controlada pela ação da LH<sup>241</sup> e é fundamental para o desenvolvimento dos órgãos do sistema reprodutor masculino, como os testículos e a próstata, e na manifestação de características sexuais secundárias, como aumento das massas muscular e óssea e o crescimento de pelos corporais<sup>240</sup>.

Assim como outras hormonas, a testosterona pode ser encontrada em maior quantidade ligada a proteínas ou na forma livre, que é a forma biologicamente ativa<sup>241</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: As determinações quantitativas de testosterona total e livre no soro são feitas por ensaio imunoenzimático competitivo com deteção por quimioluminescência<sup>240,241</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contêm anticorpos humanos anti-rato ou que apresentem contaminação bacteriana e inativação pelo calor podem originar valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>240,241</sup>. Para além disso, para determinação de testosterona total não devem ser utilizadas amostras de indivíduos a receber tratamento com 19-nortestosterona (Nandrolona)<sup>240</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI® 800* da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: Níveis reduzidos de testosterona em homens podem provocar fragilidade e perda óssea, enquanto que níveis aumentados estão presentes em homens com hipergonadismo ou hiperpituitarismo, e em mulheres com hirsutismo, distúrbios menstruais e síndrome do ovário poliquístico. A determinação das concentrações desta hormona é ainda útil na caracterização e acompanhamento de alguns tipos de cancro, como o testicular, da mama, do ovário e tumores adrenais<sup>240</sup>.

Como referido, a maioria da testosterona em circulação está ligada a proteínas, principalmente, à globulina de ligação de hormonas sexuais (SHBG) e à albumina<sup>240</sup>, pelo que a determinação dos níveis de testosterona livre é um bom auxiliar de diagnóstico de hipogonadismo, quando os níveis de testosterona total não correspondem à apresentação clínica. Para além disso, a determinação das concentrações de testosterona livre em circulação

é útil para a medição indireta dos níveis de SHBG, assim como, na monitorização da doença de Alzheimer e em idosos<sup>241</sup>.

## **HORMONA ANTI-MÜLLERIANA**

A hormona anti-Mülleriana é uma glicoproteína que desempenha um papel importante na determinação e diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário<sup>242</sup>.

Nos homens, esta hormona é sintetizada nas células de Sertoli, nos testículos, a partir da quinta semana de desenvolvimento embrionário, sendo fundamental para a regressão dos ductos müllerianos, responsáveis pela formação dos órgãos sexuais femininos. Os níveis séricos desta hormona diminuem após a puberdade e mantêm-se em circulação com concentrações baixas<sup>242</sup>.

Nas mulheres, a hormona anti-Mülleriana é produzida pelas células granulosas do ovário e aparece pela primeira vez na trigésima sexta semana de gestação. Após a puberdade, com o início do ciclo menstrual, esta hormona diminui lentamente os seus níveis em circulação até se tornar indetetável com o aparecimento da menopausa<sup>242</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa da hormona anti-Mülleriana no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>242</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras hemolisadas ou que contenham anticorpos heterófilos podem originar interferências durante o ensaio<sup>242</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: Para além da avaliação do estado de maturação sexual, a determinação da hormona anti-Mülleriana é utilizada para estudos de fertilidade como, por exemplo, para avaliação das reservas de óvulos, pois é uma hormona envolvida na foliculogénese e não apresenta flutuações durante o ciclo menstrual<sup>242</sup>.

## **PROLACTINA**

A prolactina é uma hormona segregada pelas células da hipófise em resposta ao estímulo efetuado pela serotonina ou pela TRH, produzidas no hipotálamo. Em indivíduos saudáveis, esta secreção varia consoante as horas do dia, sendo superior à noite<sup>243</sup>.

Na mulher, a prolactina é uma hormona necessária ao desenvolvimento mamário e, em casos de gravidez, estimula e mantém a secreção láctea<sup>243</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação quantitativa das concentrações séricas de prolactina é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>243</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras de indivíduos que estão permanentemente em contacto com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia podem produzir anticorpos que interferem com o imunoensaio<sup>243</sup>.
  - Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
  - Interpretação clínica: Nos indivíduos saudáveis, as concentrações de prolactina em circulação aumentam em resposta a estímulos fisiológicos, como o sono, exercício físico, estimulação dos mamilos, relações sexuais, hipoglicemia, gravidez e stress cirúrgico. No entanto, concentrações bastante elevadas de prolactina podem estar relacionadas com infertilidade feminina, impotência e infertilidade masculina, devido à inibição da produção de esteroides, mas também podem ser provocadas por hipotireoidismo primário, cancro da hipófise e patologias funcionais e orgânicas do hipotálamo. Também o uso de alguns medicamentos pode provocar um aumento ou diminuição das concentrações séricas de prolactina<sup>243</sup>.

## **β-HCG TOTAL**

A gonadotropina coriônica humana (hCG) é uma hormona, produzida pela placenta, com estrutura similar às hormonas da hipófise FSH, TSH e LH. Estas hormonas podem ser estruturalmente divididas em: subunidade  $\alpha$ , comum a todas, e subunidade  $\beta$ , diferente de hormona para hormona, que confere especificidade imunológica e biológica<sup>244</sup>.

Na gravidez, pouco depois da implantação do ovo na parede do útero, o trofoblasto começa a produzir hCG, de forma a manter as secreções de esteroides do corpo lúteo até que seja a placenta a fazê-lo, o que torna esta hormona um excelente indicador de gravidez<sup>244</sup>.

- Amostra: Soro ou plasma.
- Condições de colheita: A amostra de plasma deve ser obtida através do uso de heparina de lítio como anticoagulante<sup>244</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de  $\beta$ -hCG total no plasma/soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>244</sup>.
- Limitações/interferências: Neste ensaio existe a possibilidade de interferência de anticorpos heterófilos contidos na amostra, assim como, fator reumatoide, fosfatase alcalina endógena, fibrina e proteínas com capacidade de fixação à fosfatase alcalina<sup>244</sup>.
- Equipamento: *ACCESS 2* da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: Este ensaio é utilizado como um auxiliar na detecção precoce da gravidez. Em gestações normais, a hCG pode ser detetada após a implantação, ou seja, sete a nove dias após a concepção, sendo que as concentrações desta hormona duplicam a cada dois a três dias nas primeiras seis semanas. Até ao fim do primeiro trimestre é visível um aumento gradual da concentração de hCG, no entanto, terminado esse período os níveis diminuem durante o tempo restante da gravidez até voltarem a ser indetetáveis após o parto. Níveis invulgarmente baixos ou com uma diminuição drástica podem indicar uma gravidez ectópica ou um aborto espontâneo iminente<sup>244</sup>.

A concentração de  $\beta$ -hCG pode também ser utilizada em testes de rastreio pré-natal, juntamente com concentrações de AFP, estriol não conjugado e inibina A, para avaliação do risco de síndrome de Down. Nos casos de risco elevado de trissomia 21, os valores de  $\beta$ -hCG no soro materno, medidos entre a décima quinta e a vigésima segunda semana de gravidez encontram-se, muitas vezes, mais altos do que numa gravidez não afetada por esta condição<sup>244</sup>.

Por outro lado, a hCG pode ser detetada em mulheres que estejam em peri e pós-menopausa, assim como, em mulheres com neoplasias trofoblástica ou não-trofoblástica, pelo que os resultados devem ser sempre apoiados por quadro clínico, anamnese ou outros exames<sup>244</sup>.

## INSULINA

A insulina é uma hormona, produzida pelas células  $\beta$  do pâncreas, que regula a absorção e a utilização da glucose pelas células. Sempre que ocorre um aumento da concentração de glucose em circulação é estimulada a secreção de insulina e, conseqüentemente, a absorção de glucose nos tecidos e inibição da divisão de glicogénio no fígado. Para além disso, esta hormona também é importante na regulação da síntese proteica e no armazenamento dos triglicéridos<sup>245</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de insulina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>245</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos heterófilos, assim como, anticorpos anti-insulina podem interferir com o ensaio<sup>245</sup>.
- Equipamento: UNICEL Dxi da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A determinação dos níveis séricos de insulina é importante no diagnóstico de diabetes *mellitus*. Esta doença é caracterizada por uma hiperglicemia crónica, devido a uma inadequada absorção de glucose pelos tecidos. A diabetes pode ser dividida em

duas categorias distintas, consoante a secreção de insulina: Tipo I e Tipo II. A diabetes *mellitus* tipo I, ou insulino dependente, é causada pela destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas, o que provoca uma diminuição gradual da secreção de insulina à medida que as células são destruídas. Nestes casos, para sobreviver, o doente deve ser submetido a terapia com insulina. No caso da diabetes *mellitus* tipo II, ou não insulino dependente, as células dos tecidos têm uma resistência à atuação da insulina, o que provoca uma resposta lenta ou insuficiente quando ocorre uma hiperglicemia. Os níveis de insulina em circulação em doentes com diabetes *mellitus* tipo II é normal ou ligeiramente elevada<sup>245</sup>.

Para além do diagnóstico de diabetes *mellitus*, a medição dos níveis de insulina é utilizada para a monitorização de indivíduos tratados com insulina ou para o diagnóstico de insulinoma, um tumor das células  $\beta$  do pâncreas e que pode causar um estado de hiperinsulinismo e, conseqüentemente, uma hipoglicemia<sup>245</sup>.

#### **ANTICORPOS ANTI-INSULINA (IAA)**

Os anticorpos anti-insulina, são autoanticorpos pertencentes à classe IgG que são dirigidos contra as células  $\beta$  do pâncreas estando, normalmente, presentes em indivíduos com diabetes *mellitus* a receber tratamento com insulina<sup>246</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos autoanticorpos anti-insulina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>246</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras que contenham anticorpos anti-rato ou que se apresentem com contaminação bacteriana ou inativadas pelo calor podem provocar interferências no ensaio<sup>246</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: Os anticorpos anti-insulina são, normalmente, detetados em indivíduos com predisposição para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* do tipo I, ainda assintomáticos. A presença destes autoanticorpos evidencia uma doença autoimune e a sua quantificação pode ser útil para auxiliar o clínico na previsão, diagnóstico e tratamento de indivíduos com diabetes *mellitus*<sup>246</sup>.

## ANTICORPO ANTI-DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO

A descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) é uma enzima que está envolvida na síntese do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA)<sup>247</sup>. Para além dos neurónios, o GABA também é produzido nas células  $\beta$  do pâncreas, que o secretam juntamente com a insulina. O GABA secretado liga-se aos recetores GABA nas células  $\alpha$  do pâncreas, inibindo a secreção da hormona glucagon, de modo a potenciar a ação da insulina.

O anticorpo anti-GAD é o principal autoanticorpo encontrado nas ilhotas pancreáticas e é um importante marcador sorológico de predisposição para diabetes *mellitus* tipo I<sup>247</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa do anticorpo anti-GAD no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>247</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras com contaminação bacteriana, inativadas pelo calor ou com anticorpos anti-rato podem originar resultados errados devido a interferências com o ensaio<sup>247</sup>.
- Equipamento: MAGLUMI® 800 da SNIBE DIAGNOSTICS.
- Interpretação clínica: A maior parte dos indivíduos diagnosticados com diabetes *mellitus* tipo I apresenta anticorpos anti-GAD. Estes autoanticorpos são muitas vezes detetados antes do início clínico da doença, pelo que se torna um marcador preditivo para a progressão de diabetes autoimune, como é o caso da diabetes *mellitus* tipo I. Para além disso, os anticorpos anti-GAD estão presentes em quantidade elevada numa variedade de distúrbios neurológicos autoimunes, como a síndrome da pessoa rígida, uma condição que causa rigidez e espasmos musculares progressivos, principalmente dos membros<sup>247</sup>.

## PÉPTIDO C

O péptido C, como o próprio nome indica, é um polipéptido que resulta da clivagem da molécula de pró-insulina para a obtenção de insulina, aquando da biossíntese desta molécula. Após este processo, o peptídeo C e a insulina são armazenados em grânulos secretores das células  $\beta$  do pâncreas e ambos são libertados para a circulação portal em resposta a uma hiperglicemia<sup>248</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de péptido C no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>248</sup>.

- Limitações/interferências: Podem ocorrer interferências em amostras que contenham anticorpos heterófilos<sup>248</sup>.

- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.

- Interpretação clínica: A determinação dos níveis séricos de péptido C é um bom auxiliar na avaliação da quantidade de produção de insulina pelo organismo, uma vez que é segregado em quantidades equimolares à insulina. Muitas das vezes, são medidas as concentrações de péptido C ao invés dos níveis de insulina, pois essa determinação não sofre interferências da insulina exógena. Esta determinação é fundamental nos casos de diabetes *mellitus*, pois ajuda a esclarecer o tipo de diabetes presente. Normalmente, níveis muito baixos de péptido C, juntamente com hiperglicemia, confirmam um diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo I, enquanto que níveis elevados ou normais deste péptido, juntamente com uma hiperglicemia, podem indicar a presença de diabetes *mellitus* tipo II<sup>248</sup>.

Contudo, é necessário ter em conta que a ingestão de alimentos ou o tratamento com medicamentos estimulantes das células  $\beta$  aumentam a secreção de peptídeo C e o jejum e alguns medicamentos que contenham substâncias inibidoras das células  $\beta$ , diminuem os níveis de peptídeo C. Todos estes fatores devem ser tidos em conta para a interpretação correta dos resultados<sup>248</sup>.

## **GASTRINA**

A gastrina é uma hormona peptídica que estimula a secreção do ácido gástrico (HCl) pelas células parietais do estômago e facilita a motilidade gástrica. A gastrina pode ser produzida por uma variedade de células do corpo, no entanto, a gastrina com atividade biológica é, predominantemente, produzida pelas células G da mucosa antral do estômago em resposta à presença de aminoácidos, amins alimentares e cálcio<sup>249</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação quantitativa de gastrina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>249</sup>.

- Limitações/interferências: As amostras que contenham anticorpos anti-rato ou que estejam contaminadas podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>249</sup>.

- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.

- Interpretação clínica: A determinação de gastrina é utilizada para diagnóstico de gastrinoma, um tumor endócrino que surge a partir das células das ilhotas, no pâncreas, ou das células produtoras de gastrina, no duodeno. O gastrinoma é um tumor produtor de gastrina que,

consequentemente, leva a uma hipersecreção ácida, originando úlceras pépticas, sinais e sintomas característicos da síndrome de Zollinger-Ellison<sup>250</sup>.

A hipergastrinemia também pode ser encontrada noutras doenças como a gastrite atrófica, anemia perniciosa, dispepsia, úlcera gástrica e duodenal e carcinoma gástrico. Contudo, nestas situações, as concentrações séricas de gastrina não atingem valores tão elevados quanto na síndrome de Zollinger-Ellison<sup>250</sup>.

## **ALDOSTERONA**

A aldosterona é uma hormona da família dos mineralocorticoides produzida no córtex da glândula suprarrenal em resposta ao estímulo da hormona angiotensina. A aldosterona desempenha um papel fundamental na regulação do sódio e do potássio e, consequentemente, na regulação da pressão arterial. Isto acontece devido ao sistema renina-angiotensina, do qual a aldosterona faz parte, que faz com que a aldosterona atue nos recetores mineralocorticoides, nos túbulos distais do nefrónio, de forma a promover uma reabsorção de sódio e excreção do potássio para que se mantenha o equilíbrio eletrolítico do organismo<sup>251</sup>.

- Amostra: Soro e urina (vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação quantitativa de aldosterona no soro e na urina é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo competitivo<sup>251</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras contaminadas com bactérias, inativadas pelo calor ou que contenham anticorpos anti-rato podem dar origem a valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>251</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A determinação dos níveis séricos de aldosterona é um bom auxiliar para o diagnóstico ou monitorização da terapêutica de indivíduos com doenças cardiovasculares e renais.

Concentrações elevadas de aldosterona em circulação estão, normalmente, presentes no hiperaldosteronismo primário. Esta patologia está associada a uma produção excessiva de aldosterona pela glândula suprarrenal devido a hiperplasia, adenoma ou carcinoma e resulta em hipertensão arterial associada a hipocaliemia. Por outro lado, também no hiperaldosteronismo secundário podem ser encontradas concentrações elevadas de aldosterona em circulação, no entanto, a produção desta hormona é provocada por uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina, devido a uma hipovolemia renal<sup>251</sup>.

Concentrações diminuídas de aldosterona indicam insuficiência suprarrenal, mas também existem fármacos que interferem com a secreção ou ação da aldosterona, usados como hipertensivos. Estes fármacos reduzem a pressão arterial pelo bloqueio da enzima conversora de angiotensina, descrita no subcapítulo 4.3.2. *Análises Bioquímica*, levando à diminuição da secreção de aldosterona<sup>251</sup>.

## **RENINA**

A renina é uma protease produzida pelas células justaglomerulares do aparelho justaglomerular dos rins em resposta à diminuição do volume sanguíneo e da pressão arterial ou à baixa concentração de sódio no organismo<sup>252</sup>.

A renina ativa o sistema renina-angiotensina, através da clivagem do angiotensinogénio em angiotensina I (inativa). Por sua vez, a angiotensina I, no epitélio vascular do pulmão, é convertida em angiotensina II (ativa), uma hormona capaz de provocar vasoconstrição, pelo estímulo do sistema nervoso central, e de estimular a secreção das hormonas antidiurética e aldosterona pela glândula suprarrenal. O sistema renina-angiotensina torna-se fundamental na regulação da pressão arterial e da filtração glomerular renal<sup>252</sup>.

- Amostra: Plasma.
- Condições de colheita: A amostra de plasma deve ser obtida por colheita de sangue venoso para tubo contendo EDTA como anticoagulante. Deve ser indicada a hora do dia na qual foi feita a colheita<sup>252</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de renina em amostras de plasma é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>252</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos anti-rato, que sofram inativação pelo calor ou contaminadas com flora microbiana podem originar interferências nos resultados<sup>252</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A determinação dos níveis de renina é um complemento à determinação dos níveis de aldosterona para o diagnóstico ou monitorização da terapêutica de indivíduos com doenças cardiovasculares e renais<sup>252</sup>.

Normalmente, no hiperaldosteronismo primário os valores de renina são normais ou reduzidos, enquanto que no hiperaldosteronismo secundário, as concentrações de renina encontram-se aumentadas<sup>252</sup>.

Existem ainda outras síndromes mais raras onde a determinação de renina e aldosterona pode ser importante para o seu diagnóstico. A síndrome de Liddle resulta de uma atividade aumentada dos canais epiteliais de sódio e cursa com concentrações de renina e aldosterona diminuídos. A síndrome de Bartter e a síndrome de Gitelman, resultam de alterações na parte ascendente da ansa de Henle e no túbulo distal, respetivamente, o que provoca uma deficiente reabsorção de sódio. Em indivíduos com pseudo-hipoaldosteronismo tipo I, onde ocorre uma reabsorção excessiva de potássio pelo rim, são encontrados valores de renina e aldosterona reduzidos. Apesar de diferentes concentrações de renina e aldosterona, todas estas doenças levam a problemas de hipertensão<sup>252</sup>.

## **HORMONA ADRENOCORTICOTRÓFICA**

A hormona adrenocorticotrófica (ACTH) é uma hormona produzida e secretada pela hipófise anterior, em resposta ao estímulo da hormona libertadora de corticotrofina (CRH). A sua principal função é estimular a produção e secreção de cortisol e outras hormonas esteroides das células do córtex da glândula suprarrenal<sup>253</sup>.

- Amostra: Plasma.
- Condições de colheita: A amostra de sangue venoso deve ser colhida em tubo de EDTA para a obtenção de plasma<sup>253</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de ACTH em amostras de plasma é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>253</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos anti-rato, contaminadas ou inativadas pelo calor podem originar resultados falsamente elevados ou diminuídos<sup>253</sup>.
- Equipamento: MAGLUMI® 800 da SNIBE DIAGNOSTICS.
- Interpretação clínica: Concentrações séricas reduzidas de ACTH são encontradas em indivíduos com insuficiência adrenal secundária, provocada por um comprometimento da hipófise, ou com insuficiência adrenal terciária, originada por uma diminuição da libertação de CRH pelo hipotálamo. Por outro lado, concentrações séricas elevadas de ACTH estão presentes em indivíduos com insuficiência adrenal primária, também conhecida como doença de Addison, devido a um comprometimento da glândula suprarrenal com consequente perda de produção de cortisol. Níveis elevados desta hormona também podem ser encontrados em indivíduos com síndrome de Cushing, provocada por um tumor hipofisário produtor de ACTH<sup>253</sup>.

## CORTISOL

O cortisol é uma hormona produzida e segregada pelo córtex das glândulas suprarrenais em resposta ao estímulo da ACTH. O cortisol é metabolizado no fígado, dando origem a vários metabolitos importantes numa variedade de processos, como o metabolismo das proteínas, das gorduras e dos carboidratos, a manutenção da integridade muscular, especialmente, do miocárdio, e na supressão das atividades inflamatórias e alérgicas. No entanto, a regulação neuroendócrina do córtex suprarrenal e, conseqüentemente, a produção de cortisol, pode ser influenciada pelo ritmo circadiano e situações de stress biológico como, por exemplo, febre, psicose ou trauma<sup>254</sup>.

- Amostra: Soro e urina a tempo determinado (vinte e quatro horas).
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de cortisol no soro e na urina é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo competitivo<sup>254</sup>.
- Limitações/interferências: Podem ocorrer interferências no ensaio quando as amostras contêm anticorpos heterófilos. Neste ensaio, ocorre reatividade cruzada com prednisolona (corticosteroide) que faz com que os níveis de cortisol fiquem elevados<sup>254</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A alteração dos níveis séricos de cortisol pode ser causada por disfunções hipotalâmicas, pituitárias ou suprarrenais, que se não forem tratados podem provocar desequilíbrios metabólicos graves para o indivíduo. Concentrações elevadas desta hormona, tanto no soro, como na urina (fator diagnóstico), são encontrados na síndrome de Cushing, devido à hiperfunção cortical suprarrenal provocada pelos níveis elevados de ACTH. Por outro lado, concentrações reduzidas estão presentes em indivíduos com doença de Addison devido a uma insuficiência cortical suprarrenal causada, normalmente, por infecção aguda, trauma ou cirurgia. Níveis baixos de cortisol no soro podem ainda ser encontrados em mulheres grávidas ou submetidas a terapias hormonais<sup>254</sup>.

## DHEA

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é uma hormona esteroide produzida, principalmente, pelas glândulas suprarrenais por ação da ACTH, mas também pelas gónadas, pela ação de GnRH, e pelo cérebro. Esta hormona é um intermediário metabólico da síntese dos esteroides sexuais (androgénios e estrogénios) e, juntamente com eles, é a responsável pelo crescimento dos pelos púbicos e axilares, odor corporal, aumento da oleosidade da pele e cabelo e acne leve, durante a adrenarca<sup>255</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de DHEA em soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo competitivo<sup>255</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras contaminadas, inativadas pelo calor ou com anticorpos anti-rato podem originar resultados errados devido a interferências<sup>255</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: A variação fisiológica da DHEA começa com um aumento das suas concentrações séricas antes da puberdade, atingindo o pico aos vinte anos, e diminui ao longo da vida, até atingir os níveis pré-puberdade. Como é uma hormona produzida no córtex das glândulas suprarrenais, a DHEA é um marcador útil para avaliação da síntese de androgénios nesse órgão. Assim, concentrações diminuídas desta hormona podem indicar insuficiência da glândula adrenal, enquanto que concentrações séricas elevadas são encontradas numa vasta gama de doenças, tais como, carcinoma cortical adrenal, tumores com produção ectópica de ACTH, hirsutismo, hiperplasia adrenal congénita e síndrome de Cushing<sup>255</sup>.

## **PARATORMONA**

A paratormona (PTH), como o próprio nome indica, é uma hormona sintetizada pelas células das glândulas da paratiroide, importante na manutenção da homeostase do cálcio.

A secreção da PTH é estimulada em resposta a concentrações muito baixas de cálcio ionizado em circulação e a regulação dos níveis de cálcio é feita através do efeito combinado entre o sistema ósseo, a mucosa intestinal e os rins. O efeito da PTH na absorção de cálcio pela mucosa intestinal é indireto, através da estimulação da produção de um metabolito ativo da vitamina D, enquanto que nos rins estimula a reabsorção de cálcio e inibe a reabsorção de fosfato pelos túbulos renais. Por fim, a PTH promove a reabsorção de tecido ósseo pelos osteoclastos e a consequente libertação de cálcio e fosfato<sup>256</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa da concentração de PTH no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>256</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A medição dos níveis de PTH em circulação pode ser um auxiliar no diagnóstico de doentes com distúrbios do metabolismo do cálcio<sup>256</sup>.

Níveis elevados de PTH no soro são encontrados em indivíduos com hipercalcemia, provocada por hiperparatiroidismo primário ou secreção ectópica de PTH (pseudo-

hiperparatiroidismo). No entanto, a hipercalcemia também pode ser provocada por um tumor na paratiroide o que faz com os níveis de PTH se encontrem diminuídos<sup>256</sup>.

Por outro lado, o hiperparatiroidismo secundário é o resultado de um funcionamento excessivo das glândulas da paratiroide para compensar uma hipocalcemia ou uma resistência periférica à PTH. Normalmente, este distúrbio é causado por insuficiência renal e resulta num aumento da concentração de PTH<sup>256</sup>.

A secreção insuficiente ou inexistente de PTH ocorre em indivíduos com hipoparatiroidismo, resultante de uma paratiroidectomia ou tiroidectomia<sup>256</sup>.

## **FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA**

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida em diversos órgãos, como os ossos, fígado, rins, intestino e placenta. A isoforma óssea é encontrada na membrana plasmática dos osteoblastos e está envolvida no processo de formação e mineralização do osso<sup>257</sup>.

O osso é um tecido dinâmico estando permanentemente em remodelação. Desse processo fazem parte a formação e reabsorção ósseas, passos executados por células ósseas denominadas de osteoblastos e osteoclastos, respetivamente. Apesar de serem processos independentes, a formação e reabsorção óssea devem estar estreitamente ligados de modo a manter competência bioquímica do esqueleto, conferindo organização, forma e força ao osso<sup>257</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A medição quantitativa da fosfatase alcalina óssea no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente<sup>257</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos heterófilos ou níveis elevados de ALP podem causar interferências nos resultados do ensaio<sup>257</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A medição das concentrações séricas da fosfatase alcalina óssea é uma ferramenta útil para diagnóstico e monitorização de indivíduos com doença de Paget, osteomalacia, hiperparatiroidismo primário, osteodistrofia renal, osteoporose e metástase óssea. A determinação da gravidade da doença óssea e as respostas à terapia implicam uma avaliação precisa do metabolismo ósseo, o que implica a determinação de marcadores mais específicos<sup>257</sup>.

## **VITAMINA D**

A vitamina D é uma hormona esteroide que pode ser encontrada em duas formas primárias: vitamina D3 (colecalciferol), produzida na pele devido à ação da luz solar; e vitamina D2 (ergocalciferol), adquirida a partir de fontes dietéticas. Estes dois tipos de vitamina D são

biologicamente inativos, pelo que têm de passar por dois processos de hidroxilação, um no fígado (25-hidroxivitamina D) e outro no rim (1,25-di-hidroxivitamina D), para que possam desempenhar a sua função. Apenas a 25-hidroxivitamina D é encontrada em circulação, por isso, a sua medição deve ser considerada para refletir as entradas de vitamina D a partir da dieta ou da síntese cutânea<sup>258</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis totais de 25-hidroxivitamina D no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo competitivo<sup>258</sup>.
- Limitações/interferências: Podem existir interferências nos ensaios quando utilizadas amostras que contenham anticorpos heterófilos, fator reumatoide, fosfatase alcalina endógena, fibrina e proteínas com capacidade de fixação à fosfatase alcalina<sup>258</sup>.
- Equipamento: UNICEL DxI da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: A hidroxilação da vitamina D a nível renal é regulada pelos níveis plasmáticos de PTH, fósforo e cálcio. Assim, uma deficiência de vitamina D pode originar hiperparatiroidismo secundário, aumento do metabolismo ósseo e conseqüente aumento do risco de desenvolver osteoporose. Por outro lado, quando os níveis de vitamina D indicam uma deficiência crónica, podem-se desenvolver patologias como o raquitismo, em bebés e crianças, ou fraqueza muscular, dores ósseas e osteomalacia nos adultos<sup>258</sup>.

A vitamina D pode ainda ser importante noutros processos biológicos não esqueléticos, pelo que o défice desta hormona pode também estar associado ao aumento do risco de cancro, doença autoimune, doença infecciosa, doença cardiovascular e variadas doenças crónicas<sup>258</sup>.

## **HORMONA DO CRESCIMENTO**

A hormona do crescimento (GH), também conhecida como somatotrofina, é a hormona responsável pela estimulação do crescimento e regeneração celular. Esta hormona é sintetizada, armazenada e secretada pelas células somatotróficas da hipófise anterior<sup>259</sup> em resposta a um estímulo feito pelo fator de libertação da somatotrofina (GRF), produzido no hipotálamo. Por sua vez, a secreção de GRF é controlada pela quantidade de proteínas no interior das células do organismo.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de GH no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>259</sup>.

- Limitações/interferências: A presença de anticorpos heterófilos nas amostras pode provocar interferência no ensaio<sup>259</sup>.

- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.

- Interpretação clínica: Concentrações séricas elevadas de GH são encontradas em indivíduos que possuem um tumor hipofisário das células somatotróficas. Apesar de benigno, este adenoma cresce lentamente, produzindo valores cada vez mais elevados de GH e, numa fase inicial, só é possível ser detetado através da medição dos níveis de GH no soro. Normalmente, este adenoma não traz complicações, no entanto, pode-se tornar grande o suficiente e provocar complicações. Por outro lado, o excesso de GH também pode originar um espessamento dos ossos que pode levar a, por exemplo, pressão nos nervos, fraqueza muscular, resistência à insulina e redução da função sexual. Esta síndrome é frequentemente chamada de gigantismo, quando ocorre em crianças, e acromegalia quando presente em adultos<sup>259</sup>.

A deficiência de GH, normalmente, acontece em crianças e pode provocar atrasos no crescimento e na maturidade sexual<sup>259</sup>.

## **SOMATOMEDIA C**

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), também conhecido como somatomedina C, é uma proteína estruturalmente semelhante à insulina que estimula o crescimento corporal através do crescimento de quase todas as células do organismo, especialmente do músculo esquelético, cartilagem, osso, fígado, rins, nervos, pele, células hematopoiéticas e pulmões. Esta hormona é produzida, principalmente, no fígado, mas também pelos tecidos alvo de forma parácrina e/ou autócrina, em resposta ao estímulo feito pela GH<sup>260</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação quantitativa de IGF-I no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>260</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras que contenham anticorpos anti-rato, contaminação bacteriana ou que sejam inativadas pelo calor podem resultar em valores falsamente elevados ou reduzidos<sup>260</sup>.

- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.

- Interpretação clínica: Como referido a produção de IGF-I é estimulada pela hormona GH e, normalmente, é inibida quando ocorre subnutrição, falta de recetores de GH ou falhas da via de sinalização após o recetor de GH. Assim, a determinação de IGF-I pode ser útil na identificação de deficiência de GH e avaliação da função da hipófise ou na deteção de excesso

de GH para auxiliar no diagnóstico e monitorização do tratamento de acromegalia e gigantismo<sup>260</sup>.

## **ERITROPOETINA**

A eritropoietina é uma glicoproteína produzida, maioritariamente, pelos rins, e é o fator mais importante na regulação da eritropoiese (produção de eritrócitos). A produção renal de eritropoietina varia consoante a concentração de oxigénio disponível, ou seja, em condições de hipoxia, o nível desta hormona em circulação aumenta, aumentando, por conseguinte, a produção de eritrócitos<sup>261</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa dos níveis de eritropoietina no soro é feita por ensaio imunoenzimático quimioluminescente do tipo *sandwich*<sup>261</sup>.
- Limitações/interferências: Podem ocorrer interferências com anticorpos heterófilos presentes nas amostras<sup>261</sup>.
- Equipamento: *UNICEL DxI* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A sobre-expressão de eritropoietina pode estar associada a certas condições fisiopatológicas e, normalmente, provoca policitemia, devido ao aumento de eritrócitos em circulação. Contudo, a policitemia primária ou vera é causada por um crescimento de precursores dos eritrócitos, provenientes de células-tronco alteradas da medula óssea, independente da eritropoietina, pelo que, nestes casos, os valores desta hormona estão diminuídos. Por outro lado, nos casos de policitemia secundária os níveis de eritropoietina estão elevados. A superprodução de eritropoietina também pode ser uma reação de adaptação do organismo a condições que provocam a hipoxia dos tecidos, tais como, a presença em altitudes elevadas, doença pulmonar obstrutiva crónica, apneia do sono, fumo ou hipoxia renal localizada, ou como resultado da produção de células neoplásicas<sup>261</sup>.

Uma produção insuficiente de eritropoietina é observada nos casos de anemia associada às seguintes condições: arterite reumatoide, síndrome da imunodeficiência adquirida, cancro e colite ulcerativa, anemia falciforme e nos recém-nascidos prematuros. Também os indivíduos com hipergamaglobulinemia associada a mieloma múltiplo ou à doença de Waldenström apresentam uma produção insuficiente de eritropoietina, em relação à concentração de hemoglobina<sup>261</sup>.

Este ensaio pode ainda ser utilizado para monitorizar o tratamento com eritropoietina recombinante nos casos de insuficiência renal crónica e de anemia causada por quimioterapia<sup>261</sup>.

#### 4.4.5. Análises Imunologia

##### ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

A eletroforese de proteínas é um exame laboratorial que utiliza a técnica de eletroforese em gel de agarose para a separação de moléculas. Esta técnica, normalmente, utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. Neste exame, as proteínas séricas são separadas em cinco frações principais: albumina,  $\alpha$ 1-globulinas,  $\alpha$ 2-globulinas,  $\beta$ -globulinas e  $\gamma$ -globulinas<sup>262</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: O ensaio *HYDRAGEL PROTEIN(E)* tem por base o princípio da separação por eletroforese em gel de agarose. Durante a aplicação de uma diferença de potencial, as partículas contidas na amostra migram no gel de agarose consoante o seu tamanho e carga num determinado pH. Isto só é possível pois os aminoácidos que compõe as proteínas possuem carga elétrica, o que faz com que, a determinado pH, adquiram carga positiva ou negativa, migrando para o polo oposto à sua carga. Desta maneira, as moléculas com carga negativa migram para o polo positivo, as moléculas com carga positiva migram para o polo negativo e as que apresentam cargas elétricas equilibradas permanecerão estáticas. O tamanho de cada proteína torna-se também importante para esta separação na medida que as proteínas de menor peso molecular irão migrar mais rapidamente que as de maior peso. A visualização do gel depois de corado permite uma análise qualitativa de cada fração, enquanto que a leitura dos géis através de um leitor, permite a visualização dos perfis de proteínas para análises quantitativas relativas<sup>262</sup>.

- Procedimentos: O *kit HYDRAGEL PROTEIN(E)* utilizado no SPC do CHMT permite a análise de cinquenta e três amostras em simultâneo, juntamente com uma amostra controlo (normal ou alto). As amostras podem ser pipetadas manualmente ou automaticamente com o auxílio do pipetador automático *HYDRAPLUS*<sup>®</sup> da *SEBIA*, sendo depois introduzidas no equipamento para a realização da eletroforese. A coloração do gel também é feita pelo equipamento pelo corante negro de amido, depois da sua secagem. A leitura de todos os géis de eletroforese é feita no leitor *Sebia* com auxílio do *software Phoresis*<sup>262</sup>.

- Equipamento: *HYDRASYS*<sup>®</sup> da *SEBIA*.
- Interpretação clínica: A eletroforese de proteínas é um exame, normalmente, usado para rastrear amostras com anormalidades proteicas sendo, por isso, necessário ter conhecimento que no perfil eletroforético alterado podem surgir bandas diminuídas ou ausentes, bandas com

intensidade aumentada ou bandas com mobilidade anormal e que proteínas séricas podem estar a causar essas alterações (ver Tabela 15).

Eletroforeses com perfis sugestivos de situações patológicas são auxiliares de diagnóstico (por exemplo, de gamopatias monoclonais e processos inflamatórios) e de prognóstico. A sua normalização também reflete, muitas vezes, monitorização terapêutica da doença<sup>263</sup>.

Tabela 15: As principais frações do perfil eletroforético e proteínas séricas que migram em cada uma delas.

Fração	Proteínas séricas presentes
<b>Albumina</b>	Albumina e pré-albumina
<b><math>\alpha 1</math>-globulinas</b>	$\alpha 1$ -antitripsina, $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, $\alpha$ -fetoproteína
<b><math>\alpha 2</math>-globulinas</b>	Ceruloplasmina, $\alpha 2$ -macroglobulina, haptoglobina
<b><math>\beta</math>-globulinas</b>	Transferrina, Componentes C3 e C4 do complemento, $\beta 2$ -microglobulina
<b><math>\gamma</math>-globulinas</b>	IgA, IgD, IgE, IgG, IgM

## IMUNOFIXAÇÃO DE PROTEÍNAS

A imunofixação é uma técnica utilizada para determinar o tipo de imunoglobulina (Ig) os plasmócitos estão a secretar. Este exame laboratorial deve ser feito apenas quando houver um pico na fração  $\gamma$ -globulinas na eletroforese de proteínas, de modo a que seja possível a determinação do(s) tipo(s) de Ig que está(ão) a provocar esse aumento.

- **Amostra:** Soro ou urina.
- **Metodologia:** O ensaio *HYDRAGEL IF* é baseado no princípio da eletroforese em gel de agarose, seguido de imunofixação. Neste ensaio, findada a separação das proteínas séricas de acordo com a carga, o gel é incubado com diferentes anti-soros específicos direcionados contra as cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM) e contra as cadeias leves (livres e ligadas) Kappa ( $\kappa$ ) e Lambda ( $\lambda$ ). Posteriormente é removido o excesso de anti-soros e o gel é seco e corado para visualização. A análise é feita qualitativamente, identificando as cadeias pesadas e leves presentes na amostra<sup>264</sup>.
- **Procedimento:** O *kit HYDRAGEL IF* permite a análise de quatro amostras em simultâneo e, para cada uma delas, é possível aplicar cinco anti-soros. Para além dos descritos anteriormente, o *kit* possui ainda anti-soros dirigidos contra as cadeias pesadas  $\delta$  (IgD) e  $\epsilon$  (IgE) e o corante usado é o violeta ácido<sup>264</sup>.
- **Equipamento:** *HYDRASYS*<sup>®</sup> da *SEBIA*.
- **Interpretação clínica:** As  $\gamma$ -globulinas são visualizadas no exame com um padrão regular de coloração, ou seja, sem qualquer banda distinta. Nos indivíduos com uma gamapatia, o

crescimento e a divisão descontrolada de plasmócitos malignos levam à produção de grandes quantidades de um tipo específico de Ig, que pode ser visualizada como uma banda característica no gel de eletroforese. O tipo de Ig anormal pode ser identificado por imunofixação sérica, exame bastante útil para auxiliar no diagnóstico e monitorização da evolução ou tratamento de doenças associadas à presença de proteínas anormais, tais como mieloma múltiplo e outras gamopatias<sup>263</sup>.

Por outro lado, também pode ser utilizada a imunofixação urinária para identificar uma produção de proteína monoclonal, pois as proteínas apenas são excretadas em quantidades detetáveis pelas técnicas laboratoriais, quando existe uma produção anormal das mesmas ou nos casos de disfunção renal<sup>263</sup>.

No caso de identificação de uma paraproteína no soro ou urina ou em ambos, através de imunofixação, as suas cadeias leves e pesadas deverão ser classificadas e determinadas as concentrações da(s) imunoglobina(s) presente(s)<sup>265,266</sup>, através de testes mais específicos como os mencionados seguidamente.

## **IMUNOGLOBULINAS (IgA, IgM, IgG e IgD)**

Os anticorpos, também conhecidos como Ig, são glicoproteínas que pertencem à fração  $\gamma$ -globulinas. As Ig podem ser encontradas no organismo de duas formas distintas, na forma solúvel, em circulação no sangue ou noutros fluídos corporais, ou inseridas na membrana plasmática dos linfócitos B, onde atuam como recetores de antigénios.

Normalmente, as imunoglobulinas são formadas por dois fragmentos, o fragmento Fc, responsável pelas interações com os recetores Fc da membrana plasmática dos linfócitos B, e o fragmento Fab, região de ligação aos antigénios. O fragmento Fab é ainda constituído por duas cadeias pesadas iguais e duas cadeias leves iguais, sendo as cadeias pesadas determinantes para a classificação das imunoglobulinas (isótipos). Existem cinco tipos de cadeias pesadas, que são designadas pelas seguintes letras gregas:  $\gamma$  (gama), dando origem às IgG;  $\mu$  (mu), originando as IgM;  $\delta$  (delta), contidas nas IgD;  $\alpha$  (alfa), pertencentes às IgA e  $\epsilon$  (épsilon), características das IgE. Todos os tipos de imunoglobulinas contêm ainda cadeias leves, que podem ser do tipo Kappa ( $\kappa$ ) ou Lambda ( $\lambda$ ).

- Amostra: Soro.
- Metodologia: As determinações quantitativas de IgA, IgM, IgG e IgD são feitas por nefelometria cinética. Nesta técnica é determinada a taxa de aumento da dispersão da luz

provocada por partículas em suspensão numa solução, como resultado dos complexos formados durante uma reação antígeno-anticorpo<sup>267-270</sup>.

- Limitações/interferências: Amostras que contenham imunoglobulina monoclonal podem simular uma condição de excesso de antígeno e, conseqüentemente, valores falsamente baixos. Para além disso, a presença de outras partículas que não as obtidas através da reação podem originar sinais de dispersão da luz não relacionados com o ensaio<sup>267-270</sup>.

- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: A determinação das  $\gamma$ -globulinas no soro é um auxiliar no diagnóstico de doenças autoimunes, sarcoidose, doença hepática crónica, infeções crónicas e recorrentes, doenças malignas do tecido linfóide, mieloma múltiplo, assim como, outras imunodeficiências mistas graves<sup>269</sup>.

#### **SUBCLASSES DA IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)**

Em circulação podem ser encontradas quatro subclasses de IgG, designadas de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Estas subclasses possuem diferentes características bioquímicas e diferentes funções biologicamente importantes, como o reconhecimento de antígenos, a ativação de componentes do sistema do complemento e a ligação a recetores da superfície celular<sup>271</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: As determinações quantitativas de IgG1 e IgG2 no soro são feitas por técnica nefelométrica e as determinações de IgG3 e IgG4 no soro são feitas por método turbidimétrico<sup>271</sup>.

- Limitações/interferências: Podem obter-se resultados falsamente elevados em amostras que contenham imunoglobulinas monoclonais ou complexos imunitários<sup>271</sup>.

- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.

- Interpretação clínica: Níveis baixos de uma das subclasses de IgG é indicativo de uma perturbação do sistema imunitário, no entanto, para um diagnóstico definitivo devem ser tidos em conta os resultados de outros exames complementares de diagnóstico<sup>271</sup>.

Uma deficiência seletiva na subclasse IgG2 está, frequentemente, associada a um aumento da suscetibilidade a infeções virais ou bacterianas, principalmente infeções do trato respiratório superior ou inferior. Por outro lado, concentrações séricas diminuídas de IgG4 estão, muitas vezes, associadas a infeções sino-pulmonares recorrentes<sup>271</sup>.

Anomalias nos níveis séricos das subclasses de IgG também podem ser indicativos de doenças autoimunes, perturbações neurológicas e infecções pelo HIV<sup>271</sup>.

## IGE

A IgE é uma imunoglobulina que, à semelhança de todas as outras imunoglobulinas descritas, é sintetizada nas células plasmáticas (basófilos e mastócitos) em resposta a estímulos de antígenos. Contudo, a IgE diferencia-se das restantes por alguns aspetos estruturais e pela função que desempenha nas doenças alérgicas<sup>272</sup>. A interação específica entre o antígeno e a IgE ligada ao mastócito resulta na libertação de histamina, leucotrieno, proteases, fatores quimiotáticos e citocinas, que levam a broncoespasmo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e quimiotaxia de outras células inflamatórias como, por exemplo, eosinófilos.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa da concentração de IgE total no soro é feita por turbidimetria cinética<sup>272</sup>.
- Limitações/interferências: Amostras de indivíduos com níveis elevados de fator reumatoide, autoanticorpos anti-IgE e anticorpos anti-rato, podem originar falsos resultados. Para além disso, amostras que contenham outras substâncias que não as da reação, podem originar sinais de dispersão da luz não relacionados com o ensaio<sup>272</sup>.
- Equipamento: *IMMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: As concentrações séricas de IgE podem variar consoante a dieta alimentar, antecedentes genéticos, localização geográfica e outros fatores, no entanto, em indivíduos saudáveis, os níveis basais de IgE circulante são extremamente baixos em comparação com as restantes imunoglobulinas. As concentrações séricas de IgE começam a aumentar quando estão presentes doenças alérgicas, doenças atópicas como, por exemplo, asma, febre dos fenos, dermatite atópica e urticária, infeções parasitárias, aspergilose pulmonar, síndrome de Wiskott-Aldrich e mieloma<sup>272</sup>.

Por estar presente em várias doenças, os resultados deste parâmetro são, muitas vezes, analisados em conjunto com os ensaios *ImmunoCAP*<sup>®</sup> *Total IgE*, *ImmunoCAP*<sup>®</sup> *Phadiatop*<sup>®</sup> ou *Multi-rast* e *ImmunoCAP*<sup>®</sup> para antígenos específicos que podem estar a provocar a doença alérgica (ver 4.4.7. *Análises Alergologia*).

## CADEIAS LEVES KAPPA E LAMBDA

As cadeias leves das imunoglobulinas fazem parte da subunidade polipeptídica mais pequena do fragmento Fab. Cada linfócito B só expressa um único tipo de cadeia pesada e de cadeia leve, mantendo esse fenótipo durante toda a sua vida útil. Num indivíduo saudável, a proporção Kappa/Lambda total no soro é de aproximadamente 2:1.

- Amostra: Soro e urina (aleatória).
- Metodologia: As determinações quantitativas das cadeias leves do tipo Kappa e Lambda (livre e conjugada) no soro ou urina são feitas por nefelometria cinética<sup>265,266</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras que contenham cadeias leves monoclonais (livres e ligadas) podem originar valores falsamente baixos, devido a um excesso de antigénio. Por outro lado, amostras que contenham partículas de pó, detritos e bactérias na solução de reação podem apresentar resultados não fiáveis<sup>265,266</sup>.
- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação das cadeias leves do tipo Kappa e do tipo Lambda é utilizada no diagnóstico e monitorização do tratamento de diversas doenças, como doenças hepáticas e renais, mieloma múltiplo e outras patologias associadas às proteínas séricas<sup>265,266</sup>.

## COMPONENTES DO COMPLEMENTO (C1Q, C3 E C4)

O sistema do complemento é um conjunto de proteínas séricas que têm como principal função a destruição de agentes infecciosos, funcionando em conjunto para a promoção de respostas imunes e inflamatórias<sup>273,274</sup>. Fazem parte do sistema do complemento nove componentes principais, designados como C1 a C9, que são regulados por vários subcomponentes e inibidores, constituindo a resposta inata do sistema imunológico. Assim, o sistema complemento atua reconhecendo complexos antigénio-anticorpo bem como algumas estruturas e polissacáridos encontrados na membrana externa dos microrganismos ou células “estranhas”<sup>275</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: As determinações quantitativas dos componentes do complemento C1q, C3 e C4 no soro são feitas pela técnica de nefelometria cinética<sup>273,274,276</sup>.
- Limitações/interferências: Outras partículas em solução, que não as originadas pelo ensaio, podem interferir com a medição dos sinais de dispersão da luz<sup>273,274,276</sup>.
- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.

▪ Interpretação clínica: Deficiências ou anomalias hereditárias ou adquiridas nos componentes do sistema do complemento podem afetar a integridade e funcionamento do sistema imunológico. Uma deficiência hereditária origina, normalmente, infecções microbianas recorrentes ou doença autoimune, enquanto que numa deficiência provocada por uma condição aguda ou crónica subjacente, os níveis destas proteínas, geralmente, voltam aos níveis basais se essa condição for resolvida. Assim, estas deficiências podem surgir em função de uma produção diminuída ou do aumento da utilização dos componentes<sup>275</sup>, pelo que as determinações destas proteínas no soro são auxiliares no diagnóstico de doenças imunológicas, especialmente das doenças associadas à falta de componentes do complemento<sup>273,274</sup>.

A determinação de C1q é fundamental para a distinção entre angioedema hereditário ou adquirido, visto que as concentrações deste componente se encontram normais na forma hereditária e diminuídas na forma adquirida desta doença<sup>276</sup>.

Concentrações elevadas de todas estas proteínas, conjuntamente com outras proteínas de fase aguda, podem ser encontradas durante uma infeção aguda ou crónica<sup>275</sup>.

## **INIBIDOR DA ESTERASE C'1**

Para que o sistema complemento desempenhe a sua função é necessária uma ativação prévia, que é feita por três vias distintas: clássica, alternativa e da lectina. A regulação da via de ativação clássica do complemento é feita pelo inibidor da esterase C'1<sup>277</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa do inibidor da esterase C'1 é feita por método nefelométrico<sup>278</sup>.
- Equipamento: *IMMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: O parâmetro laboratorial fundamental para o diagnóstico de angioedema é a medição dos níveis de inibidor da esterase C'1<sup>278</sup>. O angioedema hereditário pode ainda ser dividido em tipo I, caracterizado por uma deficiência do inibidor da esterase C'1, e em tipo II, caracterizada por uma disfunção deste inibidor<sup>277</sup>.

Para além disso, níveis baixos do inibidor da esterase C'1 também predis põem para doenças autoimunes, em especial a lúpus eritematoso sistémico, pois a não inativação da via clássica leva a um consumo maior dos componentes C3 e C4<sup>278</sup>.

## CERULOPLASMINA

A ceruloplasmina é uma glicoproteína produzida no fígado, que contém seis átomos de cobre na sua constituição. Defeitos no transporte do cobre provocam uma diminuição da secreção deste metal pela bÍlis, o que faz com que ocorra uma acumulação e, conseqüente, sobrecarga do fígado. Por outro lado, os defeitos no transporte de cobre também fazem com que ocorra uma diminuição na incorporação de cobre na ceruloplasmina<sup>279</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de ceruloplasmina no soro é feita por nefelometria cinética<sup>280</sup>.
- Limitações/interferências: A presença de outras partículas na solução de reação pode resultar em interferências na dispersão da luz<sup>280</sup>.
- Equipamento: *IMAGE® 800* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: NÍveis diminuídos de ceruloplasmina são úteis para auxiliar no diagnóstico de patologias do metabolismo do cobre<sup>280</sup>, principalmente, na doença de Wilson.

## $\alpha$ 1-ANTITRIPSINA

A  $\alpha$ 1-antitripsina é uma proteína, produzida pelo fígado, e intervém como inibidor da ação de diversas enzimas envolvidas na resposta inflamatória, tais como a tripsina, elastase e a protease-3. Essa inibição torna-se importante de forma a proteger os tecidos dos pulmões e o fígado destas proteases produzidas por macrófagos e neutrófilos durante respostas inflamatórias<sup>281</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de  $\alpha$ 1-antitripsina no soro é feita por nefelometria cinética<sup>281</sup>.
- Limitações/interferências: A presença de partículas em solução que não resultem da reação pode originar sinais de dispersão da luz não relacionados com o ensaio<sup>281</sup>.
- Equipamento: *IMAGE® 800* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação de  $\alpha$ 1-antitripsina ajuda no diagnóstico de cirrose hepática, pois a produção de proteína nas células do fígado é disfuncional, provocando baixas concentrações em circulação. Por outro lado, essa deficiência pode levar ainda a enfisema pulmonar, síndrome de dificuldade respiratória no recém-nascido e outras doenças graves associadas a perdas proteicas<sup>281</sup>.

## APOLIPOPROTEÍNA A-1 E APOLIPOPROTEÍNA B

As apolipoproteínas são proteínas que fazem parte das lipoproteínas e são responsáveis pela estabilização da sua estrutura. Existem vários tipos de apolipoproteínas (A, B, C, D, E, J e (a)), sendo que cada tipo varia consoante a classe de lipoproteína<sup>282</sup>.

Por um lado, a apolipoproteína A-1 é sintetizada no fígado e no intestino, sendo o principal componente das HDL. A apolipoproteína A-1 é um cofator na ativação da enzima lecitina-colesterol-aciltransferase, responsável pelo transporte e remoção do colesterol livre dos tecidos extra-hepáticos<sup>283</sup>.

Por outro lado, a apolipoproteína B apresenta-se sob duas formas distintas, a apolipoproteína B-48 e apolipoproteína B-100. A apolipoproteína B-48 é sintetizada no intestino e faz parte das quilomicras, enquanto que a apolipoproteína B-100 é sintetizada no fígado e está presente em maior quantidade nas LDL, mas também noutras lipoproteínas<sup>282</sup>. De um modo geral, a apolipoproteína B tem como função o transporte e *clearance* dos lípidos<sup>284</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: As determinações quantitativas de apolipoproteína A-1 e apolipoproteína B no soro são feitas por nefelometria cinética<sup>283,284</sup>.
- Limitações/interferências: Nas amostras que contêm partículas em solução que não são obtidas pela reação podem ocorrer interferências<sup>283,284</sup>.
- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação das lipoproteínas é importante para a avaliação do metabolismo lipídico, assim como, na avaliação de risco de desenvolvimento de doenças das artérias coronárias<sup>283,284</sup>. Níveis elevados de apolipoproteína B podem estar associados a hiperlipidemia familiar combinada e hiperlipidemia adquirida, onde funciona como fator importante no diagnóstico diferencial.

## LIPOPROTEÍNA(A)

A lipoproteína(a) é uma lipoproteína com estrutura semelhante à das LDL, devido ao seu tamanho, composição lipídica e presença da apolipoproteína B-100. No entanto, o que a difere das LDL é a presença de uma segunda proteína, a apolipoproteína(a), que se encontra ligada à apolipoproteína B-100, e lhe confere diferente densidade e mobilidade eletroforética<sup>285</sup>.

A estrutura molecular da apolipoproteína(a) é muito semelhante à do plasminogénio, uma proteína fundamental no processo de fibrinólise, o que faz com que a lipoproteína(a) “compita” com o plasminogénio pelos sítios de ligação às células endoteliais<sup>282</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de lipoproteína(a) no soro é feita por nefelometria cinética<sup>286</sup>.
- Limitações/interferências: Assim como nos outros testes de nefelometria cinética, a presença de outras partículas na solução de reação pode originar sinais de dispersão da luz não relacionados com o ensaio<sup>286</sup>.
- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A determinação da lipoproteína(a), conjuntamente com outros testes de lipoproteínas, é importante para diagnóstico de doenças cardiovasculares ateroscleróticas em determinadas populações sendo que, quanto mais elevadas as concentrações desta lipoproteína no soro, maior é o risco de desenvolver este tipo de doenças<sup>286</sup>. No entanto, os valores basais de lipoproteína(a) em circulação diferem consoante a idade, género e distribuição geográfica, pelo que se deve ter isso em consideração aquando da análise dos resultados.

## **FATOR REUMATOIDE**

O fator reumatoide é um autoanticorpo, da classe IgM, produzido pelo sistema imunológico do organismo. Estes anticorpos identificam os tecidos do indivíduo como antígenos e são dirigidos contra a região Fc da IgG. A sua presença em circulação é um bom indicador da atividade inflamatória e autoimune do organismo<sup>287</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de fator reumatoide no soro é feita por nefelometria cinética<sup>287</sup>.
- Limitações/interferências: A presença de outras partículas na solução de reação pode originar sinais de dispersão da luz que não resultam do ensaio<sup>287</sup>.
- Equipamento: *IMAGE*<sup>®</sup> 800 da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: O fator reumatoide é importante para o diagnóstico de arterite reumatoide e a presença de concentrações elevadas deste autoanticorpo está associada a um prognóstico mais reservado, com risco de desenvolver uma forma mais grave da doença e complicações mais rapidamente. No entanto, o fator reumatoide não é específico apenas da arterite reumatoide, podendo estar presente também noutras perturbações autoimunes e inflamatórias, como a mononucleose infecciosa, lúpus eritematoso sistémico, esclerodermia e hepatite<sup>287</sup>.

## HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido produzido pela desmetilação intracelular da metionina e é metabolizada em cisteína ou metionina. Na via de trans-sulfuração da vitamina B6, a homocisteína é irreversivelmente catabolizada em cisteína, no entanto, uma grande parte deste aminoácido é novamente metilado em metionina, principalmente por ação da enzima metionina sintetase. Se alguma destas reações fica comprometida, a homocisteína acumula-se e é excretada para o sangue onde circula, maioritariamente, na forma oxidada e ligada a proteínas<sup>288</sup>.

- Amostra: Soro ou plasma.
- Condições de colheita: O plasma deverá ser obtido por colheita de sangue venoso em tubos de EDTA de potássio ou de heparina de lítio. Para minimizar aumentos na concentração de homocisteína derivados da síntese por eritrócitos, os tubos de colheita devem ser mantidos em gelo desde a colheita até ao processamento da amostra e a centrifugação deve ser feita o mais rapidamente possível de modo a evitar interferências nos resultados<sup>288</sup>.
- Metodologia: A determinação quantitativa de homocisteína é feita por ensaio espectral fotométrico enzimático<sup>288</sup>.
- Limitações/interferências: As amostras contendo matéria particulada (fibrina, eritrócitos ou outra matéria) e amostras visivelmente lipémicas não devem ser utilizadas no ensaio, assim como, as amostras que não foram colocadas de imediato em gelo. Amostras de indivíduos em tratamento com alguns fármacos podem apresentar concentrações de homocisteína falsamente elevadas. A cistationina é medida com homocisteína, pelo que, em casos muito raros, indivíduos que tenham doença renal terminal ou distúrbios metabólicos graves, os níveis de cistationina podem aumentar bastante e causar interferência no ensaio<sup>288</sup>.
- Equipamento: *DxC AU 700* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: São encontradas concentrações significativamente elevadas de homocisteína total (livre e ligada a proteínas) em indivíduos com homocistinúria, um distúrbio genético raro das enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína<sup>288</sup>.

A hiper-homocisteinemia, ou seja, níveis elevados de homocisteína no sangue, pode estar associada a um risco acrescido de doença cardiovascular, como enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou doença arterial crónica. Os indivíduos com doença renal crónica apresentam mortalidade e morbidade acrescidas devido a doença cardiovascular arteriosclerótica. Embora esses doentes também tenham défices de vitaminas que estão envolvidas no metabolismo da homocisteína, os níveis elevados deste aminoácido devem-se, principalmente, a um compromisso na sua remoção do sangue pelos rins<sup>288</sup>.

Também alguns medicamentos, tais como, metotrexato, carbamazepina, fenitoína, protóxido de azoto e triacetato de azauridina, interferem com o metabolismo de homocisteína e podem originar níveis elevados deste aminoácido no sangue<sup>288</sup>.

## HAPTOGLOBINA

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda, produzida no fígado, que se liga irreversivelmente à hemoglobina após a hemólise dos eritrócitos. A sua principal função é transportar a hemoglobina livre para o seu local de degradação no sistema reticuloendotelial<sup>289</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa de haptoglobina no soro é feita por nefelometria cinética<sup>289</sup>.
- Limitações/interferências: A presença de outras partículas em solução que não as originadas pela reação, como pó, detritos e bactérias, pode originar sinais de dispersão da luz interferentes no ensaio<sup>289</sup>.
- Equipamento: *IMAGE® 800* da *BECKMAN COULTER*.
- Interpretação clínica: A haptoglobina é o marcador mais sensível de hemólise e a sua determinação é um auxiliar para o diagnóstico de doenças hemolíticas<sup>289</sup>. As concentrações de haptoglobina estão então diminuídas em doenças como hemoglobinopatias, anemias megaloblásticas e anemias hemolíticas, devido à formação de complexos com a hemoglobina, ou em doenças hepáticas devido a uma deficiente produção desta proteína. Por outro lado, os seus níveis podem aumentar em resposta a diversas situações como stress, infeção, inflamação aguda ou necrose tecidual.

### 4.4.6. Análises Sorologia

A sorologia é uma secção da imunologia que estuda as reações entre antígenos e anticorpos no soro, assim como, outros fenómenos relativos à imunidade<sup>290</sup>.

#### ANTICORPOS ANTI-*Chlamydia pneumoniae* (IGM E IGG)

A *Chlamydia pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa e é um agente patogénico, exclusivamente humano, transmitido via aerossóis<sup>291,292</sup>.

A infecção provocada por esta bactéria é, normalmente, assintomática, mas pode também causar sintomas como dor de garganta, tosse persistente, dor de cabeça e febre ou ainda, em casos graves, levar a um quadro de pneumonia. A *C. pneumoniae* pode ainda causar algumas doenças crônicas, tais como, asma brônquica, doenças coronárias e aterosclerose<sup>291,292</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-*Chlamydia pneumoniae* da classe IgM e IgG no soro é feita por ELISA<sup>291,292</sup>.
- Limitações/interferências: Podem ocorrer reações cruzadas com anticorpos dirigidos a outras espécies de *Chlamydia sp.*<sup>291,292</sup>.
- Equipamento: MAGO<sup>®</sup> 4S da DIAMEDIX.
- Interpretação clínica: A detecção sorológica de uma infecção por *Chlamydia pneumoniae* é um complemento útil ao método de detecção direta do agente patogénico em amostras de expectoração ou secreções do trato faríngeo<sup>291,292</sup>.

Uma vez que a detecção de anticorpos em circulação pode estar associada, tanto com uma infecção aguda, como uma infecção passada, é necessário diferenciá-las. Os anticorpos específicos da classe IgM só podem ser detetados no soro, após três semanas da infecção e indicam, normalmente, uma infecção primária por *C. pneumoniae*. Depois, passadas cerca de cinco semanas, podem ser detetados em circulação os anticorpos específicos da classe IgG, o que significa que uma detecção positiva de IgM, em conjunto com um aumento significativo de título de IgG de uma amostra colhida duas a oito semanas mais tarde, indica uma infecção aguda<sup>291,292</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-*Mycoplasma pneumoniae* (IGM E IGG)**

*Mycoplasma pneumoniae* é uma bactéria com o genoma mais pequeno dos procariotas autorreplicativos e não possui parede celular. Esta espécie é transmitida por via aérea, através de gotículas e é um dos agentes etiológicos de infeções agudas do trato respiratório, tanto superior, como inferior. A nível histológico, o *M. pneumoniae* fixa-se ao epitélio da traqueia, brônquios e bronquíolos por citoaderência mediada por lipoproteínas (adesinas) contidas na superfície desta bactéria, que são, ao mesmo tempo, significativas como antigénios<sup>293,294</sup>.

As crianças e jovens são os mais afetados e desenvolvem sintomas gerais de uma infeção respiratória, tais como, tosse persistente, febre e dores de cabeça. Em casos mais graves, esta infeção pode levar a pneumonia atípica primária ou infeção geral dos órgãos respiratórios<sup>293,294</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação quantitativa ou semi-quantitativa de anticorpos IgM e IgG anti-*Mycoplasma pneumoniae* é feita por técnicas de ELISA<sup>293,294</sup>.
- Limitações/interferências: Podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies do género *Mycoplasma*<sup>293,294</sup>.
- Equipamento: MAGO<sup>®</sup> 4S da DIAMEDIX.
- Interpretação clínica: A detecção sorológica de uma infecção por *Mycoplasma pneumoniae* é um complemento útil ao método de detecção direta, que é feito por detecção do agente patogénico nas secreções recolhidas por aspirado bronco-alveolar. A detecção de anticorpos específicos da classe IgM é possível quatro dias após o início da infecção, seguido da detecção de anticorpos específicos IgG, alguns dias mais tarde. A detecção de anticorpos específicos IgG é significativa para a confirmação de uma infecção aguda de *Mycoplasma pneumoniae* e a sua concentração irá aumentar, três a quatro vezes mais, entre o décimo e o vigésimo dia após o início da doença<sup>293,294</sup>.

#### **ANTICORPOS ANTI-Vírus do sarampo (IGG)**

O vírus do sarampo pertence à espécie *Measles morbillivirus* e é um dos membros da família *Paramyxoviridae*. Este vírus tem um genoma de RNA de cadeia simples e é responsável por causar uma infecção aguda, que exhibe uma diversidade de sintomas clínicos como febre, mal-estar, tosse, congestão e conjuntivite, comum a muitas infecções do trato respiratório. No entanto, o sinal que caracteriza a doença do sarampo é o exantema que aparece próximo da orelha e que se espalha na testa, rosto e no resto do corpo<sup>295</sup>.

Em pessoas com o sistema imunitário debilitado, o sarampo pode trazer graves complicações, como pneumonia bacteriana secundária, otite média, encefalites, miocardites, abortos espontâneos em mulheres grávidas e panencefalite esclerosante aguda<sup>295</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa ou semi-quantitativa de anticorpos da classe IgG contra o vírus do sarampo no soro é feita pela técnica de ELISA<sup>295</sup>.
- Equipamento: MAGO<sup>®</sup> 4S da DIAMEDIX.
- Interpretação clínica: O diagnóstico laboratorial do sarampo pode ser realizado através da detecção de anticorpos IgM e IgG específicos. Os anticorpos específicos da classe IgM são, normalmente, detetados desde os primeiros dias até quatro semanas após o aparecimento dos sinais e sintomas clínicos e a sua presença indica infecção recente pelo vírus do sarampo. Por outro lado, os anticorpos específicos da classe IgG aparecem durante a infecção aguda e

geralmente são detetados durante muitos anos e, por isso, a sua deteção torna-se um bom indicador do estado imunológico do indivíduo. A definição deste estado imunológico torna-se útil nos rastreios pré-natal, pois o surgimento de uma infeção aguda durante a gravidez pode levar a complicações da mesma, aumentando o risco de parto prematuro, aborto espontâneo ou morte fetal<sup>295</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-ESTREPTOLISINA-O**

A estreptolisina-O é uma exoenzima imunogénica tóxica produzida por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do grupo A<sup>296</sup>. Em resposta às infeções causadas por estas bactérias, o sistema imunológico, produz anticorpos anti-estreptolisina-O (TASO) que podem ser detetados em circulação.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação quantitativa das concentrações de TASO no soro é feita por turbidimetria cinética<sup>296</sup>.
- Equipamento: DxC AU 700 da BECKMAN COULTER.
- Interpretação clínica: Concentrações elevadas de TASO, geralmente, indicam uma infeção recente por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo A, pelo que a sua determinação se tornou fundamental para o diagnóstico e tratamento da febre reumática e da glomerulonefrite aguda. No entanto, um resultado negativo de TASO não deve excluir a hipótese de uma infeção estreptocócica, pois uma infeção cutânea, normalmente, não produz o aumento dos níveis de TASO. Isto significa que os resultados laboratoriais devem ser sempre interpretados conjuntamente com outras observações clínicas para que haja um correto diagnóstico<sup>296</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-*Borrelia burgdorferi* (IGM E IGG)**

A *Borrelia burgdorferi* é uma bactéria anaeróbia, com forma de espiroqueta, que é transmitida ao ser humano através da picada de uma carraça infetada. Apenas *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii* são agentes patológicos para o ser humano e fazem parte do complexo designado de *Borrelia burgdorferi sensu lato*<sup>297</sup>.

A infeção desencadeada por estas estirpes é chamada doença de Lyme ou borreliose de Lyme e é uma doença infecciosa sazonal (da Primavera ao Outono). Esta doença pode evoluir clinicamente em três fases distintas, às quais estão associadas manifestações precoces e tardias, sendo estas últimas apenas verificadas na ausência de tratamento<sup>297</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A detecção (qualitativa) de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi sensu lato* no soro é feita por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*, com detecção por fluorescência (ELFA)<sup>297</sup>.
- Limitações/interferências: Em determinados soros que contenham anticorpos contra componentes do reagente podem ocorrer interferências<sup>297</sup>.
- Equipamento: VIDAS® da BIOMÉRIEUX.
- Interpretação clínica: Assim como nos restantes testes sorológicos, a presença de anticorpos IgM poderá indicar uma infeção causada por esta bactéria, da mesma forma que a presença conjunta de IgM e IgG. Nos casos em que só sejam detetados anticorpos do tipo IgG poderá significar que houve uma infeção no passado, resultando ou não em doença. De salientar ainda que, indivíduos no estado precoce da doença ou sob antibioterapia, podem produzir anticorpos IgM e/ou IgG anti-*Borrelia burgdorferi sensu lato* em quantidade muito fraca para poder ser detetado, pelo que os resultados negativos obtidos não devem excluir a possibilidade de infeção. Por este facto, indivíduos com antecedentes e/ou sintomas de borreliose de Lyme, mas cujos resultados são negativos, devem realizar nova colheita quatro a seis semanas mais tarde<sup>297</sup>.

Os sintomas clínicos, dados epidemiológicos e resultados de outros testes devem ser tidos em conta aquando da interpretação dos resultados deste imunoensaio<sup>297</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-Vírus Herpes *simplex* 1/2 (IGM E IGG)**

O vírus Herpes *simplex* (HSV), é um vírus da família *Herpesviridae*, com genoma de DNA de dupla-hélice e capsídeo icosaédrico envolvido por uma bicamada lipídica (envelope). Existem então dois tipos de HSV ubíquos e contagiosos, o HSV-1 e o HSV-2, também conhecidos por herpesvírus humano tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2), respetivamente, que são transmitidos por contacto direto com uma pessoa infetada. Para além de provocar infeções primárias, o HSV pode ser encontrado no ser humano na forma quiescente, provocando uma infeção latente e reativando a sua replicação sempre que existe uma fragilidade do sistema imunitário do indivíduo infetado<sup>298,299</sup>.

As infeções primárias por HSV-1, quando sintomáticas, provocam gengivoestomatite herpética, que é uma infeção das gengivas, boca, língua, rosto e/ou faringe. Em indivíduos com infeções latentes, quando reativado, o vírus manifesta-se na forma de herpes labial ou herpes ocular. Por outro lado, as infeções primárias provocadas por HSV-2 são, normalmente,

adquiridas pelo contato sexual, provocando um quadro de herpes genital, uma infecção caracterizada por lesões na área genital<sup>298,299</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A determinação qualitativa de HSV-1/2 IgM e HSV-1/2 IgG no soro é feita por imunoenensaio indireto por quimioluminescência<sup>298,299</sup>.
- Limitações/interferências: A contaminação bacteriana, inativação de calor ou a presença de anticorpos anti-rato nas amostras podem afetar os resultados do ensaio<sup>298,299</sup>.
- Equipamento: *MAGLUMI*<sup>®</sup> 800 da *SNIBE DIAGNOSTICS*.
- Interpretação clínica: Em infecções primárias por HSV, os anticorpos IgM começam a aparecer entre o terceiro e o sétimo dia após a infecção e atingem um pico entre as quatro a seis semanas, acabando por se tornar indetetáveis após dois meses. Por outro lado, os anticorpos IgG específicos para este vírus só aparecem uma ou duas semanas após o início da infecção e podem ser detetadas várias concentrações ao longo da vida<sup>298,299</sup>.

Estes dois anticorpos podem ser úteis na indicação de uma primo-infecção ou uma infecção passada, sendo que no primeiro caso podem estar presentes os dois anticorpos ou apenas IgM, enquanto que no segundo caso apenas são encontrados anticorpos do tipo IgG<sup>298,299</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-Vírus *Varicella zoster* (IGG)**

O vírus *Varicella zoster* (VZV), também designado de herpesvírus humano tipo 3 (HHV-3), é um vírus da família *Herpesviridae*, que está relacionado aos HSV por ter um genoma muito semelhante. Este vírus transmite-se por contacto direto ou por via aérea e o período de contágio começa vinte e quatro horas antes dos sintomas, prolongando-se seis ou sete dias após o início dos mesmos<sup>300</sup>.

A infecção por VZV resulta em duas manifestações clínicas, a varicela e a zona. A varicela é a infecção primária e contagiosa que se dissemina rapidamente nas populações sensíveis, como crianças ou adultos imunodeprimidos. Na maior parte dos casos, a varicela é diagnosticada em crianças e é caracterizada por uma ligeira febre e sensação de cansaço que acompanha o aparecimento de vesículas na pele. Contudo, em adultos, esta infecção traduz-se numa febre alta e sintomas gerais mais graves, como a pneumonia. Em relação à zona, pode-se dizer que esta resulta de uma reativação do VZV e atinge particularmente os adultos com níveis elevados de stress, traumatismos ou a fazer terapia com alguns medicamentos<sup>300</sup>.

De salientar que, indivíduos imunocomprometidos, normalmente, desenvolvem varicela progressiva e generalizada ou zona disseminada, que se não for corretamente tratada pode levar a complicações e até à morte<sup>300</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-VZV no soro é feita por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*, com detecção final por fluorescência (técnica ELFA)<sup>300</sup>.
- Limitações/interferências: Os resultados positivos obtidos em amostras de indivíduos imunodeprimidos que estejam a receber tratamento profilático com IgG sérica anti-VZV não constituem uma indicação fiável de primo-infecção por VZV<sup>300</sup>.
- Equipamento: VIDAS® da BIOMÉRIEUX.
- Interpretação clínica: A presença de anticorpos IgG anti-VZV indica um contacto anterior ao vírus, no entanto, não exclui a possibilidade de estar a decorrer uma infeção. Para diagnosticar uma infeção recente é necessário efetuar testes quantitativos em amostras colhidas durante a fase aguda da doença e a fase de convalescença, ou a pesquisa de anticorpos IgM anti-VZV<sup>300</sup>.

Os resultados dos testes IgG ou IgM anti-VZV devem ser interpretados tendo sempre em consideração os sintomas e o quadro clínico do indivíduo para estabelecer um diagnóstico<sup>300</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-Vírus Epstein-Barr**

O vírus Epstein-Barr (EBV), também conhecido por HHV-4, é um vírus da família *Herpesviridae*, com um genoma de DNA linear em dupla-hélice. A transmissão deste vírus é feita através da saliva e a sua replicação tem lugar no epitélio orofaríngeo, causando um quadro clínico de mononucleose infecciosa, também designada de doença do beijo. Esta doença é mais frequente em jovens adultos e o diagnóstico é feito com base, principalmente, nos sintomas clínicos (anginas, febre e linfadenopatia). A sorologia é utilizada para confirmar o diagnóstico, pois ajuda na exclusão de outras patologias e microrganismos que originem um quadro clínico semelhante<sup>301-303</sup>.

O diagnóstico sorológico da mononucleose baseia-se na detecção de anticorpos, produzidos pelo hospedeiro, em resposta aos diferentes antigénios, produzidos durante o ciclo viral. Assim, os primeiros antigénios a serem produzidos pelo EBV são os *Early Antigen* (EA), seguidos dos antigénios virais da cápside (VCA), ambos produzidos durante a fase lítica. Durante a fase latente, são produzidos os antigénios nucleares de Epstein-Barr (EBNA), o que faz com que sejam anticorpos indicativos de infeção adquirida no passado, ou seja, exclui um diagnóstico de primo-infecção<sup>301-303</sup>.

- Amostra: Soro.

- **Metodologia:** A detecção qualitativa de anticorpos do tipo IgG anti-EBNA, IgG anti-VCA e anti-EA e IgM anti-VCA no soro é feita por ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich* e detecção final por fluorescência (ELFA)<sup>301-303</sup>.
- **Limitações/interferências:** É necessário ter em conta que podem ocorrer reações cruzadas se a amostra contiver anticorpos dirigidos aos componentes do reagente<sup>301-303</sup>.
- **Equipamento:** VIDAS® da BIOMÉRIEUX.
- **Interpretação clínica:** No início da infecção provocada por EBV, com ou sem sintomatologia de mononucleose infecciosa, normalmente, estão presentes anticorpos anti-EA e anti-VCA do tipo IgM e IgG. Passada a fase aguda, durante o período de convalescença, os anticorpos IgG anti-VCA continuam a ser detetados, aparecendo também nesse período os anticorpos IgG anti-EBNA<sup>301-303</sup>. A interpretação destes doseamentos é um auxiliar no diagnóstico da mononucleose infecciosa e permite estabelecer o estado da infecção, como é demonstrado na tabela seguinte:

Tabela 16: Interpretação clínica dos resultados sorológicos para EBV.

Anticorpos IgM anti-VCA	Anticorpos IgG anti-VCA e anti-EA	Anticorpos IgG anti-EBNA	Interpretação dos resultados
Ausência	Ausência	Ausência	Indivíduo seronegativo (não infetado)
Presença	Ausência	Ausência	Primo-infecção inicial
Presença	Presença	Ausência	Primo-infecção aguda
Ausência	Presença	Presença	Indivíduo seropositivo (infecção antiga)
Presença	Presença	Presença	Perfil indeterminado

Fonte: Adaptado de VIDAS® EBV VCA IgM<sup>301</sup>, VIDAS® EBV VCA/EA IgG<sup>302</sup>, VIDAS® EBV EBNA IgG<sup>303</sup>.

## ANTICORPOS ANTI-Citomegalovírus (IGM E IGG)

O citomegalovírus (CMV), também designado de HHV-5 é um vírus da família *Herpesviridae* e o seu genoma é de DNA em dupla-hélice. O CMV é transmitido por contacto íntimo com uma pessoa infetada, ou seja, pode ser transmitido pela placenta, amamentação, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e relação sexual. Este vírus pode persistir, durante anos, no organismo de uma pessoa infetada e causar infeções recorrentes, no entanto, nem sempre causa doença, sendo a maior parte dos casos assintomáticos<sup>304,305</sup>.

Apesar de ser muitas das vezes assintomática, a infecção por CMV ou citomegalovirose pode trazer graves problemas em indivíduos imunocomprometidos ou se for adquirida durante a gravidez. Neste último caso, a infecção pode ser transmitida para o feto e trazer complicações graves se se tratar de uma primo-infecção materna. Os sintomas de uma infecção congénita pelo

CMV dependem da via de transmissão e do trimestre de gestação no qual ocorreu a infecção, pois quanto menor for a idade gestacional, maior é o risco de ocorrerem lesões graves no feto. A maior parte dos recém-nascidos infetados durante a gravidez nascem sem nenhum problema, no entanto, cerca de 10% dessas crianças apresentam mais tarde sequelas neurossensoriais, como surdez ou cegueira parcial ou total. Outras complicações como hepatoesplenomegália, hidrocefalia, microcefalia e prematuridade podem ser detetadas logo após o nascimento<sup>304,305</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A detecção de anticorpos IgM anti-CMV e o doseamento quantitativo de anticorpos IgG anti-CMV no soro são feitos por ensaios imunoenzimáticos do tipo *sandwich*, com detecção final por fluorescência (ELFA)<sup>304,305</sup>.

- Limitações/interferências: Nalgumas amostras que contenham anticorpos dirigidos contra componentes do reagente, podem ser verificadas interferências<sup>304,305</sup>. Para além disso, a detecção de anticorpos IgM anti-CMV em indivíduos imunodeprimidos pode ser difícil e é necessário ter isso em conta aquando da interpretação dos resultados<sup>304</sup>.

- Equipamento: VIDAS<sup>®</sup> da BIOMÉRIEUX.

- Interpretação clínica: A detecção dos anticorpos IgG anti-CMV é, normalmente, utilizada como teste para avaliação do estado imunitário dos indivíduos, sendo útil no diagnóstico de infeções primárias recentes, principalmente, na mulher grávida<sup>305</sup>, quando interpretado em conjunto com os resultados da detecção de anticorpos IgM anti-CMV<sup>304</sup>.

Por sua vez, os anticorpos IgM anti-CMV estão presentes na maioria das primo-infeções e podem ser detetados, dezasseis a vinte semanas após a infecção, sendo que podem aparecer novamente durante reativações<sup>304</sup>.

## **ANTICOPOS ANTI-Vírus da rubéola (IGM E IGG)**

O vírus da rubéola é um vírus da família *Togaviridae*, com genoma RNA de cadeia simples, que na maior parte dos casos provoca uma infeção de curta duração sem complicações. Contudo, se for contraída por uma mulher grávida, a infeção pelo vírus da rubéola pode ter consequências muito graves para o feto (infeção congénita), sobretudo, se ocorrer durante os três primeiros meses de gravidez<sup>306,307</sup>. Tendo isto em conta, é importante determinar a condição imunitária das mulheres em idade fértil, para prevenir complicações durante a gravidez<sup>307</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-rubéola e o doseamento quantitativo dos anticorpos IgG anti-rubéola no soro são feitos por ensaios imunoenzimático

por imunocaptura<sup>306</sup> e do tipo *sandwich*<sup>307</sup>, respetivamente, com deteção final por fluorescência (ELFA).

- Limitações/interferências: As interferências detetadas são, normalmente, em amostras que contêm anticorpos dirigidos aos componentes do reagente<sup>306,307</sup>.
- Equipamento: VIDAS<sup>®</sup> da BIOMÉRIEUX.
- Interpretação clínica: Ao contrário de outras infeções, o diagnóstico de uma infeção pelo vírus da rubéola baseia-se na sorologia, principalmente, na pesquisa de anticorpos IgM anti-rubéola. A deteção destes anticorpos está correlacionada com a presença de uma primo-infeção<sup>306</sup>, enquanto que a deteção de anticorpos IgG anti-rubéola poderá indicar uma infeção em curso ou antiga por este vírus. A deteção dos anticorpos IgG anti-rubéola são então uma ajuda no diagnóstico de infeção e são fundamentais para a avaliação do estado imunitário dos indivíduos, especialmente nas mulheres grávidas<sup>307</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* (IGM E IGG)**

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, cujo hospedeiro definitivo é o gato, mas também é um agente patogénico para homem, provocando uma infeção denominada de toxoplasmose. A transmissão é feita através da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de gato, que contêm oocistos do parasita, ou carne de porco ou ovelha contaminada e malcozinhada. Num indivíduo imunocompetente, a toxoplasmose é, geralmente, assintomática, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos ou em fetos infetados, podem ocorrer complicações<sup>308,309</sup>.

A infeção congénita é transmitida por mulheres com infeção aguda durante a gravidez através da passagem transplacentária do parasita<sup>308</sup>. A frequência e a gravidade das lesões para o feto dependem de vários fatores, como o tempo de gestação com que a mulher é infetada, a virulência da estirpe infetante, a quantidade de inóculo e a qualidade da resposta imunitária da mulher grávida<sup>308,309</sup>.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: A deteção (qualitativa) de anticorpos IgM anti-toxoplasma e o doseamento quantitativo dos anticorpos IgG anti-toxoplasma são feitos por ensaios imunoenzimático por imunocaptura<sup>308</sup> e do tipo *sandwich*<sup>309</sup>, respetivamente, com deteção final por fluorescência (ELFA).
- Limitações/interferências: Anticorpos dirigidos contra componentes do reagente encontrados nas amostras podem causar interferências<sup>308,309</sup>.

- Equipamento: VIDAS® da BIOMÉRIEUX.

- Interpretação clínica: O diagnóstico de uma infecção por *T. gondii* é auxiliado por evidências laboratoriais como a detecção de imunoglobulinas específicas IgM e IgG, no entanto, estas também podem ser utilizadas pelo clínico para determinação do estado imunitário do indivíduo para este tipo de infecção<sup>308,309</sup>.

O diagnóstico de uma infecção aguda adquirida durante a gravidez é feito também por detecção de uma seroconversão (em casos de primo-infecção) ou, no caso da grávida já possuir anticorpos específicos para este parasita (reinfeção por imunossupressão), por um aumento significativo do título destes anticorpos entre duas colheitas sequenciais<sup>308,309</sup>.

### **ANTICORPOS ANTI-Vírus SARS-CoV-2 (IGM E IGG)**

O novo coronavírus SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à família *Coronaviridae*, com genoma de RNA de cadeia simples e é transmitido por via aérea através de gotículas de secreções respiratórias. Foi identificado pela primeira vez em janeiro de dois mil e vinte na China, na cidade de Wuhan, sendo declarada pela OMS uma pandemia a onze de março de dois mil e vinte. Este vírus tem um período de incubação de dois a catorze dias e é responsável pela doença COVID-19, uma Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), que apresenta um quadro clínico geral de tosse, febre e dificuldade respiratória, e sintomas mais específicos como anosmia (perda do olfato) e ageusia ou disgeusia (disfunção gustativa)<sup>310</sup>.

- Amostra: Soro.

- Metodologia: A determinação qualitativa de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 no soro é feita por imunoensaio quimioluminescente<sup>311</sup>.

- Limitações/interferências: A contaminação bacteriana, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento ou anticorpos heterófilos presentes na amostra podem afetar os resultados deste teste<sup>311</sup>.

- Equipamento: MAGLUMI® 800 da SNIBE DIAGNOSTICS.

- Interpretação clínica: Os resultados de testes sorológicos devem ser usados como complemento para o diagnóstico ou exclusão de COVID-19, juntamente com os testes para detecção de ácido nucleico viral. Após a infecção por SARS-CoV-2, os antígenos virais estimulam o sistema imunológico a produzir uma resposta e os anticorpos correspondentes aparecem no sangue. Os primeiros a serem detetados são os anticorpos IgM anti-SARS-CoV-2, após três a cinco dias do início da infecção. Em seguida, a concentração destes diminui e podem ser detetados anticorpos específicos da classe IgG, aumentando a sua concentração rapidamente em circulação e permanecendo detetável mesmo após a resolução da infecção<sup>311</sup>.

#### 4.4.7. Análises Alergologia

As alergias são um conjunto de reações de hipersensibilidade do sistema imunitário a agentes do meio ambiente. Atualmente, é na especialidade médica de Imunoalergologia que se faz o diagnóstico e o tratamento das doenças alérgicas, no entanto, o laboratório e as suas técnicas cada vez mais sensíveis e específicas são fundamentais no auxílio do diagnóstico.

- Amostra: Soro.
- Metodologia: Para a determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa de alérgenos específicos ou triptase são utilizados testes *ImmunoCAP*<sup>®</sup>, que são ensaios imunoenzimáticos quimioluminescentes. Nesta tecnologia, o antígeno em estudo encontra-se acoplado, por ligação covalente, ao disco *ImmunoCAP*<sup>®</sup> e reage com os anticorpos específicos contidos na amostra (IgE ou IgG, dependendo do ensaio)<sup>312,313</sup>. O mesmo acontece na determinação da triptase contida na amostra, no entanto, o que se encontra acoplado ao disco *ImmunoCAP*<sup>®</sup> são anticorpos anti-triptase<sup>314</sup>.
- Equipamento: *PHADIA*<sup>®</sup> 250 da *THERMOFISHER SCIENTIFIC*.

#### ANTICORPOS IGE TOTAL

A quantidade de IgE em circulação é medida pelo teste *ImmunoCAP*<sup>®</sup> *Total IgE*.

- Interpretação clínica: Os anticorpos IgE, normalmente, aparecem como resultado da sensibilização aos alérgenos. Os níveis séricos de IgE total variam consoante o estado atópico e auxiliam no diagnóstico clínico de doenças alérgicas mediadas por IgE. Concentrações séricas elevadas de IgE total estão presentes em indivíduos com asma, rinite, dermatite atópica ou alergia ocupacional, ou em indivíduos com infeções intestinais parasitárias<sup>315</sup>.

#### ANTICORPOS IGE ESPECÍFICOS

Em indivíduos com doenças alérgicas, os sintomas desenvolvem-se imediatamente após a exposição aos alérgenos específicos. Este tipo de reação alérgica é desencadeada por anticorpos do tipo IgE, específicos contra o alérgeno<sup>312,316</sup>.

Para a deteção destes anticorpos são utilizados diferentes testes *ImmunoCAP*<sup>®</sup>, que podem funcionar como testes genéricos de rastreio (*Phadiatop*<sup>®</sup> e *Multi-rast*) ou como testes

específicos para determinado alergénio. Os testes IgE específicos realizados no CHMT estão discriminados no Apêndice IV.

▪ Interpretação clínica: Cada resultado deve ser interpretado, juntamente, com o quadro clínico, anamnese e outros exames clínicos e laboratoriais para um correto diagnóstico de doença alérgica específica a determinado alergénio.

## ANTICORPOS IGG ESPECÍFICOS

A determinação de anticorpos IgG específicos é feita pelo teste *ImmunoCAP® Specific IgG*, disponível no CHMT para os seguintes alergénios:

Tabela 17: Testes IgG específicos realizados no CHMT.

Tipo de teste <i>ImmunoCAP®</i>	Designação	Alergénios
<i>Multi-rast</i>	ex71	Penas de: ganso, galinha, pato e peru
<i>Multi-rast</i>	ex72	Penas de: periquito, canário, caturra, papagaio, tentilhão
<b>Específico</b>	m3	<i>Aspergillus fumigatus</i>

▪ Interpretação clínica: Os níveis de anticorpos IgG específicos são utilizados como biomarcadores de exposição em indivíduos que não são alérgicos. Para além disso, estes resultados têm sido utilizados para estudos clínicos de diferentes doenças alérgicas, perturbações gastrointestinais e doenças pulmonares como, por exemplo, a alveolite alérgica<sup>313</sup>.

## TRIPTASE

A triptase é uma enzima encontrada nos mastócitos. Os mastócitos são ativados durante as reações alérgicas mediadas por IgE, o que faz com que a triptase e outros mediadores inflamatórios (histamina) sejam libertados<sup>314</sup>.

Os níveis séricos de triptase são determinados, principalmente, pelas  $\alpha$ -triptases, imaturas, e  $\beta$ -triptases, maduras. A  $\alpha$ -triptase é enzimaticamente inativa e é encontrada na membrana celular dos mastócitos, pelo que se torna um bom marcador dos níveis basais de triptase. Em contraste, a  $\beta$ -triptase, depois de sintetizada, é armazenada nos grânulos dos mastócitos e libertada após uma reação alérgica.

O teste *ImmunoCAP® Tryptase* mede os níveis de triptase total, incluindo as formas  $\alpha$ -triptase e  $\beta$ -triptase.

- Interpretação clínica: A concentração base de triptase em circulação reflete o número de mastócitos existente e, por isso, níveis basais elevados de triptase no soro e/ou uma mastocitose podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento de reações alérgicas graves, particularmente em doentes com histórico<sup>314</sup>.

Por outro lado, níveis elevados de triptase total são, frequentemente, encontrados em indivíduos com reações anafiláticas sistémicas recentes. Estas concentrações elevadas devem-se, fundamentalmente, à elevação da  $\beta$ -triptase madura aquando da desgranulação dos mastócitos. O nível mais elevado desta enzima é, normalmente, atingido decorridos quinze a cento e vinte minutos do início da reação, o qual diminui lentamente, voltando ao nível basal passadas cerca de vinte e quatro horas do seu início, o que faz com que a triptase seja um bom indicador de anafilaxia<sup>314</sup>.

Os níveis elevados de triptase nas amostras *post-mortem* são particularmente importantes nos casos de suspeita de reação anafilática fatal, para esclarecer a causa de morte<sup>314</sup>.

#### **4.4.8. Outros testes**

##### **TESTE IMUNOLÓGICO DA GRAVIDEZ**

O *One Step hCG Pregnancy Test* da *SureStep*<sup>®</sup> é um teste rápido que deteta qualitativamente a presença de hCG numa amostra de urina, sendo usado como teste imunológico para deteção de gravidez<sup>317</sup>.

- Amostra: Urina (ocasional).
- Metodologia: Este dispositivo utiliza um imunoensaio cromatográfico para a deteção qualitativa de gonadotrofina coriónica humana nas amostras. A deteção é feita utilizando anticorpos anti-hCG na zona de teste e anticorpos policlonais na zona controlo, sendo que nesta última zona tem de haver sempre formação de uma linha visível para que o teste seja válido<sup>317</sup>.
- Limitações/interferências: Este teste pode originar falsos resultados negativos, quando a concentração de hCG está abaixo do nível de sensibilidade do teste. Por outro lado, também podem ocorrer falsos resultados positivos em amostras de indivíduos com doença trofoblástica gestacional e certos neoplasmas não trofoblásticos, incluindo tumores de testículo, cancro da próstata, da mama e de pulmão onde, geralmente, são encontrados níveis de hCG na urina elevados<sup>317</sup>.

- Procedimento: O dispositivo de teste deve ser colocado sempre numa superfície limpa e nivelada. Com o auxílio de um conta-gotas, transferir três gotas de urina para o poço de amostra e esperar três a quatro minutos até à leitura dos resultados. A leitura deve ser feita tendo em conta que a presença de uma linha colorida na região de teste indica um resultado positivo<sup>317</sup>.
- Desempenho do método: Este teste rápido apresenta uma sensibilidade e especificidade de 97,5%<sup>317</sup>.
- Interpretação clínica: Resultados positivos são esperados em mulheres grávidas. De salientar que este teste proporciona um diagnóstico presuntivo de gravidez, no entanto, o diagnóstico de confirmação deve ser feito com o auxílio de outros exames médicos e laboratoriais<sup>317</sup>.

## 5. Fase Pós-Analítica

A última etapa do processo de análise é a fase pós-analítica, onde são realizados procedimentos como a conferência das análises realizadas na fase analítica, o processamento pós-analítico das amostras analisadas e a transmissão de resultados ao clínico ou ao utente, através da entrega do boletim de análises. Saber gerir a fase pós-analítica no laboratório clínico torna-se também importante para manter a efetividade, qualidade e a segurança dos processos ao longo de todo o processo de análise e, assim, garantir a agilidade do atendimento e da emissão de resultados.

### 5.1. Processamento pós-analítico de amostras biológicas

O processamento pós-analítico das amostras biológicas implica o correto armazenamento e conservação das mesmas e varia consoante o tipo de amostra e análises que se efetuaram nos diferentes setores. O período de armazenamento de cada amostra é estabelecido de acordo com a data de validação do último parâmetro efetuado ou, no caso do setor de Microbiologia, esse prazo é determinado de acordo com a data de receção do produto no laboratório central, em Tomar.

Todas as amostras processadas no SPC são armazenadas em frigoríficos, de modo a serem conservadas a uma temperatura entre 2°C e 8°C durante o período referido anteriormente<sup>318</sup>.

*Tabela 18:* Período de armazenamento de amostras biológicas de acordo com o setor de processamento.

Setor	Produto	Período de armazenamento
<b>Imunoquímica</b>	Soro, plasma, urinas, líquidos biológicos e fezes	6 dias
	Urinas tipo II	Até ao final do dia
<b>Hematologia</b>	Sangue total	6 dias
	Plasma	Até ao final do dia
	Fezes, exsudado nasal, urina	1 dia
<b>Microbiologia</b>	Hemoculturas positivas	15 dias
	Outros produtos	6 dias

Fonte: Processamento pós-analítico de amostras biológicas (Instrução de Trabalho)<sup>318</sup>.

Terminado o período de armazenamento e conservação definido pelo SPC, as amostras são colocadas em sacos para eliminação de resíduos biológicos perigosos.

Para determinados parâmetros analíticos é necessário efetuar uma seroteca das respetivas amostras, que são armazenadas num congelador, a uma temperatura de -20°C. Neste caso, as amostras de soro usadas para imunofixações deverão ser armazenadas durante doze meses e as amostras de soro usadas para a realização de testes sorológicos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-Rubéola e anti-CMV de utentes grávidas, devem ser armazenadas durante nove meses. De referir que este tipo de armazenamento só existe no laboratório central do SPC.

## 5.2. Comunicação/Entrega de resultados

Os procedimentos analíticos requerem tempos definidos para a sua execução, ou seja, cada análise tem um tempo definido entre a receção da amostra e a saída do resultado<sup>319</sup>.

Em termos de prioridade na obtenção dos resultados, o SPC diferencia três situações: Emergência, para amostras com prioridade estabelecida por critério clínico e técnico; Urgência, para amostras com prioridade por indicação clínica; Rotina, para amostras sem prioridade estabelecida<sup>319</sup>.

Os resultados das análises de Emergência e Urgência são disponibilizados o mais rapidamente possível, sendo que o seu processamento não deverá ultrapassar as duas horas, exceto em amostras para análises microbiológicas. Por sua vez, os resultados das análises de Rotina são facultados no próprio dia, para utentes em internamento e até ao dia útil seguinte, para utentes de consultas externas. No entanto, existem algumas análises cujo procedimento analítico requer mais tempo e, portanto, o prazo de entrega das mesmas pode ser mais alargado. De referir ainda que, os resultados provenientes de laboratórios externos são anexados no processo clínico do utente aquando da receção no SPC<sup>319</sup>.

Os resultados de determinados parâmetros analíticos podem ainda ser considerados críticos (Tabela 19) e, como o próprio nome indica, carecem de intervenção imediata por parte do clínico. Neste caso, a comunicação dos resultados deverá ser feita pelo MPC/TSS que validou os mesmos e, somente, na primeira avaliação do utente, ou seja, a comunicação só será necessária quando os resultados forem considerados críticos *ad início*. De notar ainda que deverá sempre ficar registada a realização do contacto telefónico em comentário interno, no *modulab*<sup>320</sup>.

Tabela 19: Resultados críticos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados críticos</b>
<b>Hemoglobina</b>	< 6 g/dl
<b>Glicose</b>	< 50 mg/dl > 400 mg/dl
<b>Potássio</b>	< 2,8 mmol/L > 7 mmol/L
<b>INR</b>	> 6,0
<b>Bacilo álcool-ácido resistente</b>	Pesquisa positiva em exame direto ou cultural

Fonte: Comunicação de Resultados Críticos (Instrução de Trabalho)<sup>320</sup>.

A entrega de resultados, em mão, ao utente, só é feita nos casos de requisição externa, mediante a apresentação do documento para levantamento dos mesmos, dado pelo AT no ato do registo da colheita. No caso de utentes provenientes de consultas do CHMT, os resultados são disponibilizados informaticamente no processo clínico do mesmo<sup>12</sup>.

## **6. Sistema de Gestão da Qualidade**

A garantia de um elevado nível de qualidade no laboratório baseia-se no compromisso entre todos os elementos do sistema: fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos.

O Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) do CHMT, foi criado no âmbito do cumprimento da Norma NP EN ISO 9001:2008 e abrange serviços centrais, do qual o SPC é parte integrante, e serviços de apoio<sup>321</sup>. Em todos os procedimentos que integram o SGQ do CHMT encontram-se definidas as entidades responsáveis por cada ação, de modo a que esteja assegurada a definição de responsabilidade em relação a todas as atuações necessárias (intervenção direta ou auditoria) para garantir o correto funcionamento deste sistema<sup>322</sup>.

### **6.1. Sistema de Gestão de Qualidade no SPC**

O SPC planeia a realização da prestação de serviços e da análise de amostras biológicas de acordo com as necessidades dos utentes internos e externos e com a disponibilidade dos seus recursos. Toda esta atividade é planeada de forma consistente, de modo a que sejam assegurados os critérios e métodos necessários para que a sua execução e controlo sejam eficazes. Para que isso aconteça, o SPC efetua e mantém registos de todas as atividades desenvolvidas pelo serviço, através de Procedimentos, Protocolos e Instruções de Trabalho, e assegura que todas elas cumprem as regras e requisitos e que estão de acordo com as determinações da legislação e normas em vigor, nomeadamente pela Norma NP EN ISO 9001:2015.

Para além disso, o SPC garante ainda o cumprimento de requisitos de identificação e rastreabilidade em todas as fases de produção de serviços. Esta rastreabilidade é conseguida através da identificação de amostras de produtos biológicos com uma etiqueta de código de barras que acompanha a amostra em todas as fases do processo, assim como do registo de todos os colaboradores intervenientes em cada fase da atividade desenvolvida<sup>323</sup>.

Os documentos e registos resultantes das diversas fases de processamento da amostra encontram-se arquivados em áreas que oferecem proteção física e as condições adequadas à sua preservação<sup>323</sup>.

Para que o SGQ esteja sempre conforme os padrões definidos existem ainda Auditorias Internas no SPC, promovidas pelo SGQ do CHMT, que asseguram o desenvolvimento da estratégia de qualidade definida para todos os serviços do Centro Hospitalar nas áreas de

Certificação de Serviços, Acreditação Hospitalar, Gestão do Risco e Segurança do Doente. Tanto as Auditorias Internas, como as Auditorias Externas são realizadas anualmente e têm contribuído para implementar procedimentos importantes para a melhoria da qualidade dos serviços prestados pelo SPC.

## 6.2. Controlo da Qualidade Interno (CQI)

O CQI tem como principal objetivo a monitorização da precisão dos processos analíticos, de forma a detetar erros relativos aos equipamentos, operacionalidade ou reagentes.

Nos setores de Imunoquímica e Hematologia do SPC são utilizados dois ou três níveis de controlo, dependendo do equipamento e técnica usados, que cobrem gamas de valores normais e patológicos, de forma a proporcionarem intervalos de relevância em termos de decisão clínica. Estes controlos são realizados sempre que o equipamento inicie o seu trabalho, após manutenções preventivas, corretivas, calibrações, ou sempre que se julgue necessário, e os seus limites de aceitação são indicados pelo fabricante para cada analito. Os resultados dos controlos são compilados em cartas de Levey-Jenings, disponíveis no *modulab* e no *software* de cada equipamento, e interpretados segundo os critérios de aceitação definidos pelas regras de Westgard. Após o acompanhamento e desempenho dos equipamentos (mínimo de vinte doseamentos), o SPC poderá definir os seus próprios limites de aceitabilidade, não podendo, no entanto, exceder os dois desvios padrão relativamente aos valores indicados pelo fabricante. Estas alterações são registadas no *modulab*, no impresso adequado e, sempre que possível, no equipamento<sup>324</sup>.

No setor de Microbiologia, dadas as suas particularidades específicas, são controlados regularmente as fases consideradas críticas no processo, nomeadamente, a qualidade dos esfregaços e colorações e a manipulação e conservação de estirpes bacterianas. A utilização de estirpes ATCC, de características fenotípicas conhecidas, permite avaliar os procedimentos utilizados para a realização dos testes de identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos feito manualmente ou em equipamento automático<sup>324</sup>.

### 6.3. Controlo da Qualidade Externo (CQE)

A participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) permite reunir informação objetiva para a garantia da qualidade dos laboratórios, através da comparação do desempenho dos laboratórios inscritos em cada programa. A AEQ constitui uma forma de identificar diferenças interlaboratoriais, permitindo identificar situações não conformes e sugerir ações de melhoria contribuindo para a eliminação de problemas/erros<sup>325</sup>.

O SPC do CHMT encontra-se inscrito em vários programas de AEQ, fornecidos por entidades credenciadas. Todos os ensaios vêm acompanhados com documentação informativa de como manusear, hidratar, processar e armazenar as diferentes amostras, assim como, a calendarização da entrega dos resultados. Os controlos são tratados como amostras de rotina e, portanto, são registados no *modulab* e o responsável por cada etapa, desde a receção das amostras até à validação dos relatórios, deve ser registado no impresso próprio para o efeito<sup>326</sup>.

Tendo em conta que o SPC é constituído por três laboratórios, alguns programas de AEQ podem ter de ser partilhados e, neste caso, o processo de tratamento (hidratação e aliquotagem) da amostra é realizado no laboratório central, em Tomar. Neste caso, cada laboratório só determina os parâmetros em que está inscrito nos vários equipamentos.

Finalizada a análise, as amostras devem ser conservadas, sempre que possível, até à avaliação do relatório. O responsável pelo CQE deve enviar os resultados de cada programa e, aquando a chegada dos relatórios, disponibilizá-los na pasta partilhada do SPC. A avaliação do relatório é feita pelo responsável de cada setor analítico, que deve avaliar se os resultados estão conformes e, caso isso não aconteça, investigar as possíveis causas e documentá-las<sup>326</sup>.

## Conclusão

A realização do estágio curricular num laboratório de Análises Clínicas inserido em ambiente hospitalar, como é o caso do laboratório central do Serviço de Patologia Clínica do CHMT, tornou-se numa mais valia, uma vez que, proporcionou uma abordagem do processo laboratorial diferente da realizada num laboratório de rotina. Para além de toda a atividade efetuada num laboratório de Análises Clínicas, foi ainda possível ter contacto com casos clínicos, acompanhando o processo, desde a chegada da amostra ao laboratório até à validação biopatológica, o que permitiu aplicar os conhecimentos adquiridos durante todo o mestrado. Por outro lado, e por se tratar de um laboratório certificado com um sistema de gestão da qualidade estruturado e funcional, os princípios de controlo e garantia da qualidade foram mais bem compreendidos e aplicados em todos os processos realizados ao longo do estágio.

Tendo em conta a situação pandémica vivida desde março de dois mil e vinte, que levou à interrupção do período de estágio durante três meses, foi necessária uma nova adaptação à rotina laboratorial, principalmente num ambiente de gestão de recursos técnicos e humanos. Esta condição contribuiu para que alguns objetivos fossem mais aprofundados, nomeadamente, a planificação e organização diárias das atividades laboratoriais desenvolvidas, consoante a evolução da situação, assim como, a realização de um trabalho autónomo junto das equipas multidisciplinares. Para além disso, com as constantes alterações de rotina e de ferramentas para fazer face à pandemia, particularmente novos parâmetros de análise e metodologias laboratoriais, foi construída uma capacidade crítica e autocrítica perante a apresentação de soluções para determinado problema ou falha.

Em suma, consideram-se cumpridos todos os objetivos propostos, com a mais valia de poder entrar na envolvimento de todo o trabalho realizado em situações de crise, como foi o caso da pandemia de COVID-19, onde todos os profissionais trabalham diariamente para que a prestação de cuidados de saúde seja feita com a melhor qualidade e prontidão.

## Apêndices

### Apêndice I: Material usado para colheita de produtos biológicos.

Tabela 20: Material de colheita de produtos biológicos utilizados no CHMT.

Material	Designação	Indicação	
<b>Copo</b>	Recipiente de plástico graduado (ou não), transparente, estanque, hermético, de boca larga, resistente, com tampa de rosca, com ou sem colher/espátula, podendo ser ou não esterilizado e estar embalado individualmente ou não.	Copo sem colher/espátula para urina, expetoração, esperma, saliva, pus e outros líquidos biológicos	
		Copo com colher/espátula para fezes	
<b>Frasco</b>	Recipiente de plástico graduado, estanque, hermético, resistente e de boca larga, com tampa de rosca, podendo ser ou não esterilizado.	Urina a tempo determinado	
<b>Tubo</b>	Tubo de plástico de fundo cónico ou redondo, graduado, transparente, estanque, hermético, resistente, com tampa de rosca, esterilizado.	Urina e outros líquidos biológicos	
<b>Saco coletor pediátrico</b>	Saco esterilizado com abertura e adesivo.	Urina proveniente de crianças sem controlo do esfíncter	
<b>Zaragatoa</b>	Zaragatoa esterilizada com haste rígida de madeira e ponta de algodão seco.	Exsudados (exceto exsudado uretral) Exsudado uretral, ocular e nasofaríngeo	
	Zaragatoa esterilizada com haste semirrígida, ponta de algodão seco e meio de transporte em tubo de plástico de transporte.		
	Zaragatoa esterilizada com haste de plástico e ponta de polimetano em tubo de plástico de transporte.		
	Zaragatoa esterilizada com haste metálica fina e flexível e ponta de algodão seco em tubo de plástico de transporte.		
<b>Garrafa de hemocultura</b>	Frasco de cultura de fundo pano, resistente, para cultura e isolamento de microrganismos: aeróbios (tampa azul), anaeróbios (tampa roxa), micobactérias e micológicos.	Sangue, líquidos biológicos.	
<b>Frasco Portagerm™ (bioMérieux)</b>	Meio recomendado para o transporte, à temperatura ambiente, das colheitas líquidas, pois tem as condições necessárias para manter a viabilidade dos microrganismos (aeróbios e anaeróbios).	Sangue, líquidos biológicos, pus	

Fonte: Adaptado de Condições Gerais de Colheita e Conservação de Amostras Biológicas (Protocolo)<sup>7</sup>.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

Apêndice II: Meios de cultura.

Tabela 21: Descrição dos meios de cultura utilizados no CHMT.

Meio		Classificação	Princípio
Caldo de enriquecimento <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)		Líquido Não seletivo	Caldo de enriquecimento universal com coração e cérebro de gado.
Selenito		Líquido Seletivo	Meio de enriquecimento utilizado para isolamento de espécies dos gêneros <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> .
Gelose de sangue (GS)		Sólido Não seletivo	Meio complementado com sangue de carneiro, que permite a discriminação do tipo de hemólise, critério básico para a orientação da identificação de algumas bactérias.
Gelose de Chocolate	Gelose de chocolate enriquecida com <i>PolyViteX</i> (PVX)	Sólido Não seletivo	Meio para o crescimento de estirpes fastidiosas ( <i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ). Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e <i>PolyViteX</i> .
	Gelose seletiva para bactérias do gênero <i>Haemophilus</i> (HAE)	Sólido Seletivo	Meio composto pelos mesmos nutrientes e fatores que PVX e a seletividade para isolamento de <i>Haemophilus spp.</i> é obtida por uma combinação de antibióticos.
	Gelose chocolate com vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim (VCAT)	Sólido Seletivo	Meio composto pela mesma base nutritiva e fatores que os meios PVX e HAE e a seletividade para <i>Neisseria spp.</i> é obtida por combinação de antibióticos (vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim).
Gelose <i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i> (CLED)		Sólido Seletivo	Meio para diferenciar as bactérias que fermentam a lactose (colônias amarelas) das que não fermentam (colônias verdes, azuis ou incolores), através do indicador azul de bromotimol. A composição do meio, com fraco conteúdo em eletrólitos, previne o <i>swarming</i> por <i>Proteus sp.</i>
Gelose Columbia (CNA)		Sólido Seletivo	Meio que permite apenas o crescimento de bactérias Gram-positivas. A maioria das bactérias Gram-negativas são inibidas pela presença de ácido nalidíxico e colistina.
Gelose Manitol Salgado		Sólido Seletivo e diferencial	Meio de isolamento para <i>Staphylococcus sp.</i> , principalmente <i>Staphylococcus aureus</i> (fermentador de manitol – colônias amarelas). O alto teor de cloreto de sódio limita o crescimento de outras bactérias.
Gelose MacConkey (MAC)		Sólido Seletivo e diferencial	Meio de isolamento para bactérias Gram-negativas, fermentadoras (colônias rosa ou vermelhas) e não fermentadoras de lactose (colônias incolores ou bege). A seletividade é fornecida pelos sais biliares e violeta de cristal.
Gelose Hektoen (HEKT)		Sólido Seletivo e diferencial	Meio de isolamento para <i>Salmonella sp.</i> e <i>Shigella sp.</i> . Microrganismos que fermentem um dos três açúcares contidos no meio formam colônias amarelas ou rosa-amareladas; os outros produzem colônias verdes ou verde-azuladas ( <i>Salmonella sp.</i> e <i>Sigella sp.</i> ). Microrganismos que produzam H <sub>2</sub> S formam colônias com centro negro (algumas espécies de <i>Salmonella sp.</i> ). A inibição de microrganismos Gram-positivos obtém-se pela mistura de sais biliares e de corantes.
Gelose <i>Campyloset</i> (CAMPY)		Sólido Seletivo	Meio de isolamento para <i>Campylobacter sp.</i> (colônias pequenas e acinzentadas). A seletividade é obtida por antimicrobianos que inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos.

Meio para a detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	Sólido Cromogéneo	Meio para identificação presuntiva de MRSA, com base na coloração verde de colónias que produzem $\alpha$ -glicosidase e, por isso, são resistentes à cefoxitina.
Meio para o rastreio de <i>Streptococcus</i> do grupo B (STRB)	Sólido Cromogéneo	Meio para identificação presuntiva de <i>Streptococcus agalactie</i> (Grupo B). Este meio tem três substratos cromogéneos de modo a formar colónias cor de rosa claro a vermelho.
Gelose de Sabouraud com cloranfenicol (SAB)	Sólido Seletivo	Meio para o isolamento de leveduras e fungos. A acidificação do meio e a grande concentração de peptonas e de dextrose favorece o crescimento de fungos e a presença de gentamicina e cloranfenicol inibe o crescimento bacteriano.
Gelose <i>Candida</i> (CAN)	Sólido Cromogéneo	Meio para isolamento de fungos leveduriformes e identificação de <i>Candida albicans</i> , que apresenta uma cor azul devido à hidrólise do substrato cromogéneo pela hexosaminidase.

Fonte: Adaptado de Culturas Primárias (Instrução de Trabalho)<sup>95</sup>.

Apêndice III: Classes de antimicrobianos.

Tabela 22: Antimicrobianos em disco usados para TSA manual no setor de Microbiologia do CHMT.

		Classe	Ação	Utilizados no CHMT
Antibacterianos	β-lactâmicos	Penicilinas	Bactericida Inibição da síntese da parede celular	Ampicilina Amoxicilina (associada ao Ácido clavulânico) Oxacilina Piperacilina (associada ao Tazobactam)
		Cefalosporinas (1ª à 5ª geração)	Bactericidas Inibição da síntese da parede celular	2ª geração: Cefuroxima 3ª geração: Ceftriaxone, Ceftazidima
		Carbapenemes	Bactericidas Inibição da síntese da parede celular	Imipenem, Meropenem, Ertapenem
		Monobactâmicos	Bactericidas Inibição da síntese da parede celular	
		Inibidores das β-lactamases	Inativação das β-lactamases, o que permite a atividade do antibiótico principal	Ácido clavulânico (associado à Amoxicilina) Tazobactam (associado à Piperacilina)
	Quinolonas	Bactericidas Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Ciprofloxacina	
	Glicopéptidos	Bactericida Inibição da síntese da parede celular	Vancomicina	
	Oxazolidinonas	Bacteriostático Inibição da síntese proteica	Linezolid	
	Aminoglicosídeos	Bactericidas Inibição da síntese da parede celular	Amicacina Gentamicina	
	Macrólidos	Bacteriostáticos Bactericidas em altas doses (inibição da síntese proteica)	Eritromicina	
	Lincosamidas	Bacteriostático Inibição da síntese proteica	Clindamicina	
	Nitrofuranos	Bactericida Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Nitrofurantóina	
	Sulfonamidas	Bacteriostático Inibição da síntese de ácido fólico e purinas	Sulfametoxazol (associado ao Trimetoprim)	
Tetraciclina	Bacteriostático Inibição da síntese proteica			

Esta página foi deixada propositadamente em branco

## Apêndice IV: Análises Alergologia.

Tabela 23: Testes *ImmunoCAP*® para deteção de anticorpos IgE específicos realizados no CHMT.

Categoria	Subcategoria	Tipo de testes <i>ImmunoCAP</i> ®	Designação	Alergénio
Alimentares	Multi-rast		fx2	Atum, bacalhau, camarão, mexilhão azul, salmão
			fx5	Leite, clara de ovo, bacalhau, trigo, amendoim, grão de soja
	Específicos		f1	Clara de ovo
			f2	Leite
			f3	Bacalhau
			f4	Trigo
			f5	Centeio
			f7	Aveia
			f13	Amendoim
			f14	Soja
			f17	Avelã
			f20	Amêndoa
			f24	Camarão
			f25	Tomate
			f26	Carne de porco
			f27	Carne de vaca
			f33	Laranja
			f44	Morango
			f49	Maçã
			f75	Gema de ovo
			f76	$\alpha$ -lactoalbumina
			f77	$\beta$ -lactoalbumina
			f78	Caseína
			f79	Glúten
			f84	Kiwi
			f93	Cacau
			f95	Pêssego
			f98	Gliadina
			f207	Ameijoia
			f232	Ovalbumina
			f233	Ovomucoide
			f245	Ovo (gema e clara)
			f256	Noz
			f258	Lula
			f307	Pescada
	f308	Sardinha		
	Recombinantes		f323	Ovo de galinha, Ovotransferrina (nGal d 3)
			k208	Ovo de galinha, Lisozima (nGal d 4)
			f351	Camarão, Tropomiosina (rPen a 1)
			f355	Capra, Parvalbumina (rCyp c 1)
			f416	Trigo, Omega-5 Gliadina (rTri a 19)
			f419	Pêssego, PR-10 (rPru p 1)
			f420	Pêssego, LTP (rPru p 3)
f421			Pêssego, Profilina (rPru p 4)	
f426			Bacalhau 1, Parvalbumina (rGad c 1)	
f433			Trigo, LTP (rTri a 14)	
Inalantes			Rastreio	<i>Phadiatop</i> ®
	Aves	Multi-rast	ex71	Penas de: ganso, galinha, pato, peru
			ex72	Penas de: periquito, canário, caturra, papagaio, tentilhão
	Árvores	Multi-rast	tx7	Oliveira, salgueiro, pinheiro, eucalipto, acácia, malaleuca
			Específicos	t3
		t7		<i>Quercus alba</i> (sobreiro, azinheiro, azinho, carvalho, roble, alvar)
		t11		Plátano
		t14		Álamo, faia, choupo
		t16		Pinheiro manso
		t18		<i>Eucalyptus spp.</i>
		t19		Oliveira
		Gramíneas	Multi-rast	gx4
	Específicos			g2
			g3	Panasco
			g5	Azevém
			g6	Rabo-gato
			g12	Pólen de centeio
	g14		Pólen de aveia	

	Ervas Infestantes	Multi-rast	g15	Pólen de trigo	
			g201	Pólen de cevada	
		Específicos	wx3	<i>Artemisia vulgaris</i> , corrijó, vara de ouro, <i>Solidago virgaurea</i> , tanchagem, pé de ganso, urtiga maior, urtigão	
			w3	<i>Ambrosia trifida</i>	
			w6	<i>Artemisia vulgaris</i>	
			w10	<i>Chenopodium album</i> (pé de ganso)	
			w19	<i>Parietaria officinalis</i>	
	w21	<i>Parietaria judaica</i>			
	Fungos	Multi-rast	mx2	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Helminthosporium halodes</i>	
		Específicos	m6	<i>Alternaria alternata</i>	
			m3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	Epitélios de animais	Específicos	e1	Caspa de gato	
			e3	Caspa de cavalo	
			e5	Caspa de cão	
	Ácaros	Específicos	d1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
			d2	<i>Dermatophagoides farinae</i>	
			d71	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	
Recombinantes		d202	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (rDer p 1)		
		d203	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (rDer p 2)		
		d205	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , Tropomiosina (rDer p 10)		
		d209	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (rDer p 23)		
Outros	Específico	h2	Pó da casa		
<b>Venenos</b>	Específicos	i1	Veneno de abelha ( <i>Apis mellifera</i> )		
		i3	Veneno de vespa ( <i>Vespula spp.</i> )		
		i4	Veneno de vespa do papel ( <i>Plistes spp.</i> )		
	Recombinantes	i209	Vespa (rVes v 5)		
		i211	Vespa, Fosfolipase A1 (rVes v 1)		
<b>Fármacos</b>	Específicos	c1	Penicilina G		
		c2	Penicilina V		
		c5	Ampicilina		
		c6	Amoxicilina		
				i71	Mosquito comum ( <i>Aedes communis</i> )
<b>Outros</b>	Específicos	k82	Látex		
				p4	<i>Anisakis sp.</i>

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



## **Parte II: Monografia**

*“Gravidez e pré-eclâmpsia: Diagnóstico e Prevenção”*

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina Crespo Ferreira da Silva Marques

Mestrado em Análises Clínicas



## Resumo

A pré-eclâmpsia é uma doença hipertensiva da gravidez que afeta cerca de 2 a 8% das gestações mundiais. Apresenta-se como um distúrbio multissistêmico da gravidez, caracterizado clinicamente por hipertensão e proteinúria, disfunção uteroplacentária, ou disfunção de outros órgãos, com início após as vinte semanas de gestação.

Estudos epidemiológicos têm sugerido que algumas características maternas pré-gravidez podem aumentar o risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia, como é o caso de histórico de doença hipertensiva durante uma gravidez anterior e outras doenças maternas adjacentes, assim como, nuliparidade, idade materna avançada, obesidade, história familiar de pré-eclâmpsia ou gravidez multi-fetal.

Apesar da etiologia ainda ser pouco clara, sabe-se que a placenta é fundamental na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e que esta progride em dois estádios: placentação anormal, durante o primeiro trimestre, e desenvolvimento da síndrome materna, no segundo e terceiro trimestres de gestação. O excesso de inflamação provocada pela resposta do sistema imunológico ao stress oxidativo, assim como, o dano endotelial causado pelo processo fisiopatológico isquêmico, fazem com que a maior parte dos órgãos maternos se encontre afetada. Esse comprometimento pode levar ao desenvolvimento de complicações materno-fetais durante o período perinatal, como a síndrome de HELLP, eclâmpsia e restrição do crescimento intra-uterino mas também, a longo prazo, como doenças cardiovasculares.

A avaliação inicial de uma grávida com suspeita de pré-eclâmpsia deve ser feita com base numa apreciação completa do estado de saúde materno e fetal, com recurso aos resultados dos exames laboratoriais e de estudos de imagem que permitam uma intervenção precoce e possível prevenção da doença.

Atualmente, o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é o parto. Contudo, nos casos de pré-eclâmpsia com desenvolvimento de complicações em fases precoces da gestação, a aplicação de terapia eficaz pode ser uma mais valia para a estabilização da condição materna ou fetal nos casos em que ainda não é recomendada a interrupção da gravidez. Para além disso, estudos recentes têm vindo a mostrar a importância da prevenção de modo a melhorar as taxas de mortalidade materno-fetal provocadas pela pré-eclâmpsia.

**Palavras-chave:** pré-eclâmpsia, hipertensão, prevenção, diagnóstico



## **Abstract**

Preeclampsia is a pregnancy hypertensive disease that affects about 2 to 8% of pregnancies worldwide. It presents itself as a multisystemic pregnancy disorder, clinically characterized by hypertension and proteinuria, uteroplacental dysfunction, or dysfunction of other organs, after the twentieth week of gestation.

Epidemiological studies have suggested that some pre-pregnancy maternal characteristics may increase the risk of developing pre-eclampsia, such as a history of hypertensive disease during a previous pregnancy and other adjacent maternal diseases, as well as nulliparity, advanced maternal age, obesity, family history of pre-eclampsia or multi-fetal pregnancy.

Although the etiology is still unclear, it is known that the placenta is essential in preeclampsia pathophysiology and that it progresses in two stages: abnormal placentation, during the first trimester, and development of the maternal syndrome, in the second and third trimesters. gestation. The excess of inflammation caused by the immune system's response to oxidative stress, as well as the endothelial damage caused by the ischemic pathophysiological process causes most of the maternal organs to be affected. This impairment can lead to the development of maternal-fetal complications such as HELLP syndrome, eclampsia and intrauterine growth restriction during the perinatal period as well as cardiovascular diseases in the long term.

The initial assessment of a pregnant woman suspected of having pre-eclampsia should be based on a thorough assessment of the maternal and fetal health status, using the results of laboratory tests and imaging studies that allow early intervention and possible prevention of the disease.

Currently, the only definitive treatment for pre-eclampsia is childbirth. However, in cases of pre-eclampsia with the development of complications at an early stage of pregnancy, the application of effective therapy can be an asset for stabilizing the maternal or fetal condition in cases where termination of pregnancy is not yet recommended. In addition, recent studies have shown the importance of prevention in order to improve maternal-fetal mortality rates caused by pre-eclampsia.

**Keywords:** pre-eclampsia, hypertension, prevention, diagnosis



# 1. Metodologias

A execução desta monografia teve em conta uma pesquisa académica, primeiramente através de uma pesquisa exploratória e, numa segunda fase, de uma pesquisa explicativa sobre o tema pré-eclâmpsia. A fase de pesquisa exploratória teve como principal objetivo a familiarização com o tema em estudo, o que possibilitou uma compreensão geral sobre alguns aspetos importantes da gravidez e pré-eclâmpsia, como a definição de pré-eclâmpsia, relação pré-eclâmpsia-gravidez e a importância do estudo desta patologia atualmente. A segunda fase, de pesquisa explicativa, surgiu como forma de correlacionar e associar ideias, bem como aprofundar o tema em estudo através do conhecimento científico.

A pesquisa académica teve uma duração aproximada de um ano, num período compreendido entre janeiro e dezembro de dois mil e vinte e focou-se, principalmente, na leitura de artigos científicos, tanto originais, como de revisão, publicados entre dois mil e nove e dois mil e vinte. Toda a pesquisa foi feita nas plataformas de pesquisa *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>), com recurso a palavras-chave como pré-eclâmpsia, hipertensão gestacional, gravidez, síndrome de HEELP, eclâmpsia, entre outros. Também foram consultados alguns livros com relevância na área da saúde e trabalhos académicos da área da medicina, de modo a compreender melhor alguns aspetos anatómicos, essenciais para o entendimento do tema em estudo. Os principais sites consultados foram o site oficial da Organização Mundial de Saúde (OMS) (<https://www.who.int/>), do *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) (<https://www.nice.org.uk/guidance>), do *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (<https://www.acog.org/>) e da Sociedade Portuguesa de Hipertensão (<https://www.sphta.org.pt/pt>).

Terminada a pesquisa foi feita uma revisão bibliográfica de todo o conteúdo pesquisado e elaborada a monografia que se segue.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

## 2. Introdução

A gravidez é um estado fisiológico da mulher que se inicia quando ocorre a fecundação. Durante cerca de trinta e seis a quarenta semanas (aproximadamente nove meses) depois da fecundação, o organismo materno sofre várias alterações fisiológicas que são importantes e necessárias para o desenvolvimento do feto. No entanto, quando ocorrem falhas nos processos necessários para a adaptação do organismo materno à gravidez, desenvolvem-se patologias que podem pôr em risco a saúde fetal, mas também a saúde materna.

As síndromes hipertensivas da gravidez são um conjunto de doenças provocadas por uma má adaptação às alterações hemodinâmicas e metabólicas induzidas pela gestação. Neste grupo de doenças estão incluídas a hipertensão gestacional, a hipertensão crónica, a pré-eclâmpsia e a pré-eclâmpsia sobreposta, que desempenham um papel significativo na morbidade e mortalidade materna<sup>327</sup>. Entre os distúrbios hipertensivos que trazem complicações à gravidez, a pré-eclâmpsia destaca-se como a principal causa de mortalidade e morbidade materna<sup>328,329</sup>, mas também perinatal<sup>329</sup>. Contudo, a maioria das mortes provocadas pela pré-eclâmpsia ou pelas suas complicações pode ser evitadas através de um diagnóstico precoce, da prestação adequada de cuidados de saúde pré e pós-natais, assim como, do uso de terapia profilática em mulheres com fatores de risco para o desenvolvimento desta síndrome.

Por se tratar de um tema atual e ainda em constante evolução foi elaborada esta monografia, que visa sistematizar conceitos e todo o trabalho que foi desenvolvido até ao momento em relação à incidência da pré-eclâmpsia no período gestacional, assim como, métodos de diagnóstico aplicados e terapia profilática recomendada.

### 3. Definição clínica

A pré-eclâmpsia é um distúrbio multissistémico da gravidez<sup>330,331</sup> (síndrome)<sup>332</sup>, caracterizado clinicamente por hipertensão<sup>331,333-335</sup> e pelo menos um dos seguintes sinais<sup>333</sup>: proteinúria<sup>331-336</sup>; disfunção uteroplacentária; ou disfunção de outros órgãos<sup>333,335</sup>; com início após as vinte semanas de gestação<sup>331-337</sup>.

A hipertensão é o aumento da pressão arterial sistólica para um valor igual ou superior a 140 mmHg e/ou da pressão arterial diastólica para um valor igual ou superior a 90 mmHg<sup>331-338</sup>, numa grávida previamente normotensa<sup>332,334,335</sup>. Por sua vez, a proteinúria é definida pela presença de um valor superior ou igual a 300 mg de proteína numa amostra de urina de vinte e quatro horas<sup>335,337</sup>, em mulheres grávidas sem histórico de proteinúria<sup>332</sup>. Durante muitos anos, a pré-eclâmpsia foi caracterizada apenas pelo surgimento de novo de hipertensão e proteinúria. No entanto, a definição atualizada<sup>335</sup> de pré-eclâmpsia, tem em conta também outros requisitos para o seu diagnóstico, como a presença de danos noutros órgãos, como fígado, sistema neurológico, sistema hematológico ou comprometimento renal<sup>333</sup>, pois algumas mulheres desenvolviam manifestações sistémicas antes da deteção de proteinúria<sup>334</sup>.

Atualmente, a pré-eclâmpsia pode ser classificada em pré-eclâmpsia de início precoce ou placentária, quando surge antes das trinta e quatro semanas de gestação, e pré-eclâmpsia de início tardio ou materna, que surge após as trinta e quatro semanas de gestação<sup>335,339-341</sup>. Esta classificação surgiu devido às diferenças na apresentação clínica, epidemiologia e de morbilidade destes dois tipos de pré-eclâmpsia<sup>335</sup>, sendo a pré-eclâmpsia de início tardio a mais comum e, geralmente, menos grave que a pré-eclâmpsia de início precoce<sup>339,340</sup>. Para facilitar no diagnóstico, estabeleceu-se que a pré-eclâmpsia de início precoce, mais grave, é caracterizada por qualquer uma das seguintes características<sup>335</sup>: hipertensão com valores de pressão arterial sistólica iguais ou superiores a 160 mmHg e/ou valores de pressão arterial diastólica iguais ou superiores a 110 mmHg<sup>335,336,338</sup>; insuficiência hepática<sup>335,336</sup>, com aumento das enzimas hepáticas<sup>334,335</sup>, dor no quadrante superior direito persistente ou dor epigástrica<sup>335</sup>; distúrbios cerebrais ou visuais<sup>335,336</sup> como, por exemplo, dor de cabeça<sup>336,338</sup>; trombocitopenia<sup>334-336,338</sup>, insuficiência renal ou edema pulmonar, de início recente<sup>335,336</sup>.

É ainda de referir que a pré-eclâmpsia pode, também, ser diagnosticada a mulheres com hipertensão crónica, desde que desenvolvam de novo os sinais ou sintomas anteriormente descritos e que são compatíveis com pré-eclâmpsia<sup>333</sup>.

## 4. Epidemiologia

A pré-eclâmpsia é uma doença hipertensiva da gravidez que tem vindo a aumentar a sua prevalência ao longo das últimas três décadas<sup>342</sup> afetando, atualmente, cerca de 2 a 8% das gestações mundiais<sup>334,337,343,344</sup>. A maioria dos casos tem início no final do terceiro trimestre da gravidez, originando a pré-eclâmpsia de início tardio, mas aproximadamente 10% das gestantes com esta síndrome desenvolvem-na antes das trinta e quatro semanas de gestação (pré-eclâmpsia de início precoce)<sup>344</sup>.

Esta síndrome é uma das principais causas de mortalidade e morbilidade materna e perinatal<sup>332,334,337,338,341,343-345</sup> em todo o mundo, sendo responsável por mais de setenta mil mortes maternas e quinhentas mil mortes fetais anualmente<sup>334</sup>. Cerca de 90% dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento, devido aos poucos recursos e aos fracos cuidados perinatais, pós-natais e neonatais<sup>345</sup>, especialmente em grávidas com pré-eclâmpsia de início precoce<sup>338</sup>. Nos países desenvolvidos, apesar de melhores acessos a cuidados de saúde maternos e neonatais, as taxas de distúrbios hipertensivos da gravidez, incluindo a pré-eclâmpsia, também têm vindo a aumentar, sendo as mulheres afro-americanas as que apresentam maior risco de mortalidade quando comparadas com as mulheres hispânicas, americanas, indianas, de raça branca, asiáticas ou das ilhas do Pacífico<sup>335</sup>.

A pré-eclâmpsia é ainda responsável por cerca de 20 a 30% dos nascimentos prematuros<sup>333</sup> e, apesar da sua deteção precoce, pode provocar doenças não transmissíveis de longo prazo na mãe e no recém-nascido<sup>337</sup>.

## 5. Fatores de risco

Estudos epidemiológicos têm sugerido que algumas características maternas pré-gravidez podem aumentar o risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia<sup>334</sup>.

Segundo as diretrizes emitidas em dois mil e dezanove pelo *National Institute for Health and Care Excellence*, (NICE), do Reino Unido, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e a Sociedade Portuguesa de Hipertensão, as mulheres grávidas podem ser classificadas em dois grupos aquando da avaliação do risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia: alto risco e risco moderado<sup>333,336,346,347</sup>. No entanto, existem algumas nuances entre estas três organizações que fazem com que alguns fatores de risco sejam agrupados de modo diferente.

Assim, segundo as diretrizes do NICE e da Sociedade Portuguesa de Hipertensão, são consideradas de **alto risco** as grávidas que tenham um dos seguintes fatores de risco:

- histórico de doença hipertensiva durante uma gravidez anterior<sup>328,333,336,342,348</sup>;
- hipertensão crónica<sup>328,333–335,337,342,348,349</sup>;
- doença renal crónica<sup>328,333–336,342,348,349</sup>;
- doença autoimune<sup>328,333,336,342,348,349</sup> (lúpus eritematoso sistémico<sup>328,333,348</sup> ou síndrome antifosfolípídica<sup>328,333,334,348</sup>);
- diabetes *mellitus* do tipo I ou tipo II<sup>328,333–337,342,348,349</sup>.

Por outro lado, são consideradas de **risco moderado** as grávidas que tenham um dos seguintes fatores de risco:

- nulípara<sup>332–336,342,348,349</sup>;
- idade materna avançada<sup>328,334–336,342,348</sup> (superior ou igual a quarenta anos)<sup>333,348</sup>;
- intervalo entre gravidez de mais de dez anos<sup>333,336,348</sup>;
- obesidade<sup>328,334,335,337,342,344,349</sup> (índice de massa corporal [IMC] superior ou igual a 35 kg/m<sup>2</sup>)<sup>333,336,348</sup>;
- história familiar de pré-eclâmpsia<sup>328,333,335,336,342,348,349</sup>;
- gravidez multi-fetal<sup>333,335,336,342,348</sup>.

Ao contrário do NICE e da Sociedade Portuguesa de Hipertensão, o ACOG considera que os fatores preponderantes para um alto risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia são a história de pré-eclâmpsia numa gravidez anterior<sup>336,347,349</sup>, gestação múltipla<sup>334,336,342,347,349</sup>,

hipertensão crônica<sup>334,336,337,342,347,349</sup>, doença renal, doença autoimune<sup>336,342,347,349</sup> (lúpus eritematoso sistêmico<sup>347</sup> ou síndrome antifosfolípídica<sup>334</sup>) e diabetes *mellitus* tipo I ou II<sup>334,336,342,347,349</sup>. Em relação aos fatores de risco moderado, esta entidade menciona a nuliparidade, os antecedentes familiares de pré-eclâmpsia<sup>336,342,347,349</sup>, o intervalo entre gravidezes superior a dez anos<sup>336</sup>. No entanto, o ACOG difere do NICE quando considera a idade materna avançada superior ou igual a trinta e cinco anos<sup>334,336,342,347,349</sup> e a obesidade<sup>336,337,342,347,349</sup> quando a grávida possui um IMC superior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup><sup>334,336</sup>. Esta organização acrescenta ainda os antecedentes pessoais de baixo peso/tamanho para a idade gestacional ao nascer<sup>336,337,342</sup> e as características sociodemográficas, como a origem racial<sup>328,342</sup> (maior risco para a mulheres afro-americanas<sup>336,349</sup>) e o baixo estatuto socioeconómico<sup>336,342</sup>.

Existem ainda fatores clínicos adicionais que aumentam a predisposição ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia como, por exemplo, pressão arterial média aumentada antes das quinze semanas de gestação, sangramento vaginal de pelo menos cinco dias durante a gravidez<sup>333</sup>, mola hidatiforme<sup>335</sup>, síndrome do ovário poliquístico<sup>333</sup>, síndrome metabólica<sup>337</sup>, distúrbios do sono e várias infeções, como doença periodontal, infeções do trato urinário e infeções por *Helicobacter pylori*<sup>333</sup>.

Podem ainda ser tidos em conta na avaliação do risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia outros fatores como:

- uso de tecnologias reprodutivas assistidas<sup>334,335</sup>, nomeadamente, o uso de doação de ovócitos (maior risco) e fertilização *in vitro* sem doação de ovócitos<sup>333</sup>;
- presença de hábitos tabágicos<sup>335,343,344</sup> ou deficiência de vitamina D<sup>333</sup>;
- grávidas de fetos com trissomia 13<sup>334,335</sup>;
- mulheres fruto de gestação complicada pela pré-eclâmpsia<sup>335</sup>;
- história de complicações na gravidez anterior<sup>336,349</sup>;
- outros distúrbios metabólicos (desnutrição e disfunção tiroideia)<sup>344</sup>.

A presença de um fator de alto risco, ou dois ou mais fatores de risco moderados, é um importante auxiliar para a orientação da profilaxia eficaz para a redução do risco de complicações provocadas pela pré-eclâmpsia<sup>333,342,349</sup>.

## 6. Fisiopatologia

Como referido anteriormente, a pré-eclâmpsia é um distúrbio multissistémico da gravidez<sup>330,331</sup>, caracterizado por um estado pró-inflamatório<sup>334</sup> de vários órgãos, no entanto, a sua etiologia ainda não é totalmente compreendida<sup>333</sup>.

Apesar da etiologia ainda ser pouco clara, sabe-se que a placenta é fundamental na fisiopatologia da pré-eclâmpsia<sup>328</sup> pelo que se torna fundamental entender a fisiologia deste órgão e que etapas da sua formação poderão estar envolvidas na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

### 6.1. Formação da placenta

Numa gravidez normal, após a fecundação, ocorre a divisão das células pluripotentes do ovo, formando uma massa celular embrionária. Quando a massa embrionária em divisão se torna uma bola compacta de doze ou mais células é designada por mórula, que continuará a evoluir através de processos de divisão celular<sup>350</sup>. É nesta fase que ocorre também o primeiro evento de diferenciação celular, do qual resultam duas células distintas, a célula precursora da massa celular interna, que originará o embrião, e a célula precursora da trofotoderme, tecido responsável pela formação do citotrofoblasto viloso e extra viloso<sup>344,351</sup>.

Cerca de três ou quatro dias após a ovulação, a mórula é formada por cerca de trinta e dois blastómeros (unidade originada após cada divisão celular) e começa a surgir no centro da massa celular uma cavidade preenchida por fluido, o blastocelo. A partir dessa altura a massa embrionária é denominada de blastocisto, constituído pelo botão embrionário e pelo blastocelo. O blastocelo é delimitado por uma camada única de citotrofoblastos (trofotoderme) e, num dos polos desta cavidade, encontra-se situado o botão embrionário, constituído por células precursoras da massa celular interna<sup>350</sup>. É a partir dos citotrofoblastos da trofotoderme que se formam a placenta e a membrana córion que rodeia o embrião<sup>344,350</sup>. Todos estes acontecimentos fazem parte da fase germinal e acontecem à medida que o blastocisto se move do local da fecundação, na ampola tubárica, para o local de implantação no útero<sup>350</sup>.

Após a chegada ao útero, cerca de sete dias após a fecundação<sup>350</sup>, o blastocisto estabelece contacto com o epitélio endometrial por aposição e adesão, envolvendo modificações moleculares das células trofoblásticas e das células epiteliais uterinas<sup>351</sup>, e é iniciado o processo

de nidação, ou seja, a implantação do blastocisto à parede uterina. À medida que o blastocisto contacta com o epitélio endometrial<sup>350</sup>, ocorre a formação da zona de junção materno-fetal, de onde se formará a placa basal (superfície materna da placenta) e a placa coriônica (superfície fetal da placenta)<sup>344</sup>, e a morfogênese do citotrofoblasto viloso, com proliferação rápida e crescimento distal das células citotrofoblásticas<sup>351</sup>.

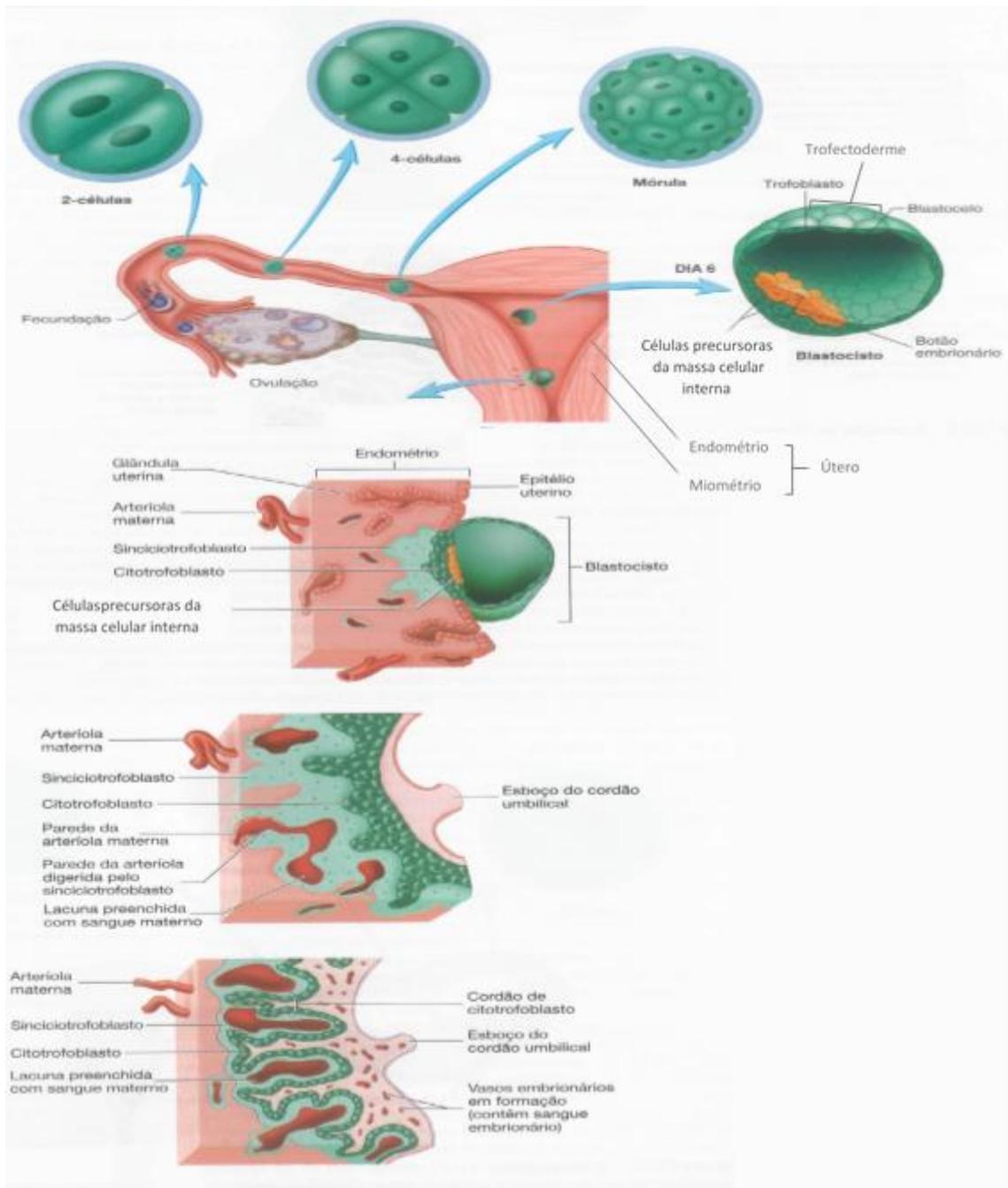


Figura 39: Formação da placenta - implantação do blastocisto e invasão trofoblástica.  
 Fonte: Adaptado de Desenvolvimento, Crescimento, Envelhecimento e Genética <sup>350</sup>.

Essa proliferação é feita por divisão assimétrica das células citotrofoblásticas, que dará origem à formação de dois tipos celulares: as células progenitoras e as células intermediárias. As células progenitoras são células responsáveis pela manutenção do *pool* de células do citotrofoblasto e aumentam em número durante o crescimento placentário, tornando-se espaçadas e com um volume menor à medida que a área do sincício aumenta. Por outro lado, na superfície das células intermediárias são expressas diversas moléculas de adesão (caderinas, proteínas de junção estreita, entre outras)<sup>351</sup>, o que resultará numa fusão deste tipo de células, formando o sinciciotrofoblasto<sup>344,351</sup>. Assim, o sinciciotrofoblasto é constituído por uma camada contínua de células multinucleadas que proliferam no endométrio<sup>350</sup>, sendo o responsável pela regulação das trocas gasosas, de nutrientes e outros metabolitos entre a circulação fetal e a materna<sup>351</sup>.

Assim como em todos os órgãos do organismo, o fornecimento de sangue para o útero é feito através de uma estrutura de vasos ramificada<sup>351</sup>. As artérias uterinas têm origem no ramo ascendente das artérias hipogástricas-íliacas, que se dividem no miométrio formando as artérias arcuatas. Estas artérias, por sua vez, ramificam-se perpendicularmente para formar as artérias radiais, que atravessam o miométrio dando origem às artérias basais<sup>352</sup>, que terminam no miométrio ou decídua<sup>335</sup>, e as artérias espirais, que terminam junto ao endométrio<sup>352</sup>. À medida que progredem através do miométrio e endométrio, os vasos diminuem sucessivamente o seu diâmetro até formarem as artérias espirais<sup>351</sup>, de menores dimensões, que se abrem no espaço intervuloso<sup>335</sup>. Estas artérias são responsáveis pela irrigação do endométrio e, durante a gestação, do miométrio e da decídua. A parede de cada artéria espiral, assim como as restantes artérias, é composta por três camadas distintas: a íntima, a camada média e a adventícia. A íntima é formada por uma única camada de células endoteliais, por uma membrana basal e uma lâmina elástica interna. Esta última lâmina é constituída predominantemente por colagénio tipo IV e lamininas (elastina e fibronectina), responsáveis pela separação das células endoteliais e das células musculares lisas, conferindo força, resistência e suporte à parede do vaso. A camada média contém fibras elásticas que envolvem as células musculares lisas e a adventícia é constituída essencialmente por fibras de colagénio e fibroblastos<sup>351</sup>.

No decorrer da invasão da parede uterina pelo sinciciotrofoblasto, ocorre também a formação de cavidades (lacunas), perto das artérias espirais uterinas<sup>351</sup>, resultantes da remodelação vascular de canais venosos de calibre progressivamente maior, até atingirem as arteríolas superficiais e, por último, as artérias espirais (quatro semanas de gestação)<sup>344</sup>.

Durante a gestação, também as artérias espirais maternas são remodeladas, de modo a deixarem de ter uma elevada resistência e baixo fluxo, passando a exibir um diâmetro maior e,

consequentemente, um maior fluxo sanguíneo<sup>334,351</sup>. Estas alterações apenas são possíveis porque ocorre uma perda de células musculares lisas e da lâmina elástica interna, devido à presença de leucócitos maternos, à substituição temporária do endotélio vascular por uma camada de trofoblastos extra vilosos e à constituição de uma nova matriz fibrinoide<sup>344</sup>.

Para que tudo isto aconteça, é fundamental que entre as oito e as doze semanas de gestação ocorra a invasão da decídua<sup>344</sup>, a partir das vilosidades de ancoragem<sup>351</sup>, por parte das células citotrofoblásticas extra vilosas<sup>344</sup>, formando septos vilosos. Esta invasão só é possível devido à presença de uma infinidade de fatores regulatórios, tais como citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, metaloproteínases de matriz e baixa tensão de oxigénio. Este processo de invasão é ainda influenciado pelo ambiente celular local, que inclui a presença de leucócitos na decídua (macrófagos e células *natural killer* (NK) decíduais, explicadas no subcapítulo seguinte), interações diretas ou a secreção de fatores solúveis, mas também pelo próprio fenótipo do trofoblasto<sup>351</sup> (intersiticial, endovascular e intramural<sup>344</sup>).

A invasão vascular dos trofoblastos extra vilosos ocorre por duas vias distintas, a via intersticial, através da decídua, e a via endovascular, através do contacto direto com as extremidades distais das artérias espirais. A via intersticial é a primeira a ocorrer e é realizada pelos trofoblastos intersticiais, originando a alteração das artérias espirais ao nível do miométrio, incluindo a dilatação do lúmen, edema da íntima, perfuração da lâmina elástica interna e aumento dos espaços intercelulares. Posteriormente, ocorre a invasão do espaço subendotelial pelos trofoblastos endovasculares, que degradam a elastina provocando uma interrupção das interações entre as células endoteliais e a consequente desorganização da íntima e da média<sup>351</sup>. A aglomeração deste fenótipo de trofoblastos provoca uma obstrução do fluxo sanguíneo, promovendo um ambiente hipóxico para o desenvolvimento da rede capilar fetal no início da gestação, de modo a que não haja um excessivo aporte de oxigénio na circulação fetal<sup>341</sup>.

Todas estas alterações fisiológicas que ocorrem no processo de remodelação das artérias espirais são caracterizadas pela secreção de moléculas de adesão e de material fibrinoide (colagénio tipo IV e lamininas) pelos trofoblastos extra vilosos<sup>351,352</sup> com fenótipo intramural<sup>344</sup>, o que possibilita a sua incorporação na matriz vascular, sem que se perca a integridade do vaso remodelado<sup>351</sup>. O controlo destes mecanismos permite que ocorra um pico de invasão trofoblástica perto das doze semanas de gestação, com um posterior declínio, e que a profundidade da invasão dos trofoblastos extra vilosos se restrinja à decídua e ao terço proximal do miométrio, sendo maior na região central do leito placentário e menor nas margens da placenta. O resultado desta remodelação é a transformação das artérias espirais uterinas em

vasos facilmente distensíveis, com paredes finas, que permitem o suprimento contínuo e adequado de sangue na placenta<sup>344</sup>.

A invasão trofoblástica ocorre desde a placa coriônica até à placa basal e tem como produto final, para além da remodelação das artérias espirais, a formação de septos fibrosos/vilosos. À medida que ocorre a formação destes septos, as lacunas vão também crescendo até darem origem ao espaço interviloso, compreendido entre os septos vilosos formados<sup>344</sup>. Por sua vez, os septos vilosos dão origem às vilosidades coriônicas assim que se forme a rede de capilares fetais. Estas vilosidades são então formadas pela rede capilar fetal cercada por uma camada de citotrofoblastos e pelo sinciciotrofoblasto (camada externa). Neste momento, os topos das artérias espirais encontram-se obstruídas por “êmbolos” de trofoblasto endovascular, como referido anteriormente. No entanto, por volta das doze semanas, com o pico da invasão trofoblástica atingido e, portanto, a conclusão da formação das vilosidades coriônicas e da remodelação das artérias uterinas, os “êmbolos” são soltos através do aumento do calibre das artérias remodeladas<sup>352</sup>, permitindo que o espaço interviloso seja preenchido com sangue materno. Conforme a gravidez avança, o número de vasos sanguíneos fetais contidos nas vilosidades coriônicas aumenta, enquanto a quantidade de tecido conjuntivo diminui<sup>344</sup>.

A formação da placenta fica concluída por volta das dezassete a vinte semanas de gestação, depois da segunda invasão de trofoblastos provocar uma nova remodelação das artérias uterinas, aumentando o seu calibre e, conseqüentemente, o aumento de oxigénio na circulação materno-fetal<sup>328</sup>. Na placenta madura o citotrofoblasto desaparece, ficando o sangue fetal separado do sangue materno apenas pela parede capilar embrionária, formada por uma camada fina de sinciciotrofoblastos<sup>351</sup>, de modo a facilitar a troca de metabolitos entre a circulação materna e a circulação fetal. O sinciciotrofoblasto tem então como principal função a absorção de nutrientes da circulação materna<sup>334,344</sup>, a remoção de resíduos e toxinas nocivas da circulação fetal e ainda a síntese de hormonas como a gonadotropina coriônica humana (hCG)<sup>344</sup>, essenciais para o desenvolvimento normal da gravidez.

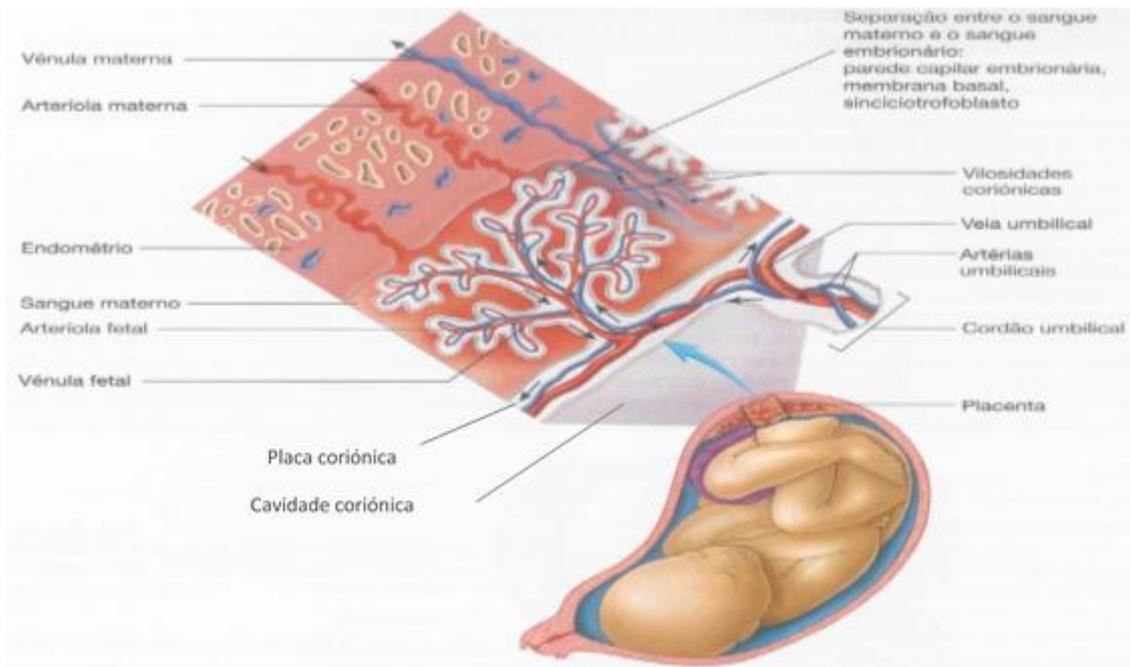


Figura 40: Estrutura da placenta madura.

Fonte: Adaptado de Desenvolvimento, Crescimento, Envelhecimento e Genética<sup>350</sup>.

## 6.2. A importância do sistema imunológico

Tendo em conta que metade dos genes do embrião é de origem paterna, ou seja, estranhos ao sistema imunológico materno, a formação da placenta e do embrião são considerados um semi-enxerto<sup>341,351</sup>. No entanto, é a placenta que entra em contato direto com o sangue materno, pelo que se torna fundamental que ocorra a sua tolerância pelo sistema imunológico materno<sup>341</sup>.

O sucesso da formação da placenta, e conseqüentemente do embrião, só é possível devido à presença de alguns fatores imunológicos, que fazem com que a placenta e o embrião sejam considerados um semi-enxerto apenas temporário, impedindo o desencadeamento de uma resposta imunológica materna. Um desses fatores prende-se no facto dos trofoblastos não expressarem moléculas do Complemento de Histocompatibilidade (MHC) das classes I e II, mas sim uma combinação única dessas moléculas (Complexo do antígeno leucocitário humano [HLA], especialmente, HLA-C, HLA-G e HLA-E)<sup>341,351</sup>. O HLA-G interage com os recetores dos linfócitos T citotóxicos e células NK, inibindo a sua capacidade de indução da lise celular, possibilitando a coexistência do trofoblasto com as restantes células do sistema imunológico materno. Também as células NK decíduais, especializadas e não citotóxicas, estão implicadas em processos essenciais na implantação, como a invasão trofoblástica<sup>344,351</sup>, a remodelação das

artérias espirais<sup>335,344,351</sup> e a tolerância imune à formação da placenta e do feto. Pensa-se que estes processos são estimulados por citocinas angiogénicas expressas nas células NK decíduais, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento placentário (PIGF), angiopoietina<sup>351</sup> e óxido nítrico que, normalmente, não são produzidas por células NK periféricas. Pelo contrário, a invasão trofoblástica é inibida por citocinas<sup>344</sup>, como o fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- $\alpha$ ), interferão gama (INF $\gamma$ ) e fator estimulador de colónias dos monócitos (M-CSF), produzidas através da interação entre as células NK decíduais e os trofoblastos invasores<sup>341,351</sup>. As células NK decíduais, normalmente, invadem o útero antes da implantação e permanecem em grande número (cerca de 70% dos leucócitos decíduais) durante todo o primeiro trimestre de gestação<sup>351</sup>.

Para além das células NK decíduais, também os macrófagos fazem parte dos leucócitos decíduais (20-25%) do primeiro trimestre da gravidez, desempenhando um papel importante na tolerância imunológica. Os macrófagos são responsáveis pela produção de citocinas e substâncias anti-inflamatórias, como a interleucina (IL) 10 (IL-10), e pela interação com as células NK decíduais, favorecendo a produção de IL-15. Assim como acontece com as células NK decíduais, os trofoblastos também interagem com os macrófagos e com outros componentes do sistema imunológico, através da expressão de recetores essenciais para a resposta imune inata. Esses recetores tornam-se importantes, pois dão capacidade à placenta de reconhecer antígenos e desencadear a ativação das células imunológicas<sup>351</sup>.

### **6.3. Modificações fisiopatológicas na pré-eclâmpsia**

Como mencionado no início do capítulo, apesar da etiologia ainda ser pouco clara<sup>328,333,337</sup>, sabe-se que a placenta é fundamental na fisiopatologia da pré-eclâmpsia<sup>328,335</sup> e que esta progride em dois estádios: placentação anormal, durante o primeiro trimestre, e desenvolvimento da síndrome materna, no segundo e terceiro trimestres de gestação<sup>334,335,337,351</sup>.

#### **6.3.1. Estádio 1: Placentação anormal**

O desenvolvimento da placenta é um dos passos mais importantes desde o início da gestação<sup>351</sup>, pois é através deste órgão que vão ocorrer as trocas de nutrientes e metabolitos entre a mãe e o feto ao longo de toda a gravidez<sup>350</sup>.

Estudos recentes demonstram que, em grávidas com pré-eclâmpsia, ocorrem anormalidades no processo de formação da placenta, que se iniciam com uma má preparação do ambiente uterino para a implantação do blastocisto. Várias hipóteses têm sido propostas, entre elas, a não ativação das células NK decíduais<sup>335</sup>, que resulta em falhas no processo de transformação estromal do endométrio uterino, e consequente má formação da decídua<sup>334</sup>. Para além disso, o ambiente materno-fetal também se torna desfavorável à implantação do blastocisto devido a uma inadequada produção de citocinas e quimiocinas aquando a interação entre os leucócitos decíduais e os trofoblastos<sup>341</sup>.

Na pré-eclâmpsia ocorrem, ainda, problemas na diferenciação do citotrofoblasto. A diferenciação incompleta das células trofoblásticas durante a formação do trofoblasto viloso e extra viloso<sup>337,344,351</sup> origina um predomínio de trofoblastos extra vilosos<sup>328,334</sup>, o que resulta numa invasão superficial do útero e no comprometimento da fusão dos trofoblastos vilosos para a formação dos sinciciotrofoblastos<sup>328,351</sup>. Além disso, o comprometimento da fusão celular é responsável pela formação de uma estrutura vilosa instável<sup>351</sup>, provocando uma remodelação incompleta das artérias espirais maternas<sup>328,333,334,337</sup>. Um processo bem regulado de perda celular e degradação da matriz extracelular é fundamental para que o equilíbrio entre a vasodilatação e a manutenção da integridade vascular seja mantido<sup>351</sup>, o que não acontece quando a remodelação fica incompleta. Isto leva a uma persistência das características primárias das artérias espirais uterinas, ou seja, a presença de uma elevada resistência, o que promove um mau controlo da oxigenação do espaço interviloso durante a fase inicial da gravidez<sup>337,351</sup>. Quando isto acontece, as vilosidades coriônicas são irrigadas de forma intermitente e com uma elevada pressão<sup>337,344,351</sup>, o que faz com que o fluxo uteroplacentário diminua, levando a um quadro de isquemia uteroplacentária<sup>328,334,341,344</sup>.

Por outro lado, uma remodelação incompleta da artéria espiral pode aumentar a propensão para o desenvolvimento de aterosclerose placentária<sup>328,334,335</sup>. A aterosclerose é caracterizada principalmente, pela presença de macrófagos carregados de lípidos no lúmen vascular, necrose fibrinoide da parede arterial e infiltrado perivascular mononuclear<sup>334,335</sup>, o que provoca uma maior resistência do fluxo sanguíneo placentário e hipoperfusão da placenta<sup>333,335</sup>, quadro característico de isquemia uteroplacentária.

A isquemia uteroplacentária é então caracterizada pela diminuição do fluxo sanguíneo e consequente défice de oxigénio na circulação uteroplacentária, o que faz com que ocorra uma produção exagerada de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS), por parte das mitocôndrias, sempre que as moléculas de oxigénio entram no tecido após o momento isquémico<sup>341,344</sup>. O superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é a molécula de ROS mais produzida nos casos

de isquemia e, em situações de diminuição ou ausência da capacidade antioxidativa do tecido, é capaz de desencadear uma série de eventos que levam a uma maior produção de ROS e peroxidação lipídica, despoletando uma resposta inflamatória tecidual e dano celular<sup>341</sup>. Também a redução dos níveis de oxigênio na circulação uteroplacentária provoca uma sobreexpressão do fenótipo invasivo trofoblástico<sup>344</sup>, o que faz com que as falhas de remodelação das artérias uterinas continuem a ocorrer, potenciando os efeitos de isquemia e produção de ROS.

O tecido placentário, mais concretamente o sinciciotrofoblasto, possui pouca capacidade antioxidativa, o que faz com que, devido às alterações na perfusão sanguínea do espaço interviloso, ocorra um desequilíbrio entre a produção e a remoção de ROS, ou seja, o desenvolvimento de stress oxidativo<sup>341</sup>. Nestes casos, o sinciciotrofoblasto aumenta a sua capacidade de apoptose, com conseqüente libertação na circulação materna<sup>334,341,344,351</sup> de material sincicial, mais especificamente de fatores antiangiogênicos contidos em microvesículas e exossomas do sinciciotrofoblasto<sup>334</sup>. As moléculas libertadas provocam a ativação de leucócitos sistêmicos, causando uma libertação de citocinas pró-inflamatórias<sup>334,344</sup>, que estimulam a vasoconstrição, assim como, o aumento da adesão plaquetar e a exacerbação da resposta inflamatória generalizada<sup>341</sup>. A resposta inflamatória é mediada, principalmente, pela via inflamatória do NF-κB, com produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, INFγ e IL-6<sup>341,344</sup>, produzidas pelos monócitos circulantes. Para além destas citocinas, estudos demonstraram também que pode ocorrer a elevação de marcadores de resposta inflamatória como leucocitose, hipoalbuminemia e aumento das concentrações de proteína C reativa<sup>341</sup>.

Os danos endoteliais que ocorrem na barreira sanguínea materno-fetal provocam também a libertação de produtos fetais para a circulação sanguínea materna, principalmente hemoglobina fetal (HbF), que desempenha um papel importante na transição do estadio 1 para o estadio 2 desta síndrome. Assim como a hipoxia, também a HbF livre é um fator de indução do stress oxidativo, através da produção de ROS, o que faz com que seja libertada na corrente sanguínea materna juntamente com os fatores já descritos. Quando se encontra em circulação, a hemoglobina sofre processos de degradação (hemólise), com libertação do grupo *heme* que a constitui. O grupo *heme* libertado tem também efeitos oxidativos e tóxicos para as células, pelo que a HbF livre funciona também como uma toxina no processo fisiopatológico da pré-eclâmpsia<sup>337</sup>.

Em situações fisiológicas, o stress oxidativo é, normalmente, mediado pela via da hemoxigenase (HO), uma enzima que pode ser encontrada no organismo em três isoformas diferentes. A isoforma induzível (HO1) e a isoforma constitutiva (HO2) oxidam o *heme* para

produção de biliverdina e monóxido de carbono, de modo a que seja possível a conversão de biliverdina em bilirrubina. O produto final desta reação, ou seja, a bilirrubina, possui efeitos antioxidantes, incluindo inibição da peroxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, portanto, torna-se um importante fator para o controlo do stress oxidativo<sup>335</sup>.

A isoforma HO1 é encontrada na bainha contrátil perivascular dos vasos placentários<sup>335</sup>, proveniente de fenótipos trofoblásticos não invasivos<sup>334</sup>, e a sua indução atenua os danos celulares mediados pelo TNF, pelo que se torna um importante mediador endógeno do desenvolvimento e regulação placentária. No entanto, em mulheres com pré-eclâmpsia os níveis de HO são reduzidos<sup>335</sup> devido à falha na diferenciação trofoblástica, com predomínio de trofoblastos invasivos, o que faz com que os danos celulares provocados pela ação do TNF aumentem e a resposta inflamatória seja exacerbada<sup>341</sup>.

Todas estas contribuições fazem com que haja uma resposta inflamatória sistémica, que se torna importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, pois o seu pico determina o aparecimento clínico da síndrome materna<sup>341</sup>.

### **6.3.2. Estadio 2: Desenvolvimento da síndrome materna**

A segunda fase da pré-eclâmpsia ocorre após as vinte semanas de gestação e é caracterizada pelo aparecimento das manifestações clínicas desta patologia<sup>337</sup>: hipertensão e proteinúria. Neste estadio também podem ser encontrados outros tipos de manifestações clínicas resultantes dos danos que ocorrem nos restantes órgãos do organismo.

A manutenção da integridade funcional e estrutural do endotélio é fundamental para que a circulação materno-fetal ocorra sem problemas e a oxigenação e nutrição fetal sejam mantidas. Durante o processo de formação da placenta, os fatores angiogénicos mais relevantes na manutenção da homeostase endotelial são o VEGF, o PlGF, e o TGF- $\beta$ 1 (do inglês *Tissue Growth Factor*)<sup>341</sup>. O VEGF é fundamental na manutenção da função endotelial, principalmente, do endotélio fenestrado do fígado, cérebro e glomérulo renal<sup>334</sup> e a sua função apenas é possível devido à presença de recetores nos órgãos alvos, como é o caso dos recetores Flk e Flt-1<sup>341</sup>. Estes dois recetores também estão presentes no tecido uterino, para a ligação do fator angiogénico PlGF. Por sua vez, o recetor específico para TGF- $\beta$ 1 é formado por um complexo Alk5-T $\beta$ RII-Endoglin<sup>335</sup>.

Como referido anteriormente, as micropartículas sinciciais libertadas quando ocorre a necrose do sinciotrofoblasto atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória da pré-

eclâmpsia. Para além disso, estas micropartículas também são capazes de lesar diretamente o endotélio das artérias envolvidas, pelo que se torna fundamental o equilíbrio na produção de fatores angiogénicos para o correto desenvolvimento placentário. Contudo, o stress oxidativo que ocorre em resposta à isquemia uteroplacentária presente na pré-eclâmpsia, leva a que os fragmentos de sinciotrofoblasto libertados na corrente sanguínea<sup>335</sup> produzam uma elevada quantidade de fatores antiangiogénicos<sup>334,341</sup>, como o sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosin kinase 1*)<sup>334,341,345</sup> e a Endogлина solúvel (sEndogлина)<sup>341</sup>.

O sFlt-1 é um recetor solúvel, formado por *splicing* alternativo, que se caracteriza pela ausência de domínio transmembranar<sup>341</sup>, fazendo com que este possa ser encontrado na corrente sanguínea e noutros tecidos. No entanto, o sFlt-1 contém o mesmo domínio extracelular que Flt-1, pelo que compete pelos locais de ligação aos fatores angiogénicos VEGF e PlGF. Assim, estes fatores são ainda capturados em circulação o que impede a sua ligação aos seus recetores comuns na membrana celular<sup>335,341</sup>, provocando uma alteração das vias de sinalização a jusante e, conseqüentemente, a vasoconstrição<sup>333</sup> e disfunção endotelial sistémica<sup>334</sup>. Estudos genéticos têm demonstrado que mutações genéticas nos genes que codificam para a formação de Flt-1 no genoma fetal podem estar na origem do desenvolvimento da pré-eclâmpsia<sup>328</sup>. De forma semelhante, a sEndogлина impede a ação angiogénica do seu ligante, o TGF- $\beta$ 1<sup>341</sup>.

Com a diminuição do fator angiogénico VEGF, capturado por sFlt-1 ainda em circulação, a sua atuação nas células endoteliais dos órgãos alvo fica comprometida, principalmente, no endotélio glomerular. A disfunção endotelial glomerular ocorre devido ao aumento das fenestras entre as células endoteliais (glomeruloendotelióse)<sup>341</sup>, o que faz com que o glomérulo perca a capacidade de reter as moléculas maiores, nomeadamente as proteínas. Nestes casos, a manifestação clínica observada é a proteinúria, ou seja, a presença de proteínas na urina.

Produzido também em resposta à isquemia placentária e inflamação sistémica, por linfócitos B (CD19<sup>+</sup> e CD5<sup>+</sup>), o autoanticorpo do recetor I da angiotensina II (AT1-AA) pode estimular a produção dos fatores antiangiogénicos sFlt-1 e sEndogлина. Para além disso, a presença de AT1-AA em grávidas com pré-eclâmpsia, leva a um aumento da sensibilidade à angiotensina II, apesar de esta hormona, assim como a renina, se encontrarem em baixa concentração. Estas alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona levam ao surgimento de um quadro de hipertensão<sup>334</sup>.

Na pré-eclâmpsia, também o cérebro poderá ser afetado. Nesses casos, a autorregulação cerebral fica prejudicada devido à disfunção endotelial, o que faz com que ocorra uma

diminuição da atividade do sistema nervoso simpático na circulação cerebral posterior e da capacidade de resposta neurogênica ao aumento da pressão arterial<sup>353</sup>.

Em suma, o excesso de inflamação provocada pela resposta do sistema imunológico ao stress oxidativo, assim como o dano endotelial causado, fazem com que a maior parte dos órgãos maternos se encontre afetada, como é o caso da placenta, pulmões, fígado, rins e coração e os sistemas vascular, nervoso central e hemostático<sup>353</sup>. Por esse motivo, nesta fase da gestação podem ser observadas várias manifestações clínicas diferentes e que, normalmente, são indicadoras de múltiplas complicações.

## 7. Complicações sistêmicas

A pré-eclâmpsia é um distúrbio multissistêmico da gravidez que coloca a saúde materno-fetal em risco, devido à elevada probabilidade de ocorrência de complicações, assim como, de sequelas ao longo da vida<sup>334</sup>.

### 7.1. Complicações perinatais

Ainda antes do término da gravidez, ou seja, durante o período perinatal, podem surgir complicações que agravem o quadro clínico da pré-eclâmpsia. Nestes casos é necessário intervir rapidamente pois, quanto maior o número de sistemas de órgãos afetados, maior é a probabilidade de surgirem complicações perinatais<sup>353</sup>.

#### 7.1.1. Maternas

A complicação materna mais frequente é a síndrome de HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*), presente em cerca de 10 a 20% dos casos de pré-eclâmpsia grave, manifestando-se tardiamente no período gestacional, mas também pode ocorrer no período pós-parto. Esta síndrome é caracterizada, como o próprio nome indica, por hemólise microangiopática e necrose do parênquima periportal ou focal, o que resulta no aumento das enzimas hepáticas e consumo de plaquetas. As grávidas que desenvolvem esta complicação manifestam, principalmente, dor epigástrica ou no quadrante superior direito<sup>331,353</sup> e podem sofrer descolamento da placenta (*abruptio placentae*), coagulação intravascular disseminada<sup>331,335,353</sup>, insuficiência renal aguda<sup>331,353</sup> e, menos frequentemente, edema pulmonar<sup>335,353</sup> e hematoma subcapsular do fígado<sup>353</sup>.

Como referido anteriormente, na pré-eclâmpsia, também o cérebro poderá ser afetado. Nesses casos, pode ocorrer descolamento da retina, cegueira cortical, Acidente Vascular Cerebral (AVC), eclâmpsia<sup>331,353</sup> ou, em casos mais graves, Síndrome de Encefalopatia Posterior Reversível (PRES)<sup>334,353</sup>. A eclâmpsia é diagnosticada em cerca de 1 a 2% dos casos de pré-eclâmpsia<sup>353</sup> e é definida como o desenvolvimento de convulsões<sup>333,335,353</sup> tónico-clónicas em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia. Embora seja difícil de prever, na maioria dos casos,

desenvolvem-se sintomas premonitórios, como dor de cabeça, distúrbios visuais e dor epigástrica, uma semana antes da primeira crise convulsiva<sup>353</sup>.

Alguns autores defendem que, tanto a síndrome de HELLP, como a eclâmpsia apresentam altas taxas de incidência em grávidas com pré-eclâmpsia que apresentam proteinúria massiva<sup>331</sup>.

Para além das complicações mencionadas, nos casos de pré-eclâmpsia grave, podem ainda estar presentes muitas outras patologias, referidas no quadro resumo que se segue.

Tabela 24: Complicações perinatais da pré-eclâmpsia.

Complicação		
<b>Sistema Vascular</b>	Feocromocitoma Hiperaldosteronismo Síndrome de Cushing Tireotoxicose Coartação da aorta	<b>Fígado</b>
<b>Sistema renal</b>	Nefrite lúpica Glomerulonefrite aguda e crónica Nefrite intersticial Pielonefrite	
<b>Coração</b>	Cardiomiopatia periparto Enfarte do miocárdio ou isquemia	<b>Hemóstase</b>
<b>Cérebro</b>	Síndrome metabólica Epilepsia Tumor cerebral AVC Encefalopatia hipertensiva Lúpus eritematoso sistémico cerebral	
<b>Olhos</b>	Osteoma coroidal Isquemia retiniana Espasmo persistente dos vasos retinianos Descolamento da retina Retinopatia serosa central Melanoma uveal Trombose arterial ou venosa da retina	<b>Sistema Respiratório</b>
		Pneumonia Embolia pulmonar Síndrome antifosfolipídica (catastrófica)

Fonte: Adaptado de *Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies*<sup>335</sup> e *Pre-eclampsia*<sup>353</sup>.

## 7.1.2. Fetais

Em grávidas com pré-eclâmpsia podem ainda ser observadas complicações fetais, devido à insuficiência feto-placentária<sup>328</sup> provocada pela pré-eclâmpsia. Normalmente, a pré-eclâmpsia de início precoce está associada a um maior risco de restrição do crescimento intra-uterino<sup>331,335,337,353</sup>, devido ao comprometimento da circulação feto-placentária<sup>337</sup>, resultante da diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário, provocado pelo aumento da pressão arterial<sup>338</sup>. Dessa restrição podem ainda resultar outras complicações como o baixo peso ao nascer<sup>i</sup>, recém-nascido pequeno para a idade gestacional, nascimento pré-termo<sup>ii</sup> e, em casos mais graves, morte perinatal<sup>337,353</sup> e nadomorto<sup>iii 331,338</sup>. Por outro lado, a pré-eclâmpsia de início tardio está associada a recém-nascidos grandes para a idade gestacional<sup>335</sup>.

Os recém-nascidos também podem apresentar efeitos vasculares secundários aos níveis elevados de fatores antiangiogênicos<sup>334</sup>, como o sFlt-1 que pode ser encontrado no líquido amniótico. Tendo isso em consideração, alguns estudos demonstraram um aumento da incidência de síndrome do desconforto respiratório neonatal<sup>335</sup> e displasia broncopulmonar no recém-nascido resultante de uma gestação pré-eclâmpica. Por outro lado, a presença de pré-eclâmpsia durante a gravidez está associada a uma diminuição do risco de retinopatia da prematuridade, um distúrbio da angiogênese<sup>334,335</sup>.

## 7.2. Complicações a longo prazo

A pré-eclâmpsia pode persistir após o parto e, em alguns casos, desenvolver-se de novo no período pós-parto<sup>334,353</sup>, trazendo complicações a longo prazo, tanto maternas, como para a prole.

### 7.2.1. Maternas

Atualmente, alguns estudos têm demonstrado que mulheres com histórico de uma gravidez com pré-eclâmpsia possuem um risco aumentado de desenvolver complicações a

---

<sup>i</sup> Baixo peso ao nascer: recém-nascido com peso ao nascer inferior a 2500 g.

<sup>ii</sup> Nascimento pré-termo: parto ocorrido antes das trinta e sete semanas de gestação.

<sup>iii</sup> Nadomorto: recém-nascido sem sinais vitais após as vinte e oito semanas de gestação.

longo prazo<sup>335</sup>. Muitas dessas complicações ocorrem devido à persistência pós-parto do dano endotelial desenvolvido na pré-eclâmpsia, o que causa uma propensão acrescida de doença cardiovascular (DCV)<sup>334,335</sup>. Este risco aumenta proporcionalmente ao número de episódios de pré-eclâmpsia desenvolvidos e pode provocar quadros de hipertensão<sup>334,335,348</sup>, doença arterial periférica, doença cerebrovascular<sup>334</sup>, particularmente AVC<sup>334,335,348</sup>, doença cardíaca isquêmica<sup>335,348</sup>, insuficiência cardíaca congestiva, demência vascular, enfarte agudo do miocárdio e, em casos extremos, morte materna<sup>334</sup>.

A hipertensão pós-parto é definida como hipertensão de novo ou resultante da pré-eclâmpsia, que se mantém nas quarenta e oito horas ou mais após o parto e pode resultar de um quadro de pré-eclâmpsia subclínica ou não resolvida<sup>334</sup>.

Para além disso, mulheres com histórico de pré-eclâmpsia podem ainda desenvolver doença renal crônica ou terminal, assim como, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipercolestolemia a longo prazo<sup>335</sup>.

Assim, a ACOG recomenda que todas as mulheres que tenham desenvolvido pré-eclâmpsia sejam submetidas a uma vigilância pós-parto, que inclui a monitorização da pressão arterial e os níveis de colesterol, triglicéridos e glicemia em jejum<sup>335</sup>.

### **7.2.2. Na prole**

Vários estudos têm demonstrado evidências crescentes de DCV a longo prazo também na prole, como resultado da exposição no útero a distúrbios hipertensivos da gravidez<sup>333,334</sup>. Descrita pela primeira vez por Barker e Osmond, a Hipótese de Barker sugere que o aumento da suscetibilidade a fatores de risco para o desenvolvimento de DCV se deve à falta de nutrição precoce, restrição do crescimento e ambiente intrauterino. Esta hipótese surge depois de vários estudos comprovarem que crianças nascidas de mulheres com pré-eclâmpsia durante o período gestacional, apresentam um risco maior de desenvolver uma DCV<sup>334</sup>. Nos jovens adultos nascidos de gestações pré-eclâmpicas de início precoce foi observado um aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, sobretudo com início entre os seis e treze anos de idade. Se a hipertensão persistir na vida adulta, o risco de mortalidade por doenças cardíacas isquémicas ou derrame aumentam. Também a restante descendência de mulheres com história de pré-eclâmpsia, mesmo que não tenha sido desenvolvida nessa gravidez, apresenta elevado risco de hipertensão a longo prazo, o que sugere a necessidade de explorar fatores genéticos e

epigenéticos, assim como, a remodelação cardiovascular materna para explicar diferenças nos fenótipos cardiovasculares da descendência<sup>333</sup>.

Para além das alterações vasculares, estudos recentes apontam para alterações da estrutura cardíaca de adolescentes expostos a distúrbios hipertensivos da gravidez. A remodelação cardíaca grave observada nestes casos provoca um aumento da parede do ventrículo esquerdo e redução do volume diastólico final desse mesmo ventrículo<sup>333</sup>.

## 8. Diagnóstico

A avaliação inicial de uma grávida que apresenta pré-eclâmpsia deve ser feita com base numa apreciação completa do estado de saúde materno e fetal<sup>336,354</sup>. Por isso, o diagnóstico deve ser baseado nos resultados dos exames laboratoriais, fundamentalmente através de triagem bioquímica<sup>349</sup>, e de estudos de imagem, que permitam uma intervenção precoce e, se possível, a prevenção da doença<sup>334</sup>.

### 8.1. Diagnóstico Laboratorial

Atualmente, o laboratório tem um papel fundamental no que toca à avaliação final da condição materno-fetal, pois permite o diagnóstico de alterações patológicas ainda antes de se manifestarem os primeiros sintomas clínicos. Este diagnóstico é feito com base na determinação quantitativa de biomarcadores plasmáticos, através da recolha de uma amostra de sangue venoso ou urina.

No caso da pré-eclâmpsia, o diagnóstico laboratorial é feito, principalmente, com base na avaliação da proteinúria. No entanto, de modo a avaliar a gravidade da pré-eclâmpsia no momento de diagnóstico, são ainda utilizadas outras determinações como o hemograma completo com contagem de plaquetas e os níveis séricos de creatinina, ácido úrico, enzimas hepáticas (lactato desidrogenase [LDH] alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST])<sup>333,336,354</sup>, marcadores angiogénicos, hemopexina,  $\alpha$ 1-microglobulina, fatores do complemento ou as hormonas renina, angiotensina II e aldosterona. Todos estes testes são fundamentais para a avaliação do grau de disfunção dos órgãos maternos<sup>333</sup>, resultante do dano endotelial provocado pelas alterações patogénicas da pré-eclâmpsia.

#### 8.1.1. Proteinúria

Um dos critérios de diagnóstico mais importantes é a presença de proteinúria. Tradicionalmente, a proteinúria é rastreada por testes químicos que usam tiras impregnadas de reagente, para a determinação rápida de alguns parâmetros urinários, e confirmada através de testes laboratoriais adicionais, utilizando urina de vinte e quatro horas ou, mais recentemente, amostras de urina aleatória<sup>333</sup>. Contudo, para ser indicativo de pré-eclâmpsia, a excreção de

proteínas na urina tem de ser superior ou igual a 300 mg numa determinação utilizando urina de vinte e quatro horas<sup>332,335</sup> ou serem detetadas proteínas em duas medições consecutivas quando utilizadas tiras teste em amostras de urina aleatórias<sup>332,335,337</sup>. Embora o teste químico, feito com recurso a tiras teste, seja um método fácil e rápido para o diagnóstico de pré-eclâmpsia, este também possui uma percentagem elevada de resultados falsos positivos, possivelmente devido a contaminações da urina por corrimento vaginal, antissépticos ou com microrganismos causadores de infeção no trato urinário<sup>332</sup>. Também neste método existe a possibilidade de resultados falsos negativos, quando a densidade urinária é inferior a 1010, ou o pH inferior a 4,5, bem como, quando estão presentes proteínas de baixo peso molecular ou microalbuminúria, pelo que os resultados para este teste devem ser sempre confirmados com o método padrão recomendado. A deteção precisa de proteinúria é apenas possível através da medição dos níveis de proteína numa amostra de urina de vinte e quatro horas, pelo que este é o método padrão utilizado atualmente. Porém, este método também apresenta algumas limitações, pois a recolha das amostras é demorada<sup>332,333</sup> e nem sempre é feita corretamente<sup>333</sup>, o que dificulta o diagnóstico rápido e, conseqüentemente, a intervenção médica precoce<sup>332</sup>. Tendo isto em consideração, foram desenvolvidos vários estudos que mostram que a determinação de proteínas numa amostra de urina de doze horas é igualmente fiável, com a vantagens de ser mais rápida a sua execução<sup>332</sup>. Por outro lado, outros autores recomendam que sejam utilizadas as razões albumina/creatinina e proteína/creatinina, medidas numa amostra de urina aleatória, para a confirmação dos resultados obtidos no teste químico com tiras teste<sup>333,343</sup>.

### **8.1.2. Marcadores angiogénicos**

O desenvolvimento tecnológico observado nas últimas décadas tem contribuído para a evolução dos métodos laboratoriais de diagnóstico da pré-eclâmpsia. Esta evolução tem permitido que cada vez mais sejam disponibilizados imunoensaios robustos para a determinação de analitos mais específicos, como é o caso dos fatores angiogénicos<sup>334</sup>. A deteção de níveis séricos alterados destes fatores tem sido implicada na gravidade da apresentação e desenvolvimento de resultados adversos em grávidas com pré-eclâmpsia, pelo que a utilização destas determinações tem sido usada, atualmente, no algoritmo de diagnóstico precoce desta síndrome<sup>334,343</sup>. Estudos recentes demonstram que o método de triagem mais promissor é o uso combinado da medição dos níveis séricos dos biomarcadores sFlt-1, sEndogлина e PIGF<sup>334,335</sup>, juntamente com o cálculo das razões sFlt-1/PIGF e

PIGF/sEndogлина<sup>335</sup>, de modo a aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico e prognóstico precoces da pré-eclâmpsia<sup>334,343</sup>.

Como já foi referido, na presença de pré-eclâmpsia os fatores VEGF e PIGF livres encontram-se reduzidos em circulação<sup>334,341</sup>, associados a uma elevação dos níveis de sFlt-1<sup>333,334,341</sup>. Em paralelo às concentrações séricas maternas, os níveis de Flt-1 podem ser encontrados elevados no líquido amniótico<sup>335</sup>. Estas variações podem ser identificadas cerca de cinco<sup>341</sup> a dez<sup>335</sup> semanas antes das manifestações clínicas mais relevantes da pré-eclâmpsia<sup>333,334,341</sup>, o que permite uma atuação precoce com terapia profilática. Outra proteína antiangiogénica que também foi exaustivamente estudada como fator preditivo de pré-eclâmpsia é a sEndogлина, que se encontra elevada no soro cerca de dois meses antes do início dos sinais clínicos em grávidas que possuam esta patologia<sup>335</sup>.

Os níveis desses marcadores também podem ser utilizados para diferenciar entre pré-eclâmpsia com características leves e parto a termo de pré-eclâmpsia grave com parto prematuro. Assim, alterações nos níveis de sEndogлина e sFlt-1 entre o primeiro e o segundo trimestre de gestação foram preditivas de pré-eclâmpsia grave de início precoce e parto pré-termo, enquanto que as alterações destes fatores apenas no terceiro trimestre de gestação permitiram o diagnóstico de grávidas em risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia grave de início tardio e de nadomortos<sup>335</sup>. Por outro lado, a determinação dos níveis do fator angiogénico PIGF foi considerada um auxiliar para a exclusão de pré-eclâmpsia em grávidas com período gestacional entre as vinte e as trinta e quatro semanas com suspeita<sup>333</sup>. Todavia, é importante ter em conta que este fator é influenciado pelo tabagismo, etnia, peso corporal e idade materna, o que levou a ser necessário introduzir a razão sFlt-1/PIGF no modelo preditivo negativo em mulheres com hipertensão antes das trinta e cinco semanas de gestação<sup>335,343</sup>. Para além disso, quando a razão sFlt-1/PIGF se encontra superior a 38 é indicativo de necessidade de realização do parto num prazo de uma a duas semanas<sup>343</sup>.

A determinação destes marcadores é também fundamental na diferenciação da pré-eclâmpsia de outras doenças que podem ocorrer durante o período gestacional e que têm um quadro clínico semelhante, como é o caso de doença renal crónica, trombocitopenia gestacional e hipertensão gestacional<sup>335</sup>, evitando assim a realização de exames pouco conclusivos.

Adicionalmente, estes biomarcadores são fundamentais na previsão de lesões fetais quando medidos no sangue do cordão umbilical após o nascimento e durante a primeira semana de vida<sup>355</sup>.

### 8.1.3. Outros marcadores

De modo a minimizar os efeitos tóxicos do grupo *heme*, libertado pela degradação de HbF livre na circulação materna, a atuação do sistema de eliminação do grupo *heme* é fundamental. Deste sistema de eliminação fazem parte a haptoglobina, a hemopexina e a  $\alpha$ 1-microglobulina. A haptoglobina é a primeira proteína a atuar, ligando-se irreversivelmente à hemoglobina hemolisada. Contudo, nos casos de pré-eclâmpsia, onde a concentração de HbF é elevada em circulação e, portanto, os processos de hemólise são anormalmente elevados, as ligações à haptoglobina são excedidas. Nesse caso, por se tratar de uma proteína com elevada afinidade com o *heme* livre, a hemopexina é recrutada, direcionando o *heme* para as células parenquimatosas do fígado de modo a que seja catabolizado e o ferro seja armazenado e redistribuído. Desta forma, a hemopexina é considerada uma proteína de proteção do endotélio à oxidação. Por sua vez, a  $\alpha$ 1-microglobulina também se encontra envolvida na ligação e degradação do grupo *heme*, atuando ainda como redutase enzimática na neutralização da oxidação celular induzida pelo grupo *heme* e por ROS. Desta forma, e por os seus níveis se encontrarem alterados em circulação, em situações de aumento de HbF livre, a haptoglobina (com concentrações mais baixas), a hemopexina e a  $\alpha$ 1-microglobulina (com concentrações mais elevadas) têm sido considerados biomarcadores bastante importantes no diagnóstico de pré-eclâmpsia<sup>337</sup>.

Apesar de não fazer parte dos critérios formais de diagnóstico, a pré-eclâmpsia cursa ainda com níveis elevados de complemento e reduzidos das hormonas renina e angiotensina II associadas, respetivamente, à resposta inflamatória e à compensação pelo aumento da pressão arterial<sup>334</sup>.

A determinação do ácido úrico sérico também se torna importante para o diagnóstico de pré-eclâmpsia, na medida em que a hiperuricemia é um indicador de progressão de um quadro de hipertensão gestacional ou crónica para pré-eclâmpsia, assim como, de risco elevado de complicações fetais e maternas<sup>334,344</sup>.

Outras determinações úteis no momento de diagnóstico são o hemograma, principalmente a contagem de plaquetas, a determinação das principais enzimas hepáticas: AST, ALT e LDH e a creatinina sérica. Estas determinações são utilizadas, principalmente, para a avaliação da extensão da resposta inflamatória e dano endotelial, sendo observado um quadro de trombocitopenia, devido à adesão plaquetária promovida pela ação das citocinas

inflamatórias, e enzimas hepáticas elevadas, resultantes da destruição do endotélio hepático, em muitos dos casos graves de pré-eclâmpsia<sup>344</sup>.

Em suma, a pré-eclâmpsia grave pode ser diagnosticada se estiver presente um dos seguintes fatores de diagnóstico laboratorial:

- Trombocitopenia<sup>331,335</sup> (plaquetas inferiores a 100 000/ $\mu$ l<sup>335,343</sup>);
- Insuficiência hepática evidenciada pelo aumento dos níveis de enzimas hepáticas<sup>331,335</sup>, dor no quadrante superior direito ou dor epigástrica persistente<sup>335</sup>;
- Insuficiência renal com nível sérico de creatinina superior a 1,1 mg/dl<sup>335</sup>.

Para além dos marcadores descritos, estudos também apontam para que os níveis de ácido ribonucleico (RNA) fetal na circulação materna sejam mais elevados em grávidas com pré-eclâmpsia do que naquelas com gravidez normal. No entanto, este marcador ainda necessita de ser explorado para ser considerado útil no diagnóstico laboratorial precoce da pré-eclâmpsia<sup>335</sup>.

## 8.2. Diagnóstico clínico

É sabido que a principal característica da pré-eclâmpsia é a presença de hipertensão com valores de pressão sistólica superiores ou iguais a 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica superior ou igual a 90 mmHg<sup>332,336,343</sup>. Contudo, o seu diagnóstico deve ser feito tendo em conta alguns critérios de medição, como a quantidade de medições, intervalo entre avaliações e dispositivos utilizados para o efeito. Para ser diagnosticado um quadro hipertensivo, a grávida tem de apresentar os valores já referidos em duas medições diferentes<sup>333,336,343</sup> no mesmo braço<sup>343</sup>, com um intervalo de medição entre quatro<sup>333,336</sup> a seis<sup>332</sup> horas, usando uma manga e um dispositivo apropriados para a medição da pressão arterial<sup>333</sup>.

A hipertensão pode ainda ser considerada grave se as pressões sistólica e/ou diastólica forem iguais ou superiores a 160 e 110 mmHg, respetivamente<sup>331,335,336,343</sup>. A medição da pressão arterial deve ser feita nas condições de medição já referidas, no entanto, com um intervalo entre medições de apenas alguns minutos, de modo a que seja administrada de imediato a terapêutica anti-hipertensiva<sup>336</sup>.

A avaliação do crescimento fetal e a disfunção uteroplacentária podem ser aferidas, de um modo geral, com recurso a técnicas ultrassonográficas<sup>333,334</sup>. Estas técnicas não invasivas<sup>334</sup> podem ser usadas associadas ao Doppler da artéria umbilical<sup>333,334,337</sup> ou às medidas da razão cerebroplacentária<sup>333</sup>, de modo a avaliar a redistribuição do fluxo sanguíneo<sup>333,337</sup> na isquemia<sup>334</sup> e insuficiência placentárias<sup>333</sup>. A ultrassonografia associada ao Doppler da artéria umbilical fetal é também um importante indicador da perfusão placentária, pois permite detetar uma reversão ou ausência do fluxo da artéria umbilical durante o período final da diástole, que acontece quando a resistência placentária é elevada. Nestes casos, o fluxo placentário diminui, apresentando-se como um indicador de risco de resultado fetal adverso, ou seja, preditivo de mortalidade perinatal. Por outro lado, podem ainda ser utilizadas medidas adicionais na ultrassonografia com Doppler, nomeadamente, a medição do fluxo através do ducto venoso ou da artéria cerebral média fetal. A medição do fluxo através do ducto venoso pode revelar alterações que provocam o comprometimento da placenta e a hipoxia, contribuindo para o diagnóstico da disfunção placentária em grávidas com pré-eclâmpsia de início precoce<sup>333</sup>.

Para além destas técnicas, também a ressonância magnética tem sido usada como marcador de fluxo uterino na avaliação da fração de perfusão placentária<sup>334</sup>.

### **8.3. Vigilância materno-fetal**

De modo a prever complicações resultantes do agravamento do quadro de pré-eclâmpsia, o acompanhamento continuado da grávida é recomendado. A vigilância materno-fetal consiste então na realização de ultrassonografias seriadas para avaliação do crescimento fetal<sup>354</sup>, monitorização da pressão arterial<sup>333,354</sup>, exames laboratoriais<sup>354</sup> e teste pré-parto<sup>336,354</sup>.

No que toca à vigilância fetal, esta normalmente é realizada a partir de relatos maternos de movimentos fetais, perfil biofísico, cardiocotografia<sup>333</sup>, determinação do volume do líquido amniótico<sup>333,336</sup>, ultrassonografia do crescimento fetal associada ao Doppler da artéria umbilical, ducto venoso, artéria cerebral média e razão cerebroplacentária<sup>333</sup>.

De entre os testes usados para vigilância fetal, a ultrassonografia com Doppler da artéria umbilical é fundamental, pois reduz intervenções obstétricas desnecessárias, como a indução do parto ou cesariana e a mortalidade perinatal, em casos graves de pré-eclâmpsia com complicações gestacionais. A periodicidade recomendada para a realização deste tipo de ultrassonografia é quinzenal, a partir do momento do diagnóstico de pré-eclâmpsia até ao

nascimento, desde que não tenham sido detetadas anormalidades em nenhuma das avaliações anteriores<sup>333</sup>. Também são recomendadas a monitorização do ducto venoso e da artéria cerebral média fetal através da ultrassonografia com Doppler para avaliação do bem-estar fetal.

Embora os exames laboratoriais realizados tenham uso limitado no prognóstico de complicações fetais, estes podem ser bastante úteis na avaliação da condição materna durante toda a gestação, mas também, na predição de complicações maternas. Estes exames, sobretudo bioquímicos<sup>333</sup>, devem ser realizados com uma periodicidade semanal desde o momento do diagnóstico até ao nascimento<sup>354</sup>.

A pré-eclâmpsia é uma síndrome ainda imprevisível, que tem uma variação inter e intraindividual, o que implica que as técnicas utilizadas para a vigilância materno-fetal sejam alteradas constantemente com base na condição materna e fetal em cada momento da gestação<sup>333</sup>.

## 9. Tratamento clínico

Atualmente, o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é o parto<sup>335,356</sup>. Contudo, antes da interrupção da gravidez têm de ser tidos em conta alguns fatores, como a idade gestacional, a gravidade da pré-eclâmpsia, o bem-estar fetal e a presença ou ausência de complicações<sup>356</sup>. Nos casos de pré-eclâmpsia com desenvolvimento de complicações em fases precoces da gestação, a aplicação de terapia eficaz pode ser uma mais valia para a estabilização da condição materna ou fetal até ao parto.

### 9.1. Parto

Segundo as diretrizes do ACOG, a observação contínua (gestão expectante) da grávida com pré-eclâmpsia sem características graves é aconselhada até ao parto a termo (trinta e sete ou mais semanas de gestação), para benefício neonatal. Em mulheres com pré-eclâmpsia com características graves e deterioração progressiva da condição materno-fetal, é recomendado o parto pré-termo, quando o diagnóstico é feito com trinta e quatro ou mais semanas de gestação e após a estabilização materna e rutura das membranas. Por outro lado, a mulheres com pré-eclâmpsia com características graves que estejam em período gestacional inferior a trinta e quatro semanas e a condição materna e fetal estiver estável, deve ser aplicada a mesma monitorização que nas grávidas com pré-eclâmpsia sem características graves. Nos casos de gestão expectante, o parto é recomendado sempre que ocorra uma deterioração da condição materna e fetal<sup>354</sup>.

As diretrizes do NICE diferem um pouco das diretrizes do ACOG, pois consideram que o parto é recomendado antes das trinta e quatro semanas, nos casos de pré-eclâmpsia grave e no fim de completado um ciclo de esteroides. No caso de grávidas com pré-eclâmpsia e período gestacional entre as trinta e quatro e as trinta e seis semanas, o parto é indicado, após um ciclo de esteroides, se houver evidência de comprometimento materno ou fetal. Em grávidas com pré-eclâmpsia e com período gestacional superior a trinta e sete semanas, o parto é indicado dentro de vinte e quatro a quarenta e oito horas<sup>343</sup>.

Em ambas as entidades, o parto é recomendado caso se deteriore a condição materna ou fetal, ou seja, caso sejam verificadas as seguintes condições:

- Maternas:
  - Hipertensão grave (pressão arterial sistólica superior ou igual a 160 mmHg e/ou pressão arterial diastólica superior ou igual a 110 mmHg) não responsiva ao tratamento hipertensivo<sup>331,354</sup> (uso de três ou mais classes de anti-hipertensivos<sup>346</sup>);
  - Início de complicações periparto não controláveis, como dores de cabeça<sup>346,354</sup>, dor epigástrica ou no quadrante superior direito<sup>354</sup>, perturbações visuais<sup>346,354</sup>, déficit motor ou sensorial<sup>354</sup>, hemorragia, enfarte do miocárdio, síndrome de HELLP<sup>331</sup>, disfunção renal, edema pulmonar<sup>331,354</sup>, eclâmpsia, deslocamento da placenta<sup>331,346,354</sup> ou hemorragia vaginal<sup>354</sup>.
- Fetais:
  - Teste fetal anormal<sup>354</sup>;
  - Morte fetal<sup>346,354</sup>;
  - Feto sem expectativa de sobrevivência no momento do diagnóstico materno (por exemplo, anomalia letal, prematuridade extrema)<sup>354</sup>;
  - Fluxo diastólico final reverso persistente na artéria umbilical<sup>346,354</sup>.

## 9.2. Terapêuticas utilizadas na clínica

Como já mencionado, o desenvolvimento de pré-eclâmpsia de início precoce aumenta a prevalência de complicações perinatais, pelo que têm sido aplicadas algumas terapêuticas quando ainda não é possível ou recomendável a interrupção da gravidez<sup>333,356</sup>. Estas terapias permitem manter estável o quadro clínico materno e vigiar a vitalidade fetal enquanto se aguarda a maturação do feto<sup>356</sup>, evitando o desenvolvimento de complicações maternas e fetais associadas à pré-eclâmpsia. Tendo em conta a sua utilização, as terapias aplicadas na clínica, atualmente, podem ser agrupadas em dois grupos: Terapias para otimização da condição materna e Terapias para a otimização da condição fetal. Para a otimização da condição materna são, normalmente, utilizadas as terapias anti-hipertensivas e, se necessário, terapias anticonvulsivantes, enquanto que para a otimização das condições fetais, são recomendadas a administração de corticosteroides pré-natais, mas também as terapias anticonvulsivas<sup>333</sup>.

### **9.2.1. Terapia pré-natal com corticosteroides**

O nascimento prematuro implica um desenvolvimento incompleto da árvore brônquica, associado a uma imaturidade dos pulmões e deficiência de surfactante, provocando um quadro de insuficiência respiratória no recém-nascido prematuro. Os corticosteroides atuam nos pneumócitos tipo II fetais, células responsáveis pela secreção de surfactante<sup>356</sup>, que reduz a tensão superficial alveolar, facilitando a respiração, pelo que a sua utilização é recomendada para promover a maturidade pulmonar fetal<sup>335</sup>.

A administração de corticoterapia é aconselhada a mulheres com pré-eclâmpsia com características graves, mas estáveis<sup>335</sup>, e com um período de gestação inferior a trinta e quatro semanas<sup>333,335</sup>. Para além disso, os dois corticosteroides mais utilizados são a betametasona e a dexametasona, eficazes na redução do risco de morte perinatal e complicações neonatais como a síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intraventricular e enterocolite necrosante. Todavia, a utilização deste tipo de terapia pode levar a alterações a longo prazo na vasculatura e metabolismo da glicose do recém-nascido pelo que a sua administração deve ser avaliada tendo em conta os riscos e benefícios<sup>333</sup>.

### **9.2.2. Terapia anticonvulsivante**

O sulfato de magnésio foi, primeiramente, recomendado para o tratamento da pré-eclâmpsia<sup>356</sup>, no entanto, atualmente sabe-se que este fármaco é também recomendado para a prevenção das crises convulsivas (eclâmpsia) em gestantes com pré-eclâmpsia<sup>333,356</sup> e para a redução do risco de desenvolvimento de depressão respiratória no recém-nascido. Vários estudos apontam para uma efetividade maior do sulfato de magnésio no que toca à redução do risco de morte materna em grávidas com eclâmpsia, quando comparado a outros anticonvulsivos, como a fenitoína e o diazepam<sup>356</sup>.

A administração de sulfato de magnésio é então recomendada em mulheres com pré-eclâmpsia com menos de trinta e quatro semanas de gestação<sup>333</sup> ou que possuam características graves de pré-eclâmpsia<sup>356</sup>, bem como, em grávidas que tenham marcado um parto prematuro. Para além disso, o ACOG recomenda a administração parental com continuação durante e após o parto para mulheres com eclâmpsia e pré-eclâmpsia submetidas a cesariana<sup>335</sup>. A administração deste fármaco no período pré-natal confere ainda um efeito neuroprotetor fetal,

prevenindo a ocorrência de paralisia cerebral na prole<sup>333</sup>, sendo em todos os casos recomendadas duas doses, a dose de ataque e a dose de manutenção<sup>356</sup>.

O modo de administração mais eficaz ainda não é cientificamente conhecido, no entanto, a administração venosa é mais utilizada, por ser menos dolorosa e facilmente interrompida em casos de manifestações de toxicidade, do que a administração intramuscular<sup>356</sup>.

### **9.2.3. Terapia anti-hipertensiva**

Um dos sinais clínicos característicos da pré-eclâmpsia é a hipertensão, pelo que o seu controlo se torna um fator importante para a otimização da condição materna.

Atualmente, o ACOG não recomenda o uso de anti-hipertensivos para o tratamento farmacológico da hipertensão leve e moderada (pressão sistólica inferior a 160 mmHg ou pressão diastólica inferior a 110 mmHg) em gestantes com pré-eclâmpsia. Esta recomendação é fundamentada em estudos científicos que têm mostrado que, nestes casos, o risco de progressão da doença não é atenuado pela terapêutica, para além de que aumenta o risco de restrição do crescimento fetal. Por outro lado, o uso de anti-hipertensivos como o labetalol, nifedipina ou metildopa torna-se fundamental para o tratamento de gestantes pré-eclâmpicas com hipertensão grave<sup>334</sup>.

## **9.3. Novas terapêuticas**

Devido às opções limitadas no tratamento da pré-eclâmpsia<sup>345</sup>, encontram-se em desenvolvimento outro tipo de terapias que se têm revelado promissoras no tratamento dos sinais e sintomas clínicos desta doença, mas também no prolongamento da gestação<sup>334,335</sup>. Para além disso, a maior parte destas terapias são direcionadas à proteína antiangiogénica sFlt-1, fundamental na fisiopatologia da pré-eclâmpsia<sup>345</sup>.

### **9.3.1. Terapias com fatores pró-angiogénicos**

Como já referido, o VEGF e o PlGF são os fatores angiogénicos inibidos pela ligação de sFlt-1 em circulação. Assim, para evitar a ligação de sFlt-1 aos fatores angiogénicos, com

consequente disfunção endotelial, foram desenvolvidos e estão a ser testados fatores angiogénicos recombinantes<sup>335</sup> (rPlGF)<sup>334,335,345</sup>, mais específicos na ligação a sFlt-1.

Também a relaxina, uma proteína pró-angiogénica específica da gravidez, normalmente produzida pelo corpo lúteo, está a ser estudada como um potencial terapêutico para a pré-eclâmpsia<sup>335</sup>.

### **9.3.2. Terapias baseadas em RNA de interferência**<sup>334,335</sup>

De um modo geral, as terapias baseadas em RNA de interferência (RNAi) (oligonucleótidos) usam moléculas silenciadoras do RNA para catalisar a destruição de sequências altamente específicas de RNA mensageiro, evitando a tradução e síntese de proteínas celulares específicas<sup>345</sup>, o que resultaria na inibição da produção de sFlt-1 nos casos de pré-eclâmpsia. Estas terapias tornar-se-ão bastante úteis em países em desenvolvimento, onde a incidência de pré-eclâmpsia está associada a uma morbilidade muito alta, pois são terapias mais baratas do que as terapias com proteínas recombinantes<sup>335,345</sup>.

É de salientar ainda que são necessários vários estudos para aprofundar a farmacocinética e a dinâmica do RNAi, de modo a otimizar a dose e o horário de administração e o nível de silenciamento do sFlt-1<sup>345</sup>.

### **9.3.3. Aférese**

Em Medicina, aférese é a separação dos elementos constituintes do sangue<sup>357</sup> e, quando aplicado ao contexto clínico da pré-eclâmpsia, implica a remoção do excesso de proteínas antiangiogénicas, com recurso a métodos extracorporais<sup>335,345</sup>. Os métodos de aférese estudados inicialmente utilizavam uma coluna de dextranossulfato (DSA), normalmente utilizada para a remoção de LDL, para a redução dos níveis de sFlt-1 por meio de interações inespecíficas entre a coluna de DSA (carga negativa) e a proteína sFlt-1 (carga positiva). No entanto, a remoção de sFlt-1 utilizando este tipo de coluna não se mostrou eficiente nem seletiva, pois também removia outros componentes plasmáticos importantes para o desenvolvimento da gestação, como por exemplo, o fibrinogénio. De forma a colmatar este tipo de problemas, estão atualmente em desenvolvimento colunas de adsorção que usam anticorpos monoclonais para a remoção seletiva de sFlt-1<sup>335</sup>.

De referir que estes métodos se têm mostrado bastante promissores, tendo em conta que evitam a exposição do feto a medicamentos potencialmente prejudiciais<sup>335</sup>.

#### **9.3.4. Terapia com antioxidantes**

O uso de antioxidantes direcionados às mitocôndrias tem sido alvo de investigação como estratégia para reverter o stress oxidativo originado pela produção de ROS, por parte das mitocôndrias, e que é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia<sup>335</sup>. No entanto, ainda não existem estudos conclusivos sobre quais são os antioxidantes eficazes nem se a sua utilização traz efeitos secundários indesejados.

#### **9.3.5. Terapia com estatinas**

Estudos recentes demonstraram que a aplicação de uma terapia com estatinas é capaz de melhorar a função vascular<sup>334,335</sup> através da estimulação da expressão de HO1, o que leva à diminuição da produção placentária de sFlt-1. No entanto, a utilização deste tipo de terapia apenas foi testada em modelos animais<sup>335</sup> e em amostras de tecidos humanos *ex vivo*<sup>334</sup>, pelo que são necessários mais estudos para tirar conclusões definitivas sobre o papel das estatinas *in vivo* na prevenção ou tratamento da pré-eclâmpsia<sup>335</sup>.

#### **9.3.6. Terapia com antidiabéticos**

A metformina é um sensibilizador à insulina utilizado principalmente no tratamento da diabetes *mellitus* tipo II. No entanto, este hipoglicemiante tem sido associado à redução da incidência de distúrbios hipertensivos na gravidez, bem como à diminuição dos níveis circulantes de sFlt-1 e sEndoglinina *in vitro*<sup>334</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado que a aplicação da terapia com metformina durante o período gestacional é segura<sup>334</sup>, sendo uma terapia com potencial no tratamento da pré-eclâmpsia.

## 10. Prevenção

Estudos recentes indicam que as taxas de morbidade e mortalidade associadas à pré-eclâmpsia podem ser reduzidas se for feita uma intervenção efetiva e oportuna, mostrando a importância da triagem e vigilância de mulheres grávidas com fatores de risco para o desenvolvimento desta doença<sup>343</sup>.

Nesse sentido, nos últimos anos têm sido estudadas formas de reduzir a prevalência da pré-eclâmpsia, com o auxílio farmacológico<sup>328</sup>. Estes estudos têm sido efetuados em mulheres com alto risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia de início precoce e os resultados apontam para uma eficácia elevada quando utilizado o ácido acetilsalicílico como terapia profilática<sup>328,333,334,342</sup>, devido aos seus efeitos antiagregantes-plaquetários<sup>342</sup>. Segundo as diretrizes do ACOG, a presença de um fator de alto risco ou, pelo menos dois fatores de risco moderado<sup>333,342</sup>, é necessária para a orientação da profilaxia com ácido acetilsalicílico, que tem mostrado alta eficácia na redução da incidência de pré-eclâmpsia, principalmente a de início precoce, desde que administrada antes das dezasseis semanas de gestação<sup>333,335,336,339,340</sup>. O uso em baixas doses deste fármaco tem sido altamente recomendado pela OMS e ACOG<sup>329,358</sup> em mulheres com fatores de alto risco para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia<sup>335,339,340,342,349</sup> e, quando tomado desde as doze semanas até ao fim da gestação<sup>333,336</sup>, tem prevenido o desenvolvimento de pré-eclâmpsia de início precoce<sup>328,334</sup> e diminuído a taxa de nascimentos antes das trinta e duas semanas de gestação<sup>328,342</sup>. Porém, a administração de ácido acetilsalicílico tem sido associada a efeitos secundários maternos como sangramento gastrointestinal e doença respiratória exacerbada por aspirina<sup>342,349</sup>, mas também ao descolamento prematuro da placenta e morte perinatal<sup>342</sup>.

De forma a evitar possíveis efeitos secundários da ingestão de ácido acetilsalicílico, outras intervenções profiláticas, como a ingestão de suplementos nutricionais, alterações na dieta e no estilo de vida e a administração de outros fármacos, foram estudadas. Contudo, apesar de se terem mostrado promissoras, a sua eficácia mostrou-se variável<sup>333</sup>.

A suplementação de cálcio em doses elevadas tem exibido resultados favoráveis na redução do risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia e, conseqüentemente, de parto prematuro<sup>328</sup>. Esta terapia profilática torna-se eficiente em gestantes com dietas pobres em cálcio<sup>328,329,358</sup> ou quando é utilizada conjuntamente com a redução do IMC. Por sua vez, a utilização de baixas doses de cálcio também tem apresentado redução do risco de

desenvolvimento de pré-eclâmpsia e hipertensão<sup>328</sup>, no entanto, são necessários mais estudos clínicos com elevada qualidade para comprovar a sua eficácia<sup>328,329,358</sup>.

A suplementação com vitamina D também pode oferecer algum benefício na redução do risco de pré-eclâmpsia, uma vez que a deficiência desta vitamina é, por muitos autores, considerada um fator de risco. Para além desta vitamina, a L-arginina, a pravastatina, a coenzima Q10 e a cetanserina foram associadas a taxas mais baixas de pré-eclâmpsia, contudo, são necessários estudos com uma população maior de forma a avaliar a sua eficácia e segurança<sup>333</sup>.

Outros suplementos nutritivos foram igualmente estudados, como a suplementação com vitamina C, vitamina E<sup>333,335</sup> (antioxidantes inespecíficos<sup>335</sup>) ou ácido fólico<sup>333</sup>, no entanto, a sua utilização não mostrou ter benefício na prevenção da pré-eclâmpsia<sup>333,335</sup>.

Para além dos anteriormente descritos, a utilização de progestogénios, mais precisamente o caproato de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona e a didrogesteron, tem sido apontada como uma terapia profilática emergente<sup>328</sup>. Estes fármacos são derivados da progesterona, hormona produzida pela placenta e que controla a invasão trofoblástica<sup>344</sup>, sendo, por isso, fundamentais para a prevenção de um dos processos implicados no desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Em estudos recentes, a ingestão de didrogesteron por grávidas com alto risco de pré-eclâmpsia mostrou uma frequência menor de sinais e sintomas como hipertensão, proteinúria e alterações do fluxo sanguíneo uteroplacentário, mas também de uma menor incidência de complicações, como atrasos de crescimento fetal ou nascimento prematuro<sup>328</sup>. Estudos clínicos mostraram que a suplementação com progesterona, através da ingestão de didrogesteron no início da gravidez, diminui a resistência vascular em grávidas de alto risco, melhorando o fluxo sanguíneo endometrial e evitando o desenvolvimento dos distúrbios placentários que estão na origem da pré-eclâmpsia<sup>328</sup>. Por sua vez, a ingestão de didrogesteron no segundo trimestre (dezassete a vinte semanas de gestação), previne o aparecimento de pré-eclâmpsia numa fase final do desenvolvimento da placenta. Como já referido, o segundo trimestre é o período no qual ocorre nova invasão trofoblástica, com conseqüente aumento do diâmetro vascular e do fluxo uteroplacentário<sup>328</sup> e, portanto, uma fase crítica e propensa a que ocorram distúrbios placentários.

As intervenções no estilo de vida podem reduzir a ocorrência de pré-eclâmpsia, principalmente, as intervenções dietéticas. Vários estudos sugeriram que as taxas de incidência da pré-eclâmpsia eram mais baixas em gestantes com uma dieta vegetal mais alta<sup>333</sup>. Por outro lado, enquanto alguns estudos apontam o tabagismo como um fator de risco para o

desenvolvimento de pré-eclâmpsia<sup>335,343</sup>, outros afirmam que este é um fator preventivo desta síndrome, com um risco inversamente proporcional ao número de cigarros fumados<sup>333</sup>.

Em suma, muitas são as propostas de terapia profilática propostas e potencialmente eficazes, no entanto, atualmente, nenhuma mostra resultados idealmente satisfatórios na prática clínica para a prevenção da incidência de pré-eclâmpsia<sup>328</sup>.

## Conclusões, limitações e perspectivas futuras

Atualmente, apesar do desenvolvimento da medicina, a incidência de distúrbios hipertensivos da gravidez continua a aumentar em todo o mundo, não apenas nos países em desenvolvimento, mas também nos países desenvolvidos, sendo a pré-eclâmpsia a doença mais prevalente. Isto acontece devido ao aumento de alguns fatores de risco maternos que fazem com que o risco de alterações fisiopatológicas durante a gestação seja elevado, como é o caso da concepção com idade avançada e a presença de obesidade.

O desconhecimento da etiologia e a incerteza de muitos dos mecanismos fisiopatológicos da pré-eclâmpsia torna o diagnóstico tardio, o que faz com que muitos dos casos de pré-eclâmpsia evoluam para complicações materno-fetais com desfecho adverso. Embora exista já um número considerável de estudos em relação à pré-eclâmpsia, a maioria tem-se focado, principalmente, na descoberta de marcadores de diagnóstico e nem sempre apresentam resultados conclusivos em relação à hipótese em estudo. Num futuro próximo seria importante a investigação aprofundada da fisiopatologia desta síndrome, tendo em conta que entendendo todas as alterações patológicas será mais fácil criar métodos que auxiliem o clínico no diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia. Para além disso, é importante que também sejam efetuados estudos e avanços principalmente no rastreio materno-fetal, assim como no cuidado pré-natal, perinatal e pós-natal de grávidas pré-eclâmpticas e dos seus filhos<sup>333</sup>, principalmente nos países em desenvolvimento, onde as taxas de incidência da pré-eclâmpsia são maiores.

A prevenção deve ser também uma das principais áreas de investimento tendo em conta que a maior parte dos desfechos adversos da pré-eclâmpsia poderia ser evitado com o uso de terapia profilática ou hábitos de vida saudáveis. Para que isso aconteça será de especial importância a sensibilização das mulheres para consultas de planeamento familiar ou consulta pré-concepcional, que permitem a determinação do risco concepcional, em particular o risco genético, através da história reprodutiva, médica e familiar, mas também os possíveis efeitos que a gestação terá sobre as condições médicas já existentes, quer do ponto de vista materno, quer fetal. Nestas consultas, a mulher é consciencializada para todos os fatores de risco que terá durante a gravidez e orientada para a introdução de alterações no estilo de vida ou cuidados a ter durante a gestação, de acordo com os riscos identificados<sup>359</sup>.

Em suma, o progresso do conhecimento da pré-eclâmpsia passa fundamentalmente pelo esclarecimento completo sobre a etiologia e fisiopatologia desta síndrome, de maneira a que

possam ser desenvolvidos testes de rastreio e diagnóstico específicos e adequados, mas também, que possam ser estudadas as terapias profiláticas mais eficientes.

## Referências bibliográficas

### Parte I: Relatório de estágio

1. *Plano de Atividades e Orçamento 2018 do CHMT*. (2018).
2. Visão, Missão e Valores. em *Manual da Qualidade* (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2012).
3. *Plano de Prevenção de Riscos de Gestão – Revisão 3*. (2016).
4. Apresentação – CHMT. Disponível em: <http://www.chmt.min-saude.pt/instituicao/>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
5. Descrição do Serviço e Organigrama. em *Manual da Qualidade* (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2015).
6. Modulab | Werfen em Portugal. Disponível em: <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/modulab>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
7. *Condições Gerais de Colheita e Conservação de Amostras Biológicas (Protocolo)*. (2007).
8. *Receção de Amostras Biológicas no Serviço de Patologia Clínica (Procedimento)*. (2018).
9. *Colheitas de Amostras Biológicas no Serviço de Patologia Clínica (Procedimento)*. (2018).
10. *Critérios de Rejeição de Requisição e de Amostras Biológicas (Protocolo)*. (2014).
11. *Colheita em Ambulatório (Instrução de Trabalho)*. (2008).
12. *Normas de Identificação do Utente (Instrução de Trabalho)*. (2014).
13. Sarstedt. Disponível em: <https://www.sarstedt.com/en/home/>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
14. *Colheitas de Produtos para Estudo Microbiológico*. (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2014).
15. *Manual de Segurança para as Boas Práticas Laboratoriais*. (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2014).
16. *Circuito de amostras biológicas (Instrução de Trabalho)*. (2018).
17. *Standardização do processo de centrifugação (Instrução de Trabalho)*. (2006).
18. *Condições Pré Analíticas para determinação na Área da Hemostase (Instrução de Trabalho)*. (2014).

19. *Colheita e Conservação/Acondicionamento de Amostras Biológicas para Análises de Imunoquímica (Protocolo)*. (2019).
20. *Receção de Amostras Biológicas para Estudo Microbiológico (Instrução de Trabalho)*. (2014).
21. Beckman Coulter, I. *AutoMate 2500 Family Sample Processing System - Instruções de utilização*. (Beckman Coulter, Inc., 2018).
22. CORPORATION, S. *XN series - Instruções de Utilização*. (2016).
23. Analisador de velocidade de hemossedimentação automático - TEST 1 - ALIFAX - para diagnóstico clínico. Disponível em: <https://www.medicaexpo.com/pt/prod/alifax/product-67562-430479.html>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
24. Inc., A. *ADAMS A1c HA-8160 Operating Manual*. (A. MENARINI DIAGNOSTICS).
25. RAL Diagnostics - Reagents, medical analysis stains, in vitro diagnostic. Disponível em: <https://www.ral-diagnostics.fr/en/>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
26. Família ACL TOP Série | Werfen em Portugal. Disponível em: <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/familia-acl-top-serie>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
27. Biosciences | BD Biosciences-EU. Disponível em: <https://www.bdbiosciences.com/en-eu>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
28. BD Biosciences. *BD FACSCalibur - Instruções de Utilização*. (BD Biosciences, 2007).
29. GEL ELECTROPHORESIS | Sebia. Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/groupeproduits/gel-electrophoresis>. (Acedido: 27.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
30. Hoffbrand, A. V. & Moss, P. a. H. *Fundamentos em Hematologia*. (ARTEMED EDITORA, LDA, 2013).
31. Red Blood Cell Count- Understand the Test. Disponível em: <https://labtestsonline.org.uk/tests/red-blood-cell-count>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
32. Haemoglobin Test- Understand the Test. Disponível em: <https://labtestsonline.org.uk/tests/haemoglobin>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
33. PCV - Understand the Test. Disponível em: <https://labtestsonline.org.uk/tests/pcv>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
34. Silva, I. B. M. da. Hematologia I - Primeira aula prática (powerpoint). (2018).
35. Interpretação de Análises Clínicas - BioCampello. Disponível em: <https://www.biocampello.com/Interpretacao-das-suas-Analises-Clinicas>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
36. Silva, I. B. M. da. Hematologia I - Origem das células sanguíneas (powerpoint). (2018).

37. Marques, A. A. & Souza, T. de A. A presença de eritroblastos no sangue periférico como biomarcador de mortalidade em pacientes com sepse – Revisão. *Rev. UNILUS Ensino e Pesqui.* **12**, 111 (2015).
38. Leucócitos - Sysmex España. Disponível em: <https://www.sysmex.es/es-pt/academia/knowledge-centre/leucocitos.html>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
39. Correia, L. Hematologia II - Alterações não malignas dos granulócitos (powerpoint). (2018).
40. Trombocitose reativa (trombocitemia secundária) - Hematologia e oncologia - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/distúrbios-mieloproliferativos/trombocitose-reativa-trombocitemia-secundária>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
41. Monteiro, L. Valores de referência dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma. *Rev. Bras. Análises Clínicas* **49**, (2017).
42. Contagem de reticulócitos. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/contagem-de-reticulocitos>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
43. Cha, C. H. *et al.* Erythrocyte sedimentation rate measurements by TEST 1 better reflect inflammation than do those by the Westergren method in patients with malignancy, autoimmune disease, or infection. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 189–194 (2009).
44. VHS. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/vhs>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
45. Lopes, S. T. dos A. *et al.* Valores de referência do tempo de protrombina (TP) e tempo de trombolastina parcial ativada (TTPa) em cães. *Ciência Rural* **35**, 381–384 (2005).
46. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* **58**, 515–523 (2014).
47. Cascata de coagulação. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/Rutxizita/cascata-de-coagulao>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
48. Ramos, C. P. D. S. *et al.* Protrombina mutante em indivíduos sob investigação de trombofilia. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **44**, 79–82 (2008).
49. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. RecombiPlasTin 2G. (2019).
50. SynthASil. (2017).
51. Mauro, M. F. Z. *et al.* Novos Inibidores da Trombina: Qual o Estado Atual das Pesquisas? *Rev Bras Cardiol Invas* **12**, 130–137 (2004).
52. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. Thrombin Time. (2017).
53. Fibrinogénio. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/fibrinogenio>. (Acedido:

28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)

54. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. D-Dimer HS 500. (2018).
55. Dacie, J. & Lewis, S. M. *Practical Haematology*. (Longman Group UK Limited, 1991).
56. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. dRVVT Screen / dRVVT Confirm. (2016).
57. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. Liquid Antithrombin. (2017).
58. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. Protein C. (2017).
59. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. Free Protein S. (2019).
60. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. von Willebrand Antigen. (2018).
61. Instrumentation Laboratory Company - Bedford, M. Factor VIII deficient plasma. (2017).
62. Pesquisa de Eosinófilos no Exsudado Nasal no diagnóstico da Rinite Alérgica - Laboratórios Germano de Sousa. Disponível em: <https://laboratoriosgermanodesousa.blogs.sapo.pt/pesquisa-de-eosinofilos-no-exsudado-26518>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
63. HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) | Sebia en-EN. Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-hemoglobine>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
64. Miranda, A. *et al.* Variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S. *Obs. Bol. Epidemiológico* **23**, 1–4 (2018).
65. HbS Solubility Screening Kit. (2016).
66. Almeida, R. A. de & Beretta, A. L. R. Z. Sickle Cell Disease and laboratory approach: a brief literature review. *Rev. Bras. Análises Clínicas* **49**, (2017).
67. Guimarães, J., Bastos, M. & Carvalheiro, M. Hemoglobina Glicada (A1c): Métodos de Doseamento Calibração IFCC/DCCT. Considerações. *Rev. Port. Diabetes* **4**, 24–26 (2006).
68. Lavouras, L. I. da C. Hemoglobinopatias: Diagnóstico Laboratorial e sua importância. (2015).
69. Dusse, L. M. S., Vieira, L. M. & Carvalho, M. das G. Pseudotrombocitopenia. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **40**, 321–324 (2004).
70. HLA-B gene: MedlinePlus Genetics. Disponível em: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/hla-b/#conditions>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
71. A espondilite anquilosante e o antígeno HLA-B27. Disponível em:

- <http://www.ipr.pt/index.aspx?p=MenuPage&MenuId=179>. (Acedido: 28.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
72. *Contagem de Células em Líquidos Biológicos (Ascítico, Peritoneal, Pleural, Dialisado e Sinovial) (Instrução de Trabalho)*. (2013).
  73. *Contagem de Células no Líquido Cefalo Raquídeo Instrução de Trabalho*. (2017).
  74. Carvalho, E. B. *et al.* Rastreamento familiar do fator V de Leiden: a importância da detecção de portadores heterozigotos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **27**, 83–86 (2005).
  75. Herkenhoff, M. E. *et al.* Analysis of prothrombin G20210A mutation (factor II) in patients with suspected trombophilia in Southern Brazil. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **48**, 85–89 (2012).
  76. Soares, A. L. *et al.* Avaliação da incidência das mutações G1691A no gene do fator V (fator V Leiden) e G20210A no gene da protrombina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **27**, 192–196 (2005).
  77. Cepheid AB. Xpert® HemosIL® FII & FV. (2017).
  78. *Interpretação e Validação de Resultados Microbiológicos (Instrução de Trabalho)*. (2014).
  79. BioFire Diagnostics, L. *FilmArray® - Instruções de utilização*. (BioFire Diagnostics, LLC, 2017).
  80. Cepheid AB. Xpert® MTB/RIF. (2012).
  81. Cepheid | Permitindo acesso a testes de diagnóstico molecular em qualquer lugar. Disponível em: <https://www.cephheid.com/>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
  82. BioMérieux, I. *VITEK 2 - Manual do Utilizador do Aparelho*. (bioMérieux, Inc., 2008).
  83. Overview microflex series - Highest performance bench-top MALDI-TOF MS | Bruker. Disponível em: <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-toftof/microflex.html>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
  84. BACTEC™ 9120™ | Diagnostocel. Disponível em: <http://diagnostocel.com.br/diagnostico-in-vitro/bactec-9120/>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
  85. *BACTEC™ 9120™*. (2001).
  86. S.A., Q.-Q. L. A. *BACTEC 9000 - Dossier de Assistência Técnica*. (Quilaban - Quimica Laboratorial Analítica, S.A., 2019).
  87. Aerospray® Gram Series 2 – ELITechGroup: In Vitro Diagnostic Equipment & Reagents. Disponível em: <https://www.elitechgroup.com/product/aerospray-gram-series-2-2>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
  88. ELITechGroup - United Kingdom. Disponível em: <https://www.elitechgroup.com/uk/>.

(Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)

89. PolyStainer - Slide Stainer - IUL. Disponível em: <https://iul-instruments.com/product/polystainer-slide-stainer/>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
90. IUL Instruments. Disponível em: <https://iul-instruments.com/>. (Acedido: 29.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
91. *Processamento de Produtos para Exame Microbiológico (Instrução de Trabalho)*. (2014).
92. *Preparação de Esfregaço para Coloração (Instrução de Trabalho)*. (2014).
93. *Colorações - Automática e Manual (Instrução de Trabalho)*. (2014).
94. *Exame Direto a Fresco com Contraste Negativo por Tinta da China (Instrução de Trabalho)*. (2014).
95. *Culturas Primárias (Instrução de Trabalho)*. (2014).
96. Fonseca, A. et al. *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia*. (Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, 2004).
97. *Subculturas (Instrução de Trabalho)*. (2014).
98. bioMérieux, S. VITEK® 2 AST-N373. (2017).
99. MIC-Strip Colistin. (2018).
100. *CQI - Testes de Identificação e Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Equipamento Automático (Instrução de Trabalho)*. (2017).
101. NG-Test CARBA 5. 70–71
102. Strep A Rapid Test Cassette (Throat Swab).
103. Limited, O. DrySpot Pneumo. (2013).
104. Chemtrue® - Teste One-Step FOB.
105. Chemtrue® - One-Step FOB Test. (2010).
106. Kit de Concentração de Ovos/Parasitas Fecais.
107. R-Biopharm AG. RIDA®QUICK Campylobacter. (2017).
108. CDC - Parasites - About Parasites. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/about.html>. (Acedido: 1.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
109. R-Biopharm AG. RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi. (2010).
110. Cepheid AB. Xpert® C. difficile BT. (2016).
111. R-Biopharm AG. RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH. (2013).
112. R-Biopharm AG. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B. (2020). doi:10.1038/scibx.2010.1122
113. *Pesquisa de Clostridium difficile (Instrução de Trabalho)*. (2017).

114. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B (en) - Clinical Diagnostics. Disponível em: <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridaquick-clostridium-difficile-toxin-ab/>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
115. BioFire Diagnostics, L. FilmArray® Gastrointestinal Panel. (2017).
116. BioFire Diagnostics, L. FilmArray® Blood Culture Identification Panel. (2018).
117. BioFire Diagnostics, L. FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel. (2017).
118. BioFire Diagnostics, L. FilmArray® Respiratory Panel 2 plus. (2017).
119. Cepheid AB. Xpert® vanA/vanB. (2013).
120. Cepheid AB. Xpert® MRSA NxG. (2017).
121. Cepheid AB. Xpert® Carba-R. (2015).
122. Cepheid AB. Xpert® Flu. (2017).
123. Cepheid AB. Xpert® HPV. (2017).
124. Meningite bacteriana | SNS24. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/meningite-meningococica/#sec-0>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
125. Serosa - Infopédia. Disponível em: [https://www.infopedia.pt/\\$serosa](https://www.infopedia.pt/$serosa). (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
126. Merino, A. & Marín, J. L. Citología Y Bioquímica De Los Líquidos Biológicos. *Educ. Contin. en el Lab. Clínico* **28**, 112–135 (2017).
127. Otite | CUF. Disponível em: <https://www.cuf.pt/saude-a-z/otite>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
128. Infecções gastrointestinais | bioMérieux Brasil. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/recursos/healthcare-information/gastro-intestinal-infections>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
129. Infecções Respiratórias Agudas (IRA): Trato Respiratório Inferior. Disponível em: <http://bioemfoco.com.br/noticia/infecoes-respiratorias-agudas-ira-trato-respiratorio-inferior/>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
130. Beckman Coulter, I. *DxC 700 AU da BECKMAN COULTER - Instruções de utilização*. (Beckman Coulter, Inc., 2019).
131. Beckman Coulter, I. *UniCel Dxl - Instruções de Utilização Para Utilização no Diagnóstico In Vitro*. (Beckman Coulter, Inc, 2016).
132. Healthcare business news, trends & developments. Disponível em: <https://healthcare-in-europe.com/en/home/>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
133. Beckman Coulter, I. *Access 2 - Instruções de utilização para Diagnóstico In Vitro*. (Beckman Coulter, Inc., 2017).

134. Immunoassay Analyzer Access 2 Immunoassay System | Beckman Coulter. Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/products/immunoassay/access-2>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
135. bioMérieux, S. *VIDAS® Instrument User's Manual*. (bioMérieux® SA, 2005).
136. GEM Premier 3000 | Werfen em Portugal. Disponível em: <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/gem-premier-3000>. (Acedido: 2.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
137. Silva, M. J. M. dos S. F. da. Bioquímica Clínica I - Glúcidos em Bioquímica Clínica Parte I (powerpoint). (2018).
138. Beckman Coulter, I. Glucose - Instruções de utilização AU. (2019).
139. Beckman Coulter, I. Urea - Instruções de utilização AU. (2019).
140. Beckman Coulter, I. Creatinine - Instruções de utilização AU. (2019).
141. Beckman Coulter, I. ISE Reagents/Standards - Instruções de utilização AU. (2019).
142. Beckman Coulter, I. Uric Acid - Instruções de utilização AU. (2019).
143. Beckman Coulter, I. Ácido úrico - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2019).
144. Beckman Coulter, I. Albumin - Instruções de utilização AU. (2018).
145. Beckman Coulter, I. Urine CSF Albumin - Instruções de utilização AU. (2019).
146. Silva, M. J. M. dos S. F. da. Bioquímica Clínica I - Proteínas em Bioquímica Clínica Parte A (powerpoint). (2018).
147. Beckman Coulter, I. Total Protein - Instruções de utilização AU. (2018).
148. Beckman Coulter, I. Urinary/CSF Protein - Instruções de utilização AU. (2018).
149. Inc., B. C. Total Bilirrubin - Instruções de utilização AU. (2019).
150. Beckman Coulter, I. Direct Bilirrubin - Instruções de utilização AU. (2019).
151. Beckman Coulter, I. Alkaline Phosphatase - Instruções de utilização AU. (2019).
152. Beckman Coulter, I. Gamma-Glutamyltransferase - Instruções de utilização AU. (2018).
153. Beckman Coulter, I. ALT - Instruções de utilização AU. (2018).
154. Beckman Coulter, I. Alanina Aminotransferase - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).
155. Beckman Coulter, I. AST - Instruções de utilização AU. (2018).
156. Beckman Coulter, I. Cholinesterase - Instruções de utilização AU. (2018).
157. CH, S. ACE Liquid - Determinação da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) em soro humano e plasma. (2019).
158. Silva, M. J. M. dos S. F. da. Bioquímica Clínica I - Avaliação bioquímica da Função Hepática (powerpoint). (2018).
159. Beckman Coulter, I. a-Amylase - Instruções de utilização AU. (2019).

160. Beckman Coulter, I. Lipase - Instruções de utilização AU. (2018).
161. Beckman Coulter, I. CRP Latex - Instruções de utilização AU. (2019).
162. Beckman Coulter, I. Proteína C-Reactiva - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).
163. bioMérieux, S. VIDAS® B·R·A·H·M·S PCT™ (PCT). (2016).
164. Silva, M. J. M. dos S. F. da. Bioquímica Clínica I - Lípidos (powerpoint). (2018).
165. Beckman Coulter, I. Cholesterol - Instruções de utilização AU. (2019).
166. Beckman Coulter, I. Colesterol - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2018).
167. Beckman Coulter, I. HDL-Cholesterol - Instruções de utilização AU. (2018).
168. Beckman Coulter, I. LDL Cholesterol - Instruções de utilização AU. (2018).
169. Beckman Coulter, I. Triglyceride - Instruções de utilização AU. (2018).
170. Beckman Coulter, I. Creatine Kinase (CK NAC) - Instruções de utilização AU. (2015).
171. Beckman Coulter, I. Creatine kinase-MB isoenzyme - Instruções de utilização AU. (2018).
172. Beckman Coulter, I. Lactate Dehydrogenase - Instruções de utilização AU. (2019).
173. Beckman Coulter, I. Access Myoglobin - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
174. Beckman Coulter, I. Troponina I de alta sensibilidade - Instruções de utilização ACCESS. (2017).
175. bioMérieux, S. VIDAS® NT-proBNP2 (PBN2). (2015).
176. Beckman Coulter, I. Calcium arsenazo - Instrução de utilização AU. (2019).
177. Cardoso, C. Bioquímica Clínica I - Metabolismo Fosfo-Cálcico (powerpoint). (2018).
178. Beckman Coulter, I. Cálcio - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2018).
179. Beckman Coulter, I. Inorganic Phosphorous - Instruções de utilização AU. (2019).
180. Beckman Coulter, I. Magnesium - Instruções de utilização AU. (2019).
181. Beckman Coulter, I. Reagente de amónia Infinity™ Para analisadores químicos AU® da Beckman Coulter.
182. Beckman Coulter, I. Iron - Instruções de utilização AU. (2018).
183. Beckman Coulter, I. Access Ferritin - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
184. Beckman Coulter, I. Transferrin - Instruções de utilização AU. (2019).
185. Beckman Coulter, I. Access Folate - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
186. Beckman Coulter, I. Cobalamina - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
187. Wynn Industrial Pharma, S. . Folheto informativo Carbamazepina Wynn. (2010).
188. Beckman Coulter, I. Carbamazepina - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).

189. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Carbamazepine Assay. (2019).
190. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Phenytoin Assay. (2019).
191. Beckman Coulter, I. Ácido Valpróico - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).
192. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Valproic Acid Assay. (2019).
193. Beckman Coulter, I. Reagente de lítio Infinity™ para analisadores químicos AU® da Beckman Coulter.
194. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Theophylline Assay. (2019).
195. Corporation, M. Ensaio CEDIA® Cyclosporine PLUS. (2015).
196. Beckman Coulter, I. Digoxin - Instruções de utilização AU. (2018).
197. Siemens Healthcare Diagnostics, I. Emit® tox™ Acetaminophen Assay. (2019).
198. Beckman Coulter, I. Acetaminofeno - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).
199. LABESFAL - Laboratórios Almiro, S. A. Folheto informativo Gentamicina. (2019).
200. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Gentamicin Plus Assay. (2019).
201. Beckman Coulter, I. Emit® 2000 Vancomycin Assay. (2019).
202. Beckman Coulter, I. Álcool - Folha de informações químicas SYNCHRON. (2017).
203. Beckman Coulter, I. Emit® II Plus Ethyl Alcohol Assay. (2017).
204. SureStep. Multi-Drug One Step Multi-line Screen Test Device (urina) - Folheto informativo.
205. Siemens Healthcare Diagnostics, I. Emit® tox™ Serum Benzodiazepine Assay. (2011).
206. *Provas de Tolerância à Glicose Oral (Protocolo)*. (2018).
207. Acidose e alcalose. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/conditions/acidose-e-alcalose>. (Acedido: 3.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
208. Cardoso, C. Equilíbrio Ácido-base Equilíbrio Hidro-electrolítico (powerpoint). (2018).
209. Beckman Coulter, I. *Immunochemistry System IMMAGE® 800 - Instruções de utilização*. (Beckman Coulter, Inc., 2004).
210. Maglumi® Snibe Co., Ltd. Disponível em: [https://www.snibe.com/zh\\_en/en\\_productArtical.aspx?id=29](https://www.snibe.com/zh_en/en_productArtical.aspx?id=29). (Acedido: 3.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
211. Software, P. 250 I. *Phadia 250 User Manual*. (Inc., Thermo Fisher Scientific, 2012).
212. Phadia™ 250 Instrument | Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/phadia/pt/en/our-solutions/phadia-laboratory-systems/phadia-250.html>. (Acedido: 3.<sup>a</sup> Janeiro 2021)

213. Beckman Coulter, I. Antígeno carcinoembrionário - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
214. Beckman Coulter, I. Antígeno cancerígeno 15-3 - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
215. Beckman Coulter, I. Antígeno cancerígeno 125 - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
216. Beckman Coulter, I. Antígeno cancerígeno 19-9 - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
217. Beckman Coulter, I. Alfa-fetoproteína - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
218. TRIMERO Diagnostics, S. Beta-2 Microglobulina - Instruções de utilização IMAGE® 800. (2019).
219. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ NSE (CLIA). (2018).
220. Beckman Coulter, I. Antígeno específico da próstata - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
221. Beckman Coulter, I. Antígeno livre específico da próstata - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
222. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ CA 72-4 (CLIA). (2019).
223. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ CYFRA 21-1 (CLIA). (2018).
224. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ SCCA (CLIA). (2018).
225. Beckman Coulter, I. Triiodotironina, livre - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
226. Beckman Coulter, I. Triiodotironina - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
227. Beckman Coulter, I. Tiroxina - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
228. Beckman Coulter, I. Tiroxina, livre - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
229. Beckman Coulter, I. Tirotrófina - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
230. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ TRAb (CLIA). (2019).
231. Beckman Coulter, I. Access Thyroglobulin - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
232. Beckman Coulter, I. Access Thyroglobulin antibody II - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
233. Beckman Coulter, I. Anticorpo antitireoperoxidase - Instruções de utilização ACCESS.

- (2019).
234. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Calcitonina (CLIA). (2019).
  235. Beckman Coulter, I. Hormona luteinizante - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  236. Beckman Coulter, I. Hormona foliculostimulante - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  237. Beckman Coulter, I. Estradiol - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  238. Beckman Coulter, I. Access Progesterone - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  239. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ 17-OH PROGESTERONA (CLIA). (2019).
  240. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Testosterona (CLIA). (2019).
  241. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Testosterona livre (CLIA). (2019).
  242. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ AMH (CLIA). (2019).
  243. Beckman Coulter, I. Access Prolactin - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  244. Beckman Coulter, I. Beta-hCG - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  245. Beckman Coulter, I. Access Ultrasensitive Insulin - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
  246. sh. MAGLUMI™ IAA (CLIA). (2018).
  247. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ GAD65 (CLIA). (2018).
  248. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Peptídeo C (CLIA). (2019).
  249. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Gastrina-17 (CLIA). (2019).
  250. Gastrinoma - Distúrbios gastrointestinais - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/disturbios-gastrointestinais/tumores-do-trato-gastrointestinal/gastrinoma>. (Acedido: 5.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
  251. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Aldosterona (CLIA). (2019).
  252. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ Renina Direta

- (CLIA). (2019).
253. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ ACTH (CLIA). (2019).
254. Beckman Coulter, I. Access Cortisol - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
255. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ DHEA-S (CLIA). (2019).
256. Beckman Coulter, I. Hormona paratiroide, intacta - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
257. Beckman Coulter, I. Fosfatase alcalina específica - óssea Instruções de utilização ACCESS. (2019).
258. Beckman Coulter, I. 25(OH) vitamina D - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
259. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ GH (CLIA ). (2019).
260. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ IGF-I (CLIA). (2019).
261. Beckman Coulter, I. Eritropoetina - Instruções de utilização ACCESS. (2019).
262. HYDRAGEL PROTEIN(E) | Sebia en-EN. Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-proteine>. (Acedido: 5.ª Janeiro 2021)
263. Eletroforese de proteínas e imunofixação. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/eletroforese-de-proteinas-e-imunofixacao>. (Acedido: 5.ª Janeiro 2021)
264. HYDRAGEL IF | Sebia en-EN. Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-if>. (Acedido: 5.ª Janeiro 2021)
265. Beckman Coulter, I. Cadeia leve de tipo kappa - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
266. Beckman Coulter, I. Cadeia leve de tipo lambda - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
267. Beckman Coulter, I. Imunoglobulina A - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
268. TRIMERO Diagnostics, S. Imunoglobinas IgD - Instruções de utilização IMAGE® 800. (2020).
269. Beckman Coulter, I. Imunoglobulina G - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
270. Beckman Coulter, I. Imunoglobulina M - Folha de informações químicas IMAGE.

- (2020).
271. Sanquin Reagents B.V. Kit para determinação quantitativa das subclasses de IgG humana no soro e plasma nos dispositivos Beckman IMMAGE® 800. (2018).
  272. Beckman Coulter, I. Imunoglobulina E Total - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  273. Beckman Coulter, I. C3 do Complemento - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  274. Beckman Coulter, I. C4 do Sistema Complemento - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  275. Complemento. Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/complemento>. (Acedido: 5.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
  276. TRIMERO Diagnostics, S. Complemento C1q - Instruções de utilização IMMAGE® 800. (2020).
  277. Angioedema hereditário e adquirido - Imunologia; distúrbios alérgicos - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/imunologia-distúrbios-alérgicos/distúrbios-alérgicos,-autoimunes-e-outras-reações-de-hipersensibilidade/angioedema-hereditário-e-adquirido](https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/imunologia-disturbios-alergicos/disturbios-alergicos,-autoimunes-e-outras-reações-de-hipersensibilidade/angioedema-hereditário-e-adquirido). (Acedido: 5.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
  278. TRIMERO Diagnostics, S. C1 (Esterase) Inibidor - Instruções de utilização IMMAGE® 800. (2020).
  279. Doença de Wilson - Distúrbios nutricionais - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-nutricionais/deficiência-e-toxicidade-minerais/doença-de-wilson](https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/disturbios-nutricionais/deficiência-e-toxicidade-minerais/doença-de-wilson). (Acedido: 5.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
  280. Beckman Coulter, I. Ceruloplasmina - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  281. Beckman Coulter, I. Alfa1-Antitripsina - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  282. Forti, N. & Diamenty, J. Apolipoproteínas B e A-I: Fatores de Risco Cardiovascular? *Assoc. Médica Bras.* **53**, 276–282 (2007).
  283. Beckman Coulter, I. Apolipoproteína A-1 - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).
  284. Beckman Coulter, I. Apolipoproteína B - Folha de informações químicas IMMAGE. (2020).

285. Maranhão, R. C., Carvalho, P. O., Strunz, C. C. & Pileggi, F. Lipoprotein (a): Structure, pathophysiology and clinical implications. *Arq. Bras. Cardiol.* **103**, 76–84 (2014).
286. Beckman Coulter, I. Lipoproteína (a) - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
287. Beckman Coulter, I. Factor reumatóide - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
288. Axis-Shield Diagnostics Ltd. Axis-Shield Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Assay. (2017).
289. Beckman Coulter, I. Haptoglobina - Folha de informações químicas IMAGE. (2020).
290. Significado/definição de serologia no Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. Disponível em: <https://dicionario.priberam.org/serologia>. (Acedido: 6.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
291. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Chlamydia pneumoniae ELISA (IgM) - Instruções do teste.
292. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Chlamydia pneumoniae ELISA (IgG) - Instruções do teste.
293. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Mycoplasma pneumoniae ELISA (IgM) - Instruções do teste.
294. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Mycoplasma pneumoniae ELISA (IgG) - Instruções do teste.
295. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Measles virus EISA (IgG) - Instruções de uso.
296. Beckman Coulter, I. Anti-Streptolysin O - Instruções de utilização AU. (2018).
297. bioMérieux, S. VIDAS® Lyme IgM (LYM) - VIDAS® Lyme IgG (LYG). (2019).
298. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ HSV-1/2 IgM (CLIA). (2019).
299. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ HSV-1/2 IgG (CLIA). (2019).
300. bioMérieux, S. VIDAS® Varicella-zoster IgG. (2016).
301. bioMérieux, S. VIDAS® EBV VCA IgM. (2016).
302. bioMérieux, S. VIDAS® EBV VCA/EA IgG. (2017).
303. bioMérieux, S. VIDAS® EBV EBNA IgG. (2018).
304. bioMérieux, S. VIDAS® CMV IgM. (2019).
305. bioMérieux, S. VIDAS® CMV IgG. (2016).
306. bioMérieux, S. VIDAS® RUB IgM. (2016).

307. bioMérieux, S. VIDAS® RUB IgG II. (2016).
308. bioMérieux, S. VIDAS® TOXO IgM. (2015).
309. bioMérieux, S. VIDAS® TOXO IgG II. (2015).
310. COVID-19 pandemic. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19-pandemic>. (Acedido: 6.ª Janeiro 2021)
311. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., L. MAGLUMI™ IgM de 2019-nCoV (CLIA). (2020).
312. Phadia AB. ImmunoCAP™ Specific IgE. (2019).
313. Phadia AB. ImmunoCAP™ Specific IgG. (2019).
314. Phadia AB. ImmunoCAP™ Tryptase. (2019).
315. ImmunoCAP™ Total IgE | Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/phadia/pt/en/our-solutions/immunocap-allergy-solutions/total-ige.html>. (Acedido: 6.ª Janeiro 2021)
316. Phadia AB. ImmunoCAP® Phadiatop®. (2015).
317. Innovacon, I. SureStep® One Step hCG Pregnancy Test.
318. *Processamento pós-analítico de amostras biológicas (Instrução de Trabalho)*. (2016).
319. *Prazo de Entrega dos Resultados das Análises (Instrução de Trabalho)*. (2017).
320. *Comunicação de Resultados Críticos (Instrução de Trabalho)*. (2018).
321. Âmbito do Sistema de Gestão da Qualidade. em *Manual da Qualidade* (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2015).
322. Organização, Responsabilidade e Autoridade. em *Manual da Qualidade* (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2016).
323. Patologia Clínica. em *Manual da Qualidade* (Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E., 2015).
324. *Controlo de Qualidade Interno (Instrução de Trabalho)*. (2016).
325. Importância da participação em Programas de Avaliação Externa da Qualidade - INSA. Disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/importancia-da-participacao-em-programas-de-avaliacao-externa-da-qualidade/>. (Acedido: 6.ª Janeiro 2021)
326. *Receção, Processamento e Avaliação de Amostras de Controlo de Qualidade Externo (Instrução de Trabalho)*. (2016).

## Parte II: Monografia

327. Cao, C. *et al.* Prehypertension during pregnancy and risk of small for gestational age: a systematic review and meta-analysis. *J. Matern. Neonatal Med.* **33**, 1447–1454 (2020).
328. Tskhay, V., Schindler, A., Shestakova, M., Klimova, O. & Narkevich, A. The role of progesterone supplementation (dydrogesterone) in the prevention of preeclampsia. *Gynecol. Endocrinol.* **36**, 698–701 (2020).
329. Organização Mundial da Saúde. *Recomendações da OMS para a Prevenção e tratamento da pré-eclâmpsia e da eclâmpsia.* (2014).
330. Klein, E. *et al.* Influence of the sFlt-1/PlGF ratio on clinical decision-making in women with suspected preeclampsia. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
331. Morikawa, M. *et al.* Severe proteinuria as a parameter of worse perinatal/neonatal outcomes in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* **19**, 119–126 (2020).
332. Adhikari, S. P. & Pariyar, J. Correlation between 12-hour and 24-hour urine total protein in pregnant women with preeclampsia. *J. Chitwan Med. Coll.* **9**, 57–60 (2019).
333. Fox, R., Kitt, J., Leeson, P., Aye, C. Y. L. & Lewandowski, A. J. Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *J. Clin. Med.* **8**, 1–21 (2019).
334. Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. & Karumanchi, S. A. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ. Res.* **124**, 1094–1112 (2019).
335. Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzinger, T. & Karumanchi, S. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 275–289 (2019).
336. Wisner, K. Gestational Hypertension and Preeclampsia. *MCN Am. J. Matern. Nurs.* **44**, 170 (2019).
337. Murtoniemi, K. *et al.* Longitudinal changes in plasma hemopexin and alpha-1-microglobulin concentrations in women with and without clinical risk factors for pre-eclampsia. *PLoS One* **14**, 1–17 (2019).
338. Berhe, A. K., Ilesanmi, A. O., Aimakhu, C. O. & Mulugeta, A. Effect of pregnancy induced hypertension on adverse perinatal outcomes in Tigray regional state, Ethiopia: A prospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* **20**, 1–11 (2019).
339. Hauspurg, A. *et al.* 425: Early pregnancy blood pressure trajectory and risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **220**, S288–S289 (2019).
340. Aviram, A. *et al.* 426: Defining the gestational age cut-off between early and late preeclampsia in singletons. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **220**, S289 (2019).

341. de Oliveira, L. G., Karumanchi, A. & Sass, N. Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* **32**, 609–16 (2010).
342. Mallampati, D., Grobman, W., Rouse, D. J. & Werner, E. F. Strategies for Prescribing Aspirin to Prevent Preeclampsia: A Cost-Effectiveness Analysis. *Obstet. Gynecol.* **134**, 537–544 (2019).
343. Perry, H. *et al.* Angiogenic Marker Prognostic Models in Pregnant Women with Hypertension. *Hypertension* **75**, 755–761 (2020).
344. Silva, J. F. & Serakides, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhes. Migr.* **10**, 88–110 (2016).
345. Lemoine, E. & Thadhani, R. Affordable Preeclampsia Therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 85–87 (2019).
346. NICE. Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. *NICE Guidel.* 1–55 (2020).
347. Preeclampsia and Pregnancy | ACOG. Disponível em: <https://www.acog.org/womens-health/infographics/preeclampsia-and-pregnancy>. (Acedido: 30.<sup>a</sup> Janeiro 2021)
348. Williams, B. *et al.* *Guidelines de 2018 da ESH/ESC para o Tratamento da Hipertensão Arterial.* (2020).
349. Putra, M., Balasooriya, M. M., Boscia, A. L., Dalkiran, E. & Sokol, R. J. The Impact of the New Hypertension Guidelines to Low-Dose Aspirin Prophylaxis Eligibility for the Prevention of Preeclampsia: A Cost-Benefit Analysis. *Am. J. Perinatol.* (2019). doi:10.1055/s-0039-1697588
350. Seeley, R. R., Stephens, T. D. & Tate, P. Desenvolvimento, Crescimento, Envelhecimento e Genética. em *Anatomia & Fisiologia* (ed. McGraw-Hill Companies, I.) 1073–1099 (2003).
351. Alpoim, P. N. *et al.* Pré-eclâmpsia: o que há de anômalo na placentação? *Femina* **41**, 99–105 (2013).
352. Montenegro, N. A. M. de M. *Anátomo-Fisiopatologia da Circulação Feto-Placentar: Implicações clínicas da fluxometria Doppler.* (Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 1993).
353. Steegers, E. A. P., Von Dadelszen, P., Duvekot, J. J. & Pijnenborg, R. Pre-eclampsia. *Lancet* **376**, 631–644 (2010).
354. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Espinoza, J., Vidaeff, A., Pettker, C. M. & Simhan, H. Clinical

- Management Guidelines for Obstetrician – Gynecologists: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *ACOG Pract. Bull.* **135**, e237–e260 (2020).
355. Eke, A. C. *et al.* 932: The relationship between maternal preeclampsia and neonatal blood biomarkers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **220**, S600–S601 (2019).
356. Neto, C. N., Souza, A. S. R. de & Amorim, M. M. R. Tratamento da pré-eclâmpsia baseado em evidências. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* **32**, 459–468 (2010).
357. aférese - Dicionário Priberam, Dicionário Online de Português Contemporâneo. Disponível em: <https://dicionario.priberam.org/aférese>. (Acedido: 16.<sup>a</sup> Dezembro 2020)
358. Organização Mundial da Saúde. Implicações e Ações. em *Recomendações da OMS para a Prevenção e Tratamento da Pré-Eclâmpsia e da Eclâmpsia* (2013).
359. Bacelo, T. M. & Lopes, M. S. Antecipar a Vida: Consulta Pré-concepcional - caracterização das puérperas do Hospital de Santo André, Leiria. *Rev. Port. Clínica Geral* **25**, 19–29 (2009).