

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**A INFEÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*
EM INDIVÍDUOS INFETADOS COM HIV**

Vera Estevão Correia

Relatório de estágio orientado pela Prof. Doutora Quirina dos Santos Costa e
coorientado pelo Dr. Carlos Cardoso

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Parte I

Prefácio

Enquadramento do trabalho.

No âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, foi realizado o Estágio Curricular no Laboratório Dr. Joaquim Chaves. O mesmo, resultou na elaboração do presente relatório, onde é realizada uma descrição das valências frequentadas, bem como de alguns dos equipamentos contactados e os analitos mais frequentemente solicitados na prática clínica.

O relatório denominado “A infeção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos infetados com HIV” está dividido em cinco partes: *Core Laboratorial*, que compreende as valências de Bioquímica e Hematologia, a Imunologia, a Microbiologia, o Radioimunoensaio e a Química Analítica.

Na parte I, encontra-se o prefácio, os resumos em Português e Inglês, a lista de abreviaturas e os índices.

Na parte II, encontra-se o relatório descritivo das valências frequentadas e anteriormente referidas, no Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

Na parte III, encontra-se a monografia desenvolvida no âmbito da Parasitologia Clínica, denominada “A infeção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos infetados com HIV”.

Este relatório está de acordo com o disposto no Artigo 37.º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da FFULisboa, nº 134/2016, DR, 2.ª série — N.º 26, de 8 de fevereiro de 2016.

Resumo

O presente relatório de estágio tem como objetivo a descrição de alguns parâmetros analíticos, bem como as metodologias e os equipamentos contactados durante o estágio curricular realizado no Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

As áreas analíticas contactadas integram a Bioquímica, a Hematologia, a Imunologia, a Microbiologia, o Radioimunoensaio e a Química Analítica. Foi ainda estabelecido contacto com a fase pré-analítica, integrando as colheitas de produtos biológicos e, posteriormente, a triagem das respetivas amostras.

Ao longo de todo o trabalho, irão também ser abordados os procedimentos de Controlo da Qualidade (Interna e Externa) existentes no laboratório.

Palavras-chave: Bioquímica, Hematologia, Imunologia, Microbiologia

Abstract

This report aims to describe some of the analytical parameters, as well as methodologies and equipment used during this academic internship in Laboratório Dr Joaquim Chaves.

The analytical areas integrate Biochemistry, Haematology, Immunology, Microbiology, Radioimmunoassay and Analytical Chemistry. Some methodologies resolving the pre-analytical phase, including biological collections and posterior sample sorting, were also developed and are described here.

Throughout this report, proceedings of Quality Control (Internal and External) present in the laboratory are also raised.

Key-words: Biochemistry, Haematology, Immunology, Microbiology

Lista de Abreviaturas

Parte II

Relatório de Estágio no Laboratório Dr. Joaquim Chaves

ACTH	Adrenocorticoestimulina
ADH	<i>Anti diuretic hormone</i> – Hormona Antidiurética
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AES	<i>Advanced Extert System™</i>
AgHBc	Antigénio do core do Vírus da hepatite B
AgHBe	Antigénio de replicação viral do Vírus da hepatite B
AgHBs	Antigénio de superfície do Vírus da hepatite B
ALT	Alanina Aminotransferase
ARN	Ácido Ribonucleico
AST	Aspartato Aminotransferase
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CAM	Gelose Campylosel
CAN	Gelose chromID™ Candida
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CK-MB	Creatinina Quinase fração MB
CLED	Gelose CLED
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMV	<i>Citomegalovirus</i>

CNA	Gelose Columbia ANC
COS	Gelose Columbia
CPS	Gelose chromID™ CPS
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRSS	<i>Consortium for Retrovirus Serology Standardization</i>
cTnI	Troponina I
cTnT	Troponina T
DGS	Direção-Geral da Saúde
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EA	Éster de Acridina
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i>
FA	Fosfatase Alcalina
FTA-abs	<i>Fluorescent Treponemal Antibody adsorption</i>
GAR	Gelose Gardnerella
GFR	Taxa De Filtração Glomerular, do inglês, <i>Glomerular Filtration Rate</i> -
GN	Gram Negativos
GP	Gram Positivos
HAEM	Gelose Chocolate <i>Haemophilus</i>
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEKT	Gelose Hektoen
HGM	Hemoglobina Globular Média

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPFH	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
Ht	Hematócrito
ID	Identificação Microbiológica
IF	Imunofluorescência
Ig	Imunoglobulina
IRA	Índice Relativo da Avidéz
ITU	Infeções do Trato Urinário
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LJ-T	Meio de Lowenstein-Jensen
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MCK	Gelose MacConkey
MSA	Gelose Chapman
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótico oxidado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reduzido
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PTH	Paratormona
PTOG	Prova de Tolerância Oral à Glucose
PVX	Gelose Chocolate <i>PolyViteX</i>
RBC	Contagem de eritrócitos
RDW	Índice de Dispersão Eritrocitário
RIA	Radioimunoensaio
SCS	Gelose Schaedler

SGC	Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol
STRB	Gelose <i>chromID™ Strepto B</i>
TA	Temperatura Ambiente
TP	Tempo de Protrombina
TPHA	<i>Treponema pallidum haemagglutination assay</i>
TSA	Teste de Sensibilidade a Antibióticos
TSH	Hormona estimuladora da tiroide
TT	Tempo de Trombina
TPPa	Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
UFC	Unidades Formadoras de colónias
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VGM	Volume Globular Médio
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VS	Velocidade de Sedimentação
WHO	<i>World Health Organization</i>
YER	Gelose Yersinia

Parte III

A infecção por Toxoplasma gondii em indivíduos infectados com HIV

Ac/s	Anticorpo/s
Ag/s	Antigénio/s
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
ET	Encefalopatia por Toxoplasma
GP	Glicoproteína
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IF	Imunofluorescência
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LCR	Líquido Cefalo-raquidiano
NAT	Nucleid Acid Test
PCR	Polymerase Chain Reaction
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Ribonucleíco
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
VIS	Vírus da Imunodeficiência em Símios
TAC	Tomografia Axial Computadorizada
TR	Transcriptase Reversa

Índice Geral

<i>Parte I</i>	vii
Prefácio	v
Resumo.....	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Índice Geral.....	xiii
Índice de Figuras	xvii
<i>Parte II</i>	xxiii
Relatório de estágio realizado no Laboratório Dr. Joaquim Chaves.....	3
1. Introdução.....	3
2. Fase Pré-Analítica	4
3. <i>Core Laboratorial</i>	5
3.1 Bioquímica	5
3.1.1 ADVIA® 2400	5
3.1.2 Analisador de Urina CLINITEK Atlas® (SIEMENS).....	6
3.1.3 ADVIA Centaur®	6
3.1.4 IMMULITE® 2000	7
3.1.5 COBAS® e411	8
3.1.6 CAPILLARYS® 2	8
3.1.7 Metabolismo Proteico.....	9
3.1.8 Metabolismo Lipídico	10
3.1.9 Metabolismo dos Hidratos de Carbono	11
3.1.10 Função Hepática	13

3.1.11	Função Renal	15
3.1.12	Função Pancreática	18
3.1.13	Função Tiroideia	19
3.1.14	Metabolismo Ósseo.....	21
3.1.15	Marcadores Cardíacos.....	22
3.1.16	Marcadores Tumoriais	23
3.2	Hematologia	25
3.2.1	Hemograma.....	25
3.2.2	Equipamento ADVIA® 2120	26
3.2.3	Equipamento ADVIA® 2120 AutoSlide®	29
3.2.4	Analizador de Velocidade de Sedimentação VES - MATIC cube 200	30
3.2.4	Analizador Imunohematológico AutoVue® Innova	31
3.2.5	VARIANT™ II Hemoglobin Testing System	32
3.2.6	Analizador BCS® XP	33
4.	Imunologia.....	34
4.1	Métodos Analíticos.....	35
4.2	Serologia Infeciosa	38
4.3	Rastreio na Gravidez	41
4.4	Autoimunidade	44
5.	Microbiologia	45
5.1	Meios de Cultura	45
5.2	Colorações e Testes de Identificação.....	51
5.3	Testes de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos (TSA)	54
5.4	Produtos Biológicos.....	55
6.	Radioimunoensaio (RIA).....	60
6.1	Contador Gama Wallac – Wizzard 1470	61
6.2	ImmunoCAP 250	61

7. Química Analítica.....	62
7.1 Cromatografia Líquida de Alta Definição (HPLC).....	62
7.2 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-EM)	63
7.3 Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA)	63
7.4 Espectroscopia de Infravermelho (IV)	64
8. Fase Pós-Analítica.....	64
9. Higiene e Segurança no Trabalho	65
10. Controlo da Qualidade.....	69
10.1 Controlo Interno da Qualidade (CIQ).....	69
10.2 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	70
11. Conclusão e Perspetivas futuras	72
12. Referências bibliográficas	73
<i>Parte III</i>	75
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana	105
1.1.1 Epidemiologia.....	105
1.1.2 Estrutura	107
1.1.3 Ciclo de Replicação/Transmissão.....	109
1.1.4 Manifestações clínicas.....	112
1.1.5 Diagnóstico Laboratorial.....	114
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	117
1.2.1 Epidemiologia.....	119
1.2.2 Ciclo de vida/transmissão.....	120
1.2.3 Manifestações Clínicas.....	122
1.2.4 Diagnóstico Laboratorial.....	124
1.3 Toxoplasmose em indivíduos infetados com HIV.....	127
1.3.1 Epidemiologia e patogénese da co-infecção toxoplasmose/ HIV	127
1.3.2 Manifestações clínicas da co-infecção toxoplasmose/ HIV	128

1.3.3	Diagnóstico da co-infecção toxoplasmose/ HIV	129
1.3.4	Tratamento da co-infecção toxoplasmose/ HIV	130
1.3.5	Prevenção da co-infecção toxoplasmose/ HIV	133
3.	Conclusão e perspectivas futuras	138
4.	Referências Bibliográficas.....	140

Índice de Figuras

Parte II

Relatório de Estágio no Laboratório Dr. Joaquim Chaves

Figura 1) Representação da distribuição celular (citograma Perox).....	28
Figura 2) Citograma BASO	28
Figura 3) Esfregaço de Sangue Periférico.....	30
Figura 4) Contentores para resíduos do grupo I e II	67
Figura 5) Contentor para resíduos do Grupo III.....	68
Figura 6) Contentor para resíduos do grupo IV	68
Figura 7) Recipientes com resíduos líquidos perigosos/biológicos	69

Parte III

A infecção por Toxoplasma gondii em indivíduos infectados com HIV

Figura 8) Pessoas que vivem com HIV por região, 2018.....	106
Figura 9) Infecção por HIV em 2017.....	107
Figura 10) Visão esquemática da partícula de HIV por micrografia eletrónica e bandas de imunoblot	108
Figura 11) Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV)	111
Figura 12) Fases da infecção pelo HIV	113
Figura 13) Algoritmo clínico do diagnóstico laboratorial da infecção por HIV.....	115
Figura 14) Oocisto não esporulado e oocisto esporulado	118
Figura 15) Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	119
Figura 16) Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	121
Figura 17) Diagrama esquemático da técnica de ELISA	125

Parte II

Relatório de estágio realizado no Laboratório Dr. Joaquim Chaves

1. Introdução

O presente relatório de estágio resulta do estágio curricular como parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves (Laboratório Central), com sede em Miraflores. Teve a duração de 1080 horas e foi realizado sob a orientação do Dr. Carlos Cardoso, Especialista em Análises Clínicas e Diretor Técnico da instituição, integrante do Grupo Joaquim Chaves Saúde. Toda a atividade é exercida por uma equipa diversificada, composta por Médicos Patologista Clínicos, Farmacêuticos Especialistas em Análises Clínicas, Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e Técnicos Superiores licenciados em Farmácia e em Biologia.

O laboratório realiza análises no âmbito da Bioquímica Clínica, Endocrinologia, Hematologia, Imunologia, Imunohematologia, Alergologia, Microbiologia, Biologia Molecular e Genética.

Durante toda a duração do estágio foi proporcionada uma integração no meio profissional, aprofundando os conhecimentos técnico-científicos relacionados com os processos envolvidos na rotina laboratorial contactando com diversos equipamentos e metodologias.

Ao longo deste relatório de estágio vão ser descritos os principais parâmetros analíticos determinados em cada valência, bem como os equipamentos utilizados durante o período de estágio e ainda a sua importância e significado clínico.

2. Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica é definida como todo o procedimento desde a preparação do utente até à realização do exame laboratorial. Inclui a preparação do utente, a colheita da amostra (técnica e material utilizado e identificação das amostras biológicas), a triagem, o acondicionamento, a conservação e o transporte para o laboratório, a sua receção, verificação e preparação ou processamento para a fase analítica.

Esta fase é de extrema importância para a fase que se segue, sendo este o processo de análise laboratorial, uma vez que a má qualidade das amostras poderá comprometer todos os procedimentos seguintes. A maioria dos erros laboratoriais estão associados a esta fase, no entanto, podem ser minimizados através do cumprimento de requisitos referentes à maioria dos procedimentos.

Na colheita da amostra biológica devem-se considerar as variáveis controláveis que poderão influenciar os resultados, tais como o exercício físico, a variação circadiana, influência da dieta e fármacos, postura e imobilização. Quanto aos fatores não controláveis (idade, género, medicação e doenças existentes) deve-se ter o seu conhecimento, sendo realizado um inquérito na altura da colheita, de modo a que os resultados estejam adaptados à situação de cada utente. Os aspetos mais relevantes durante a colheita de sangue são: a confirmação de dados e obtenção de informações relevantes acerca do utente, a correta identificação da amostra, obtenção de amostra íntegra (sem hemólise) e com volume suficiente e a homogeneização adequada.

Para a colheita de sangue existem vários tipos de tubos, entre eles os sem anticoagulante e com anticoagulante. Nos primeiros, obtém-se o soro que é utilizado maioritariamente em análises de bioquímica. Nos segundos, destaca-se o tubo de EDTA, no qual se obtém o sangue total, utilizado frequentemente em técnicas de hematologia. O tubo com citrato trissódico, do qual se obtém o plasma, é frequentemente utilizado para provas da coagulação. Por último, o tubo com heparina, do qual se obtém sangue total, é utilizado para determinação de metais.

3. Core Laboratorial

É uma área laboratorial maioritariamente automatizada onde, diariamente, são processadas mais de 1000 de amostras. É a área em que se verifica a maior integração de metodologias nos sistemas analíticos instalados (cerca de 260 parâmetros analíticos em diferentes amostras biológicas, nomeadamente no soro, plasma, sangue total, urina e líquido). A fim de aumentar a capacidade e a velocidade de processamento de amostras, o *Core Laboratorial* possui um sistema automatizado de processamento de amostras, ao qual estão acoplados os equipamentos, IMMULITE® 2000, ADVIA® 2400, ADVIA® 2120 e ADVIA® Centaur; e, detém adicionalmente um sistema de transporte integrado que gere, automaticamente, a distribuição das amostras pelos vários equipamentos. Os resultados das determinações analíticas serão conectados ao software eDeiaLab, permitindo a validação dos mesmos e, também, a visualização do histórico dos resultados do paciente.

3.1 Bioquímica

Está integrada no *Core Laboratorial* e engloba a determinação de parâmetros pertencentes a diversas valências, como a Bioquímica Clínica e a Endocrinologia. Seguidamente, serão descritos os equipamentos utilizados, bem como as metodologias empregues e os parâmetros considerados mais representativos, quer pelo número de pedidos, quer pelo seu valor semiológico.

3.1.1 ADVIA® 2400

O equipamento ADVIA® 2400 Chemistry System (SIEMENS) é um sistema analítico de ensaio *in vitro*, automatizado e utilizado na determinação de parâmetros bioquímicos a partir de diferentes amostras biológicas, como por exemplo: soro, plasma, derrames de serosas, líquido cefalorraquidiano e urina. As metodologias utilizadas pelo

equipamento são a espectrofotometria e potenciometria indireta (analisador de eletrólitos). Neste sistema, são realizados a maioria dos parâmetros referentes à valência de Bioquímica Clínica.

O processo espectrofotométrico inicia-se com a emissão de luz (lâmpada de halogénio) a uma determinada intensidade, a luz trespassa a solução (contida na cuvete), sendo absorvida a um determinado comprimento de onda. Posteriormente, a quantidade de luz absorvida é medida pelo espectrofotómetro e os valores da absorvância convertidos em concentração. O espectrofotómetro faz a leitura da absorvância de acordo com o comprimento de onda exigido para o ensaio. A potenciometria indireta, utilizada para a determinação da concentração dos iões sódio, potássio e cloretos, baseia-se na diferença de potencial que se gera entre o eléctrodo de referência e o seletivo, para cada um dos iões, em função da sua concentração na amostra.

3.1.2 Analisador de Urina CLINITEK Atlas[®] (SIEMENS)

O equipamento Analisador de urina Clinitek Atlas[®] (SIEMENS) é um sistema analítico automatizado, utilizado no âmbito do exame sumário de urina, também designado por Urina Tipo II, para determinar a densidade (por refratometria), bem com o pH, proteínas, esterases leucocitárias, nitritos, glicose, corpos cetónicos, hemoglobina, pigmentos biliares e urobilinogénio por espectrofotometria de refletância, através da cor e da intensidade da luz refletida das áreas de regente específicas nas tiras reativas. Uma vez que a luz refletida não possui uma correlação linear com a concentração de um determinado analito, é necessário aplicar um algoritmo de forma a obtermos valores lineares e converter o resultado em unidades com significado clínico. A análise da urina é um exame que permite despistar a presença de patologias extra-renais e do aparelho urinário, bem como monitorizar a evolução clínica da patologia e resposta ao tratamento. A amostra ideal é a primeira urina da manhã (8h a 12h de concentração).

3.1.3 ADVIA Centaur[®]

O equipamento ADVIA Centaur® é um equipamento de ensaio multiparamétrico que efetua imunoensaios utilizando a tecnologia de quimioluminescência direta. Desta forma, a luz emitida pelo ensaio corresponde à quantidade de analito presente numa amostra. A quimioluminescência corresponde à medição direta da luz/energia (sem amplificador ou procedimentos complementares), que é emitida por um eletrão quando este regressa de um estado excitado, ou de um nível de energia superior, para um nível de energia inferior. Os imunoensaios consistem na ligação de um anticorpo a um antigénio específico. É ligado o éster de acridina (EA), como composto orgânico, covalentemente, ao anticorpo ou ao antigénio, dependendo do que se pretende medir. O equipamento utiliza, como fase sólida, partículas magnéticas (cristais de óxido de ferro) revestidas por anticorpos ou antigénios e, quando a cuvete é exposta a um campo magnético, as partículas ligadas ao analito são atraídas e posicionadas numa determinada orientação na cuvete. O equipamento realiza imunoensaios em “sanduíche”, competitivos e de captura de anticorpos).

O equipamento determina parâmetros analíticos como Antigénio Específico da Próstata (PSA), Tiroxina total e livre (T4T e T4L), Triiodotironina total e livre (T3T e T3L), Vitamina B12, Ferritina e Testosterona Total, entre outros.

3.1.4 IMMULITE® 2000

O equipamento IMMULITE® 2000 é um sistema de ensaio multiparamétrico que executa imunoensaios quimioluminescentes em amostras de soro, plasma e urina. O princípio metodológico, usado por este equipamento, é semelhante ao do equipamento Advia Centaur®. Este equipamento realiza imunoensaios competitivos e do tipo “sanduíche”. No ensaio tipo “sanduíche” a quantidade de luz emitida é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, enquanto no ensaio competitivo a situação é inversa.

O equipamento determina parâmetros analíticos tais como a Calcitonina, Eritropoietina, Adrenocorticoestimulina (ACTH), entre outros.

3.1.5 COBAS[®] e411

O equipamento COBAS e411 de ensaio multiparamétrico executa imunoensaios em soro ou plasma, utilizando a metodologia de eletroquimioluminescência. Neste método são formadas espécies altamente reativas, através de uma reação eletroquímica, a partir de precursores estáveis existentes à superfície de um eletrodo. Este equipamento realiza imunoensaios utilizando três princípios diferentes, nomeadamente o “sanduíche” (para a análise de moléculas de alto peso molecular), o competitivo (na análise de analitos de baixo peso molecular) e o princípio de ligação em ponte (para a análise de anticorpos IgA, IgG e IgM, presentes na amostra). Os imunoensaios em “sanduíche” e competitivos, detêm princípios semelhantes aos descritos anteriormente. No final, a quantidade de luz produzida é diretamente proporcional à concentração do analito.

O equipamento determina parâmetros analíticos como Osteocalcina, Troponina-T, entre outros.

3.1.6 CAPILLARYS[®] 2

O equipamento CAPILLARYS[®] 2 é um equipamento automático de eletroforese capilar de zona (ECZ) aplicado à separação de proteínas, resultando em eletroforetogramas. Na ECZ, a separação das moléculas ocorre no interior de capilares de pequenas dimensões, preenchidos com uma solução tampão alcalina (eletrólito condutor).

Neste equipamento são realizadas as Eletroforeses de Hemoglobinas, Eletroforeses de Proteínas Séricas e ainda Eletroforeses de Proteínas Urinárias.

Relativamente aos analitos abordados, serão divididos por áreas, para que seja mais fácil a sua descrição: Metabolismo Proteico, Metabolismo Lipídico, Metabolismo dos Hidratos de Carbono, Função Hepática, Função Renal, Função Pancreática, Função Tiroideia, Metabolismo Ósseo e Marcadores Tumorais.

3.1.7 Metabolismo Proteico

Relativamente ao metabolismo proteico, as proteínas plasmáticas estão distribuídas entre o espaço intravascular e o extravascular, e são sintetizadas no fígado (exceto imunoglobulinas e algumas hormonas proteicas). A sua concentração depende sobretudo da síntese, distribuição extracelular e da depuração plasmática renal (*clearance*).

A albumina é a proteína em maior concentração sérica e constitui a maior parte das proteínas totais urinárias, em parte devido ao seu tamanho. Isto porque, durante a filtração glomerular só as proteínas de baixo peso molecular (menores que a albumina) passam livremente, sendo a maioria reabsorvidas, posteriormente, pelo o túbulo proximal. Enquanto as proteínas de elevado peso molecular não são filtradas. Desta forma, as proteínas totais plasmáticas (proteinémia) são sobretudo afetadas pela função hepática, função renal, alterações fisiológicas (alterações de volémia) e por alterações nutricionais e metabólicas.

A eletroforese de proteínas origina 6 diferentes frações proteicas numa amostra de soro fresco, caso contrário apenas são obtidas 5 frações proteicas. Um dos fatores que interfere, significativamente, com a análise das proteínas plasmáticas é a resposta de fase aguda (conjunto de alterações que ocorrem em reações não específicas, como a infeção, lesão tecidual e processos inflamatórios).

A realização da eletroforese implica a determinação previa das proteínas totais de forma a obtermos o valor absoluto da sua concentração. Para esta análise é recomendável a utilização de uma amostra de soro, pois não contém fibrinogénio (ao contrário do plasma). O fibrinogénio migra na fração β_2 e a sua presença pode levar ao aumento desta fração através da sobreposição e, desta forma, pode mascarar o aumento de uma banda monoclonal ou da respetiva fração, interferindo na análise do resultado. Já análise de soros com algum tempo não é recomendável, devido à ocorrência de deterioração do complemento C3, o que pode levar à redução ou distorção da fração β_2 .

3.1.8 Metabolismo Lipídico

Os lípidos possuem uma grande diversidade de estruturas e desempenham funções importantes, desde consumíveis metabólicos a precursores de hormonas, participando na sinalização celular e na formação das membranas celulares. Estes podem ser classificados com lípidos simples, conjugados ou derivados. Devido às suas características, estes associam-se com proteínas (apoproteínas) para formar macromoléculas complexas. As lipoproteínas contêm diferentes proporções de lípidos e proteínas, originando diferentes propriedades químicas e físicas. Na avaliação e monitorização do perfil lipídico procede-se à determinação do colesterol total, conjuntamente, com triglicéridos, LDL (*Low Density Lipoprotein*) e HDL (*High Density Lipoproteins*).

O colesterol é um álcool esteroide com propriedades anfipáticas, presente nas membranas celulares de todos os animais. É uma molécula inicial de várias vias metabólicas, sendo necessário na formação de ácidos biliares, na síntese de hormonas esteroides e vitamina D. O colesterol total resulta da junção do colesterol esterificado e livre. Na forma esterificada (forma de éster) o grupo hidroxilo está conjugado a um ácido gordo, através de uma ligação éster. O colesterol livre é hidrofóbico, encontrando-se no centro das lipoproteínas, juntamente com os triglicéridos. Um colesterol total superior a 200 mg/dL, constitui um risco elevado para o desenvolvimento de doenças coronárias. A sua determinação é útil no diagnóstico e tratamento de distúrbios, que implicam o excesso de colesterol, e, também, de perturbações do metabolismo das lipoproteínas e lípidos.

Os triglicéridos são lípidos simples (ésteres de ácidos gordos com glicerol) e neutros. Apresentam várias combinações de ácidos gordos em cadeia, variando no tipo de ácidos gordos (mono-, di- ou triglicéridos) ligados ao glicerol, bem como na extensão e grau de saturação. A sua determinação é útil na monitorização de doentes com suspeita de aterosclerose e, também, na identificação de hipertrigliceridemia. Tal, ocorre na existência de anomalias genéticas ou devido a causas secundárias, como alterações hormonais associadas ao pâncreas, glândulas adrenais, a doença hepática e síndrome nefrótica ou devido a diabetes Mellitus não controlada.

As LDL transportam, aproximadamente, 70% do colesterol total plasmático e contêm uma pequena percentagem de triglicéridos. Só possuem a apoproteína B-100 (sintetizada no fígado), a qual é fundamental no reconhecimento das LDL pelos recetores celulares. Formam-se devido à lipólise das VLDL (Very Low Density Lipoproteins). Por possuírem uma elevada concentração de colesterol e terem a capacidade de penetrar o vaso sanguíneo, estão envolvidas no processo de desenvolvimento de ateromas e, conseqüentemente, no aparecimento de doença aterosclerótica. Logo, a sua determinação é importante na avaliação da doença em questão.

As HDL são as menores e mais densas das lipoproteínas. Contêm cerca de 20-30% do colesterol total plasmático. Contêm duas moléculas de apoAI que formam um anel à volta da camada central de fosfolípidos (lípidio maioritário) e colesterol. São sintetizadas pelo fígado e intestino e estão envolvidas no transporte reverso de colesterol, transportando o colesterol em excesso, presente nos tecidos extra- hepáticos, de volta ao fígado. O facto de fazerem o transporte reverso e, também, de possuírem uma baixa percentagem em colesterol em parte explica a ação protetora das HDL nas doenças coronárias, sendo a sua determinação importante na avaliação do risco da respetiva doença.

3.1.9 Metabolismo dos Hidratos de Carbono

No metabolismo dos hidratos de carbono, a glicose, fonte primária de energia no organismo, é utilizada como única fonte de energia nos eritrócitos, retina e cérebro. As patologias relacionadas podem ser divididas em hipoglicemia e hiperglicemia. As hipoglicemias devem-se sobretudo à excessiva produção de insulina ou do aumento da utilização da glicose. O exercício físico, jejum, excesso de insulina exógena ou endógena e tumor das células β (insulinoma), são algumas das causas de hipoglicémia. A hiperglicemia ocorre em patologias, como a diabetes Mellitus (tipo 1 e 2) e diabetes gestacional, que resultam da existência de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Logo, a determinação da glicose é fundamental no diagnóstico, tratamento e monitorização das referidas doenças metabólicas. De acordo com a DGS (002/2011), o diagnóstico da diabetes baseia-se nos seguintes critérios:

- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl
- Sintomas clássicos (poliúria, perda rápida de peso, polidipsia e polifagia) + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl
- Glicemia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, na Prova de Tolerância Oral à Glicose (PTOG) com 75g de glicose;
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$

Numa pessoa assintomática, o diagnóstico da diabetes não deve ser feito só com base num único valor anormal de HbA1c ou de glicemia em jejum, devendo-se confirmar os valores 1-2 semanas depois, numa segunda determinação. No caso de ambos os valores estarem fora dos intervalos de referência (HbA1c e glicemia), o diagnóstico é confirmado. A identificação da existência de um elevado risco de vir a desenvolver diabetes, assenta na obtenção de valores anormais da glicemia em jejum (glicemia de jejum ≥ 110 e < 126 mg/dl) e nos valores obtidos numa PTOG (glicemia às 2 horas ≥ 140 e < 200 mg/dl).

A PTOG consiste na ingestão de uma solução, contendo 75g de glicose (depende da idade e do peso), com colheita aos 0 e 120 minutos e na grávida aos 0, 60 e 120 minutos. No diagnóstico da diabetes gestacional (primeira consulta de gravidez), valores de glicose plasmática < 92 mg/dl, é aconselhável a realização de uma PTOG às 24-28 semanas de gestação. Caso o valor obtido em jejum seja ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl, faz o diagnóstico de diabetes gestacional (não é necessária uma PTOG às 24-28 semanas de gravidez) (DGS 002/2011). Segundo a DGS (002/2011), os valores de referência para diagnóstico de diabetes gestacional (PTOG) são:

- às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dl
- à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dl
- às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dl

A HbA1c forma-se através da exposição da HbA1 a elevadas concentrações sanguíneas de glicose, onde ocorre a ligação irreversível, não enzimática, entre a glicose e o N-terminal da cadeia β da HbA1. A determinação da HbA1c é utilizada como indicador do controlo dos níveis de glicemia no sangue, especialmente, em diabéticos, pois indica a média dos níveis de glicose nos últimos 2 a 3 meses.

A formação da insulina começa com a síntese da pré-insulina, a qual é clivada no retículo endoplasmático das células β (ilhéus de Langerhans do pâncreas), formando a pró-insulina (armazenada nas células β). No final, a proteólise da pró-insulina forma a

insulina e o péptido C e, ambos, numa situação normal, são libertados para a corrente sanguínea em concentrações iguais, em resposta aos níveis de glicose no sangue. Em algumas situações de diabetes tipo 2, ocorre a libertação de pró-insulina (sem atividade) para a corrente sanguínea. A insulina estimula a glicogenólise (hidrólise do glicogénio em glicose e intermediários), reduz os níveis de glicose no sangue e leva à produção de triglicéridos (adipócitos). A sua determinação é utilizada no estudo da patofisiologia da diabetes, mas, também, é útil na apreciação da hipoglicemia em jejum, na determinação da resistência à insulina, na população em geral, e na avaliação de anomalias da função secretória das células β .

3.1.10 Função Hepática

Na função hepática, uma das principais funções do fígado é o processamento e excreção via biliar ou urinária das proteínas exógenas e endógenas. A bilirrubina é formada pela conversão do heme libertado, após a fagocitose dos eritrócitos e do catabolismo de proteínas que contêm o grupo heme (citocromos, peroxidases e mioglobina).

A bilirrubina plasmática liga-se à albumina (bilirrubina não conjugada), sendo transportada para o fígado. No fígado a bilirrubina liberta-se da albumina, sendo depois transportada por ligandinas até ao retículo endoplasmático do hepatócito, onde ocorre a sua conjugação. Na conjugação há transferência do ácido glucurônico, pela uridildifosfato glucuronil transferase, para as cadeias laterais da bilirrubina, formando a bilirrubina diglucuronídeo (bilirrubina conjugada). Posteriormente, é excretada pelo fígado para a bÍlis, onde constitui o principal pigmento. No intestino origina o urobilinogénio, onde parte é reabsorvida para a corrente sanguínea e excretada via renal. A retenção sérica da bilirrubina (hiperbilirrubinémias) ocorre em várias doenças hepáticas e pode ter origem a nível pré-hepático (exemplo: anemias hemolíticas e icterícia fisiológica do recém-nascido), hepático (como a doença ou defeito intrínseco) ou pós-hepático (exemplo: doença obstrutiva biliar). Na icterícia pré-hepática ocorre o aumento da forma não conjugada, enquanto na pós-hepática aumenta a forma conjugada e na hepática podemos ter a elevação da forma conjugada ou não conjugada, dependendo da causa. A

determinação da bilirrubina direta pode ser feita a partir da subtração da bilirrubina conjugada à bilirrubina total.

A determinação da bilirrubina total é semelhante à da bilirrubina direta, a diferença é a presença no meio de tensioativo.

As transaminases estão envolvidas na síntese e degradação dos aminoácidos e transferem o grupo amina (α - aminoácido) para um cetoácido. A aspartato aminotransferase (AST) está presente em diversos tecidos e encontra-se em maiores concentrações, no tecido cardíaco, hepático, muscular esquelético e renal. Existem duas isoenzimas (citosólica e mitocondrial). Na presença de dano celular moderado a citosólica é a mais elevada e na presença de dano celular mais grave ambas aparecem elevadas. Devido à sua ampla distribuição e concentração intracelular, qualquer lesão celular pode levar ao seu aumento sérico. Os níveis séricos de AST aumentam em patologias hepatocelulares, como a hepatite (aumenta cerca de 100 vezes) e cirrose (4-8 vezes).

A alanina aminotransferase (ALT) está distribuída por vários tecidos, mas devido à sua maior concentração a nível hepático em comparação com os restantes tecidos, é considerada como a mais específica das transferases na avaliação hepática. A concentração sérica de ALT é maior em patologias hepatocelulares, comparativamente, com patologias obstrutivas intra ou extra-hepáticas. A sua elevação é maior e mantém-se elevada durante mais tempo (maior tempo médio de vida) do que a AST, especialmente, em situações de inflamação hepática aguda.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima não específica que catalisa em pH alcalino, a hidrólise de vários fosfomonoésteres, produzindo fosfato inorgânico (ionizado). Está presente na maioria dos tecidos do organismo e, no fígado, está localizada nos canalículos biliares. A enzima também participa na formação da matriz óssea. Devido à localização, a quantificação da FA é útil em desordens ósseas (que envolve os osteoblastos) e, também, na avaliação de desordens hépato-biliares. Nas desordens hépato-biliares, a elevação sérica da FA é maior em comparação com o aumento que ocorre em desordens hepatocelulares. Na obstrução biliar (desordem hépato-biliar) a concentração de FA eleva-se 3-10 vezes, devido ao aumento da síntese (induzida pela colestase), enquanto nas desordens hepatocelulares (exemplo: cirrose e hepatite) a FA atinge concentrações até 3 vezes superiores ao limite do intervalo de referência. A

determinação da FA, em conjunto com outros testes da função hepática, apresenta maior significado clínico, uma vez que a enzima se eleva em várias doenças hepáticas.

A gama glutamil transferase (γ GT) é responsável pela transferência de resíduos γ -glutamil para pequenos péptidos e encontra-se presente sobretudo no rim, próstata, pâncreas, fígado e cérebro. A sua quantificação é importante na avaliação de patologias hepáticas e biliares. De modo geral, está elevada na doença hepática (exemplo: hepatites), não sendo específica da respetiva doença. Os seus níveis séricos são muito elevados na obstrução intra e extra-hepática, principalmente, devido à sua localização (células epiteliais que revestem os ductos biliares). Também está elevada no alcoolismo crónico e com a ingestão de fármacos (fenitoína e fenobarbital). Portanto, a sua determinação é útil na avaliação e monitorização da terapêutica de doenças hepatobiliares e na avaliação do alcoolismo.

3.1.11 Função Renal

Na função renal, os rins, cuja unidade funcional é o néfron, desempenham funções reguladoras da água, do equilíbrio eletrolítico e ácido-base, excretam produtos de degradação do metabolismo, como ureia, creatina e ácido úrico, formando a urina e, também, participam na regulação endócrina.

A creatinina forma-se na fase inicial de filtração do plasma no glomérulo. É produzida a partir da creatina e da fosfocreatina presente no músculo, estando a sua concentração relacionada com a massa muscular, assim como com a função renal e o seu turnover (varia com o consumo de proteínas na dieta). A determinação da sua concentração é útil na avaliação de insuficiência renal e da gravidade da lesão e na monitorização da progressão de doença renal. Apesar de ser um parâmetro imperfeito para estimar a taxa de filtração glomerular, é amplamente utilizada na avaliação da função renal. Os níveis de creatinina plasmática estão inversamente relacionados com o grau de filtração glomerular (GFR - taxa de filtração glomerular). Níveis plasmáticos elevados de creatinina significam que a GFR está diminuída, indicando alteração da função renal, nomeadamente no que se refere à função glomerular. É um marcador insensível, pois só se altera quando mais de 50% da função renal está danificada.

A *clearance* da creatinina é medida através da razão entre a débito urinário por minuto da creatinina (urina de 24 horas) e a sua concentração no plasma e, assim, é determinado o volume de filtrado glomerular formado por minuto (ml/min.). A equação desenvolvida por Cockcroft e Gault (utiliza a concentração da creatinina plasmática na determinação da *clearance*) inclui variáveis como a idade, sexo, peso corporal e origem étnica e, deste modo, a relação inversa entre a creatinina plasmática e a GFR, é melhorada. Além disso, elimina erros associados à obtenção da urina de 24 horas.

A microalbuminúria é um marcador biológico de nefropatia (mais sensível e específica do que as proteínas totais), cuja concentração é diretamente proporcional à gravidade da lesão renal. A microalbuminúria é definida pela excreção urinária de 30 a 300 mg/g de creatinina (a síndrome nefrótica caracteriza-se por uma proteinúria > 50 mg/kg ou > 3,5g/1,73m²/24h, constituída predominantemente por albumina (albuminúria > 3500 mg/g creatinina)). É utilizada no seu diagnóstico e tratamento, assim como na deteção e tratamento de utentes em risco de desenvolver doença renal. É recomendável a sua determinação anual em doentes diabéticos. Na sua determinação, a partir de uma amostra de urina a tempo determinado (24 horas) ou ocasional (segundo a indicação médica), é aconselhável a determinação simultânea da creatinina, de forma a não haver resultados falsamente positivos ou negativos, devido à variação da concentração da urina. Fatores como o exercício físico (num intervalo de 24 horas), infeção e febre, provocam o aumento da excreção da albumina.

A ureia é o produto metabólico com maior conteúdo em nitrogénio e advém do catabolismo das proteínas e aminoácidos. No total, mais de 90% da ureia é excretada via urinária, sendo filtrada livremente pelo glomérulo e absorvida, cerca 40-70%, passivamente, pelo túbulo renal. A acumulação de ureia na corrente sanguínea está relacionada com a doença renal, onde o aumento da concentração é característico do estado urémico (azotemia), contudo a determinação da creatinina é preferível na avaliação da função renal, uma vez que a concentração plasmática da ureia é influenciada por uma série de fatores, como a dieta, aumento do catabolismo proteico, tratamento com corticosteroides e desidratação. A sua determinação é útil no diagnóstico e tratamento de doença renal, assim como de obstrução do trato urinário e de insuficiência renal aguda ou crónica. Também é utilizada na verificação da adaptação à diálise e na avaliação do estado nutricional.

O ácido úrico é um composto nitrogenado que resulta sobretudo do catabolismo dos nucleosídeos de purina. A determinação da concentração do ácido úrico tem o seu maior valor semiológico no rastreio, estudo e monitorização da resposta ao tratamento dos doentes com gota ou outras alterações relacionadas, quer com o metabolismo das purinas, quer com a excreção renal do ácido úrico, por exemplo, litíase úrica. Dada a relação direta do ácido úrico com o catabolismo das nucleoproteínas e com a função tubular renal proximal, a determinação da sua concentração sérica é relevante na avaliação de doentes com neoplasias, designadamente doenças mielo ou linfoproliferativas, antes e durante a terapêutica (citostáticos e radioterapia), ou com insuficiência renal, para monitorizar a hiperuricemia secundária associada. A síndrome de lise tumoral pós quimioterapia ou a nefropatia úrica aguda, caracterizam-se por hiperuricemia, frequentemente com valores > 15 mg/dl, hipercaliémia, hiperfosfatémia e aumento da atividade sérica da LDH (lactato desidrogenase). A determinação da uricosúria utiliza-se sobretudo para selecionar o tipo de terapêutica a instituir nas hiperuricemias clinicamente significativas.

O exame sumário da urina é efetuado no equipamento Clinitek Atlas (exame físico-químico) e no Citómetro de fluxo Sysmex UF 1000i (identificação e contagem dos elementos figurados, nomeadamente células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e cilindros). Se os resultados obtidos forem discrepantes, ou quando prescrito houver necessidade de identificar a presença de eritrócitos dismórficos, identificar e caracterizar os cilindros ou cristais, efetua-se a observação do sedimento por microscopia ótica. O exame físico inclui a análise da cor, aspeto e gravidade específica. A gravidade específica está relacionada com a quantidade de elementos presentes na urina, que variam de acordo com o poder de excreção e concentração renal. O exame químico, efetuado através de tiras reativas (Clinitek Atlas), inclui a determinação do pH, proteínas, glicose, cetona, sangue, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos e esterases leucocitárias, fornecendo resultados semi-quantitativos. O pH numa urina normal varia entre 4,5 e 8, sendo menos ácida durante e após a refeição. A causa mais comum de um pH superior a 8 é proliferação de bactérias produtoras de urease (conservação inapropriada). A presença de sangue na urina nem sempre é detetável pela cor (uma reação positiva pode indicar hematúria, hemoglobinúria ou miogloninúria). A observação do sedimento urinário, permite distinguir hematúria de hemoglobinúria. A hematúria pode resultar, por exemplo, de doenças do aparelho urinário e renal, trauma, hipertensão e atividade física. A hemoglobinúria é, principalmente, devido à hemólise intravascular e pode surgir em

situações de lesão muscular (exemplo: rabdomiólise). A positividade das esterases leucocitárias (neutrófilos), presença de mais de 10 leucócitos/ μL , observa-se, frequentemente, em processos inflamatórios (exemplo: infecciosos e autoimunes), que envolvem o aparelho urinário. A determinação dos nitritos é útil na identificação de infecções urinárias por microrganismos que reduzem os nitratos a nitritos, em particular as bactérias pertencentes à família das Enterobacteriaceae. As proteínas existem, normalmente, em pequenas concentrações na urina, sendo as mais comuns a albumina e a proteína de Tamm-Horsfall (mucoproteína). A existência de proteinúria é, geralmente, o primeiro indicador de doença renal. A glicose filtrada é, posteriormente, reabsorvida. Quando a concentração de glicose plasmática é superior a 160-180 mg/dl, a capacidade de reabsorção dos túbulos renais é excedida, ocorrendo glicosúria. A sua positividade reflete a existência de hiperglicemia, disfunção dos túbulos proximais renais ou pode ser devida à ingestão de fármacos, como diuréticos tiazídicos. Os corpos cetónicos (ácido acetoacético) resultam do metabolismo dos ácidos gordos e, normalmente, não estão presentes na urina. Os corpos cetónicos existem na urina, em casos de jejum prolongado, gravidez e diabetes descompensada. A bilirrubina, em indivíduos normais, é excretada em quantidades vestigiais. Surge quando ocorrem distúrbios na formação da bilirrubina e anomalias hepáticas e metabólicas de armazenamento ou de excreção. O urobilinogénio está normalmente presente na urina numa concentração aproximada de 1 mg/dl, estando aumentado na doença hepática e hemolítica.

3.1.12 Função Pancreática

Na função pancreática, as enzimas digestivas amilase e lipase são frequentemente utilizadas no diagnóstico e monitorização da evolução clínica e da resposta ao tratamento para a pancreatite aguda.

A amilase catalisa e hidrolisa moléculas de amido (composto por amilose e amilopectina) e de glicogénio (estrutura semelhante à amilopectina) na presença de iões cálcio e cloreto. A α -amilase atua nas ligações 1-4 glicosídeas, degradando o amido em moléculas de glicose, maltose e dextrina. É produzida, principalmente, nas células acinares pancreáticas (amilase pancreática) e nas glândulas salivares. A amilase pancreática é utilizada sobretudo no diagnóstico e tratamento da pancreatite aguda. Após

o início da sintomatologia (pancreatite aguda), os seus níveis séricos aumentam a partir das 2 a 12 horas, atingindo o valor máximo entre as 12 e as 72 horas, na maior parte dos casos com uma atividade 4 a 6 vezes superior ao limite do intervalo de referência, retornando ao valor basal ao fim de 4 a 7 dias (em 80 % dos casos).

A lipase hidrolisa os ésteres do glicerol na presença de colipase e sais biliares. A enzima é produzida no pâncreas e, em menores quantidades, no estômago e intestino grosso. A sua determinação é utilizada sobretudo no diagnóstico de pancreatite aguda, sendo mais sensível e específica do que a amilase, no diagnóstico de distúrbios pancreáticos. Após 4 a 8 horas do início da sintomatologia (pancreatite aguda), a sua atividade aumenta, atingindo o valor máximo entre as 12 e as 72 horas, na maior parte dos casos com uma atividade 2 a 50 vezes superior ao limite do intervalo de referência. O valor da atividade da lipase retorna aos valores basais após 1-2 semanas.

3.1.13 Função Tiroideia

Na função tiroideia, a tiroide é a glândula responsável pela produção de calcitonina (hemóstase do cálcio) e hormonas tiroideas (triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina (T4)). O iodo (I) é fundamental na síntese hormonal, logo uma deficiência nutricional pode provocar hipotireoidismo. A tiroide peroxidase (TPO) é uma enzima ligada à membrana das células foliculares da tiroide, responsável pela oxidação do I⁻ a I⁺ e incorporação do I⁺ nos resíduos tirosil da tiroglobulina, resultando na produção das formas ativas T3 e T4. Na circulação T3 e T4, ligam-se irreversivelmente às proteínas transportadoras, nomeadamente à globulina transportadora de tiroxina (TBG) e, em menor frequência, à albumina. A T3 e T4 ligadas são metabolicamente inativas, sendo a forma ativa as suas formas livres. A TSH (hormona estimuladora da tiroide) estimula a tiroide a produzir e a secretar T3 e T4. A produção de TSH é estimulada pela TRH (hormona libertadora de tirotropina) no hipotálamo, onde a síntese e secreção da TSH na pituitária anterior, é estimulada por feedback negativo, afetando as concentrações séricas das frações livres de T3 e T4.

A determinação de T3 e T4 é fundamental no diagnóstico e monitorização da terapêutica de patologias da tiroide. A produção de hormonas tiroideas está dependente do eixo hipotálamo-pituitária-tiroide, logo uma disfunção em qualquer parte do sistema

pode alterar os níveis séricos de T3 e T4. A produção excessiva de T3 ou T4, resulta em hipertiroidismo, enquanto a síntese diminuída conduz ao hipotiroidismo. Visto que os níveis séricos de T3 alteram mais rapidamente e acentuadamente do que a T4, a determinação da T3 é útil em testes supressores ou estimuladores, como indicador de resposta da glândula e, também, serve para estimar as reservas da tiroide quando esta é estimulada. As frações livres de T3 e T4 são úteis para despistar quaisquer variações na concentração total T4 e T3, devido a variações na concentração sérica das suas proteínas transportadoras. Por exemplo, na gravidez há elevação da concentração de TBG e, consequentemente, o aumento sérico de T3 e T4 total, mas os níveis séricos de T3 e T4 livres encontram-se inalterados.

A TSH é fundamental na avaliação do funcionamento da tiroide, pois a sua quantificação é útil no diagnóstico diferencial entre hipotiroidismo primário (tiroide), secundário (pituitária) e terciário (hipotálamo). Os níveis séricos de TSH estão elevados no hipotiroidismo primário e reduzidos no hipotiroidismo secundário e terciário. É utilizada na confirmação de hipotiroidismo primário, onde é frequente os níveis de TSH estarem elevados e os de T4 livre diminuídos. Uma das formas de detetar doenças tiroideias autoimunes é através da quantificação de anticorpos contra a peroxidase da tiroide (anti-TPO). Estes anticorpos estão aumentados em 80 a 99% dos casos de hipotiroidismo autoimune e em 45 a 80% dos casos de doença de Graves, embora também estejam presentes em 10 a 15% dos indivíduos saudáveis. A quantificação de auto-anticorpos contra a tiroglobulina (anti-Tg) é útil no diagnóstico de hipotiroidismo autoimune. Na Tiroidite de Hashimoto, a produção de hormonas da tiroide diminui devido à existência de anticorpos. Os anti-Tg estão aumentados, em 80 a 100% dos casos, de hipotiroidismo autoimune (Tiroidite de Hashimoto), embora, também, estejam presentes em 60 a 70% dos casos de doença de Graves e em 3% dos indivíduos saudáveis. A doença de Graves é de origem autoimune, sendo uma das causas mais frequentes de hipertiroidismo. Na referida patologia produzem-se anticorpos anti-recetor de TSH (TRAb - TSH recetor antibodies), que estimulam o recetor e levam à síntese excessiva de hormonas tiroideias. Deste modo, a produção de TSH é suprimida, os níveis totais e livres de T3 e T4, encontram-se aumentados e TRAb positivos (70-100%).

3.1.14 Metabolismo Ósseo

O cálcio (Ca^{2+}) é importante na contração muscular, nomeadamente do músculo cardíaco e, também, detém um papel fundamental no metabolismo ósseo. No organismo, aproximadamente, 99% do cálcio faz parte dos ossos e a sua homeostasia é regulada sobretudo a nível do intestino delgado, esqueleto e rins. No sangue, o cálcio existe na forma ionizada e, em menor quantidade, ligado a aniões e a proteínas, sobretudo à albumina. Os níveis séricos de Ca^{2+} são regulados pela PTH (paratormona), vitamina D e calcitonina. A sua determinação é útil no diagnóstico e tratamento de várias doenças ósseas, assim como de doença paratiroide e insuficiência renal crónica.

A síntese de PTH na glândula paratiroide é estimulada pela diminuição dos níveis séricos de cálcio e inibida pela elevação dos mesmos. A produção da PTH, desencadeada em resposta à hipocalcémia, aumenta a reabsorção óssea pelos osteoclastos, ocorrendo elevação sérica de cálcio, devido à desmineralização óssea, e estimula a produção renal de vitamina D ativa. A sua determinação, em conjunto com a determinação de cálcio ionizado, é útil, como auxiliar, no diagnóstico diferencial de hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo ou hipercalcemia maligna. O hiperparatiroidismo primário é confirmado pela hipercalcemia com elevação da PTH. A sua quantificação também é útil na avaliação e tratamento de problemas ósseos metabólicos (exemplo: osteoporose).

A vitamina D inativa advém da alimentação (vitamina D₂) e da síntese dérmica (vitamina D₃), estimulada pela exposição solar. A forma inativa é convertida, enzimaticamente, por hidroxilação no fígado e rins. No rim ocorre a última etapa de hidroxilação, dando origem à forma biologicamente ativa da vitamina D, a 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-[OH]₂-D₃). A vitamina D (hormona) em resposta à diminuição sérica de cálcio, estimula a absorção intestinal de cálcio, melhorando o efeito da PTH sob a desmineralização óssea. A sua determinação é útil na avaliação do metabolismo ósseo.

A calcitonina, produzida pelas células tiroideias, é secretada em resposta ao aumento da concentração sérica de cálcio. A hipercalcémia estimula a secreção da calcitonina, que por sua vez causa a diminuição sérica de cálcio, através da inibição da síntese da PTH e da vitamina D, ocorrendo aumento da excreção renal e deposição óssea

de cálcio. A hipercalcemia resulta sobretudo da existência de hiperparatiroidismo primário (excesso de secreção de PTH), enquanto hipocalcémia resulta, por exemplo, do hipoparatiroidismo primário (não há produção de PTH), da diminuição ou resistência à vitamina D, da hipoalbuminemia (afeta apenas o cálcio total) e do pseudo-hipoparatiroidismo (resposta à PTH reduzida ou resistência do órgão). A sua determinação é útil no diagnóstico e tratamento de doenças da tiroide e paratiroide, incluindo carcinomas (exemplo: carcinoma medular da tiroide e tumor das células secretoras de calcitonina da tiroide).

3.1.15 Marcadores Cardíacos

Nos marcadores cardíacos, uma das manifestações mais graves da doença isquémica cardíaca é o enfarte agudo do miocárdio (EAM), que surge como uma das consequências da aterosclerose. O EAM ocorre devido ao desequilíbrio no abastecimento de oxigénio ao miocárdio, causando lesão celular e eventual morte dos miócitos. Se o fluxo sanguíneo coronário for bloqueado por mais de alguns minutos, a região é seriamente afetada, ocorrendo necrose no miocárdio. Eventos menos graves variam entre episódios de angina estável a instável. As síndromes coronárias agudas variam entre angina (sem necrose) e EAM (há necrose). Os biomarcadores cardíacos são úteis na monitorização e avaliação da lesão celular do miocárdio. Alguns dos marcadores são a creatina quinase fração MB (CK-MB), mioglobina, troponina I (cTnI) e T (cTnT).

O CK-MB é uma das isoenzimas da creatina quinase com origem primária no miocárdio. A elevação de CK-MB está associada à necrose celular e ocorre após EAM. Os indivíduos com angina instável com elevação de CK-MB, apresentam maior risco de EAM. Após a lesão do miocárdio, entre 4 a 6 horas os níveis de CK-MB aumentam, atingindo o pico de concentração após 12-24 horas e regressam à normalidade após 2-3 dias. Nos que apresentam EAM, após terapêutica trombolítica, a elevação do CK-MB dentro de 2 horas indica reperfusão com sucesso.

A mioglobina é uma proteína de transporte molecular de oxigénio. Está presente no músculo cardíaco e esquelético, logo não é específica do músculo cardíaco. É o melhor biomarcador precoce de necrose, sendo libertada num período 1-4 horas após os sintomas, atingindo o pico 6-9 horas, e retoma à normalidade entre 18-24 horas. A elevação nas

primeiras horas não determina a ocorrência de EAM e se os seus valores permanecerem dentro do intervalo de referência 8 horas após os sintomas, o EAM pode ser excluído, pois indica sucesso da reperfusão do miocárdio.

As troponinas T e I são proteínas consideradas marcadores de primeira linha com especificidade cardíaca absoluta e elevado índice de exatidão na detecção de lesões mínimas de necrose (focais ou microscópicas), independentemente, da sua etiologia. São úteis na estratificação do risco de morbilidade e mortalidade, relacionado com a probabilidade de ocorrência de episódios cardíacos adversos. Para além do seu valor diagnóstico e prognóstico, permitem identificar os doentes com doença instável das artérias coronárias, que podem beneficiar de uma terapêutica médica ou cirúrgica precoce e agressiva. Após um episódio de angina de peito, em poucas horas, os níveis da cTnT aumentam, atingindo o pico às 24 horas. Os níveis de TnTc mantêm-se elevados durante 7-10 dias, tendo uma janela de 2-3 dias em relação ao CK-MB. A cTnI, após enfarte, é libertada na corrente sanguínea num intervalo 4-6 horas, atingindo o pico de concentração após 12-18 horas, mantendo-se durante 6 dias.

3.1.16 Marcadores Tumoriais

Os marcadores tumorais produzidas pelo tumor ou pelo organismo são determinados como complemento no diagnóstico e prognóstico, na detecção de recidivas, na monitorização da eficácia da terapêutica e na determinação de alvos terapêuticos de doença oncológica.

O PSA (Antígeno Prostático Específico) é utilizado no rastreio e monitorização terapêutica do cancro da próstata. É produzido pela próstata, sendo específico para o respetivo tecido, mas não para o cancro prostático. Possui um tempo médio de vida de 22-33 horas. Após procedimentos, como biópsia transrectal, ressecção transuretral da próstata e prostatectomia radical, os níveis séricos de PSA total demoram 2-3 semanas a normalizar. Uma vez que o PSA só é produzido na existência de próstata, em casos de prostatectomia radical, os níveis de PSA diminuem para níveis indetetáveis. A sua elevação ocorre no cancro prostático e em situações benignas, como a hiperplasia prostática benigna e prostatite. A sua determinação, em conjunto com exame retal digital, é mais específica e sensível na detecção inicial de cancro, comparativamente só com

realização do exame digital. Como medida preventiva, homens a partir dos 50 anos devem realizar a determinação do PSA, como auxiliar na deteção do cancro prostático.

O CEA (antígeno carcinoembrionário) é uma glicoproteína pertencente à família das imunoglobulinas, que participa nos processos de adesão, apoptose e imunidade celular. É útil no diagnóstico, prognóstico e monitorização da terapêutica no cancro colo-rectal. Está, igualmente, aumentado em tumores pulmonares, mamários e gastrointestinais. O CEA não é específico para cancro colo-rectal, não sendo utilizado para o seu rastreio. Devido ao facto de participar na adesão celular, normalmente, está associado com o aparecimento de metástases.

O CA 125 (antigénio cancerígeno) é uma glicoproteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal OC125. Os tumores epiteliais ováricos podem expressar o CA 125, logo está associado ao cancro epitelial não mucinoso dos ovários, bem como a outros tipos de cancro dos ovários. É utilizado na monitorização da terapêutica e, também, na deteção precoce de recidivas de cancro nos ovários em conjunto com outras metodologias de diagnóstico. O marcador está associado com o tamanho e grau do cancro, estando presente em 50% dos indivíduos com cancro ovárico de estadio I, em 90% dos casos de estadio II e superior 90% nos estadios III e IV. Numa situação pós-operatória os níveis de CA 125 são um indicador de prognóstico, pois estão relacionados com a massa tumoral. Também pode estar aumentado em outros carcinomas, como tumores gastrointestinais, pulmonares, pancreáticos e colo-rectais.

O CA 15-3 é uma glicoproteína polimórfica expressa pelo epitélio mamário. É dos marcadores mais utilizados na monitorização de cancro mamário. O CA 15-3 é utilizado para avaliar o sucesso da terapêutica no cancro da mama metastático. Igualmente, pode ser aplicado na deteção de recidivas de cancro em doentes anteriormente tratados. As suas concentrações séricas podem estar elevadas em outras doenças malignas, como cancros pancreáticos, pulmonares, ovarianos, colo-rectais e hepáticos.

O CA 19-9 é um antigénio do tipo carbohidrato produzido pelas células dos ductos pancreáticos e biliares e nos epitélios salivares, gástrico, cólon e endométrio. É utilizado na monitorização do cancro pancreático e, também, no gastrointestinal e colo-rectal. É útil na deteção precoce de recidivas de cancro. A sua concentração sérica está associada ao grau do cancro pancreático. É, igualmente, utilizado na diferenciação entre doenças pancreáticas benignas e malignas.

3.2 Hematologia

Na valência de hematologia serão destacados os parâmetros mais representativos, em termos de valor semiológico, nomeadamente parâmetros hematológicos e estudo morfológico do sangue periférico, determinação de grupos sanguíneos (teste de Coombs e a pesquisa de anticorpos irregulares - PAI), velocidade de sedimentação (VS), parâmetros relacionados com a pesquisa e identificação de variantes de hemoglobina (estudo das hemoglobinopatias) e estudo da hemostase, trombofilia e fibrinólise.

O anticoagulante mais usual, o K3EDTA (sal tripotássico de EDTA), é utilizado na determinação dos índices hematológicos, no estudo morfológico do sangue periférico e na determinação da VS. O citrato trissódico (9 volumes de sangue para 1 de citrato) é usado na colheita de amostras para estudo da hemostase, trombofilia e fibrinólise, assim como na determinação do número de plaquetas, caso se verifiquem agregações espontâneas plaquetárias em EDTA.

3.2.1 Hemograma

O hemograma é uma das análises mais prescritas na prática clínica. Compreende a análise e interpretação dos resultados dos elementos figurados do sangue total em EDTA, de forma quantitativa e qualitativa. Este inclui o eritrograma, reticulócitos, leucograma e trombocitograma, sendo importante na avaliação da função hematológica e das doenças relacionadas, bem como na avaliação do estado geral de saúde, fornecendo informações sobre a quantificação e morfologia celular (tamanho e forma) e orientado para eventuais testes adicionais.

Os parâmetros reportados pelo laboratório no âmbito do eritrograma são: contagem de eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e índice de dispersão eritrocitário (RDW). O hematócrito representa a massa eritrocitária e é um parâmetro calculado ($VGM \times RBC / 10$). A hemoglobina caracteriza a anemia e reflete a capacidade potencial de transporte de oxigénio. O VGM é útil na classificação morfológica/citométrica da anemia (microcítica,

normocítica ou macrocítica). A CHGM avalia a concentração média de hemoglobina por unidade de volume de eritrócitos, sendo útil na classificação da anemia (hipocrômica e normocrômica) e na detecção de esferocitose. O RDW mostra o coeficiente de variação da distribuição do volume dos eritrócitos, sendo importante na classificação da anemia microcítica, assim como na identificação de fragmentação celular, aglutinação eritrocitária e dimorfismo dos eritrócitos. A avaliação de reticulócitos abrange o valor percentual, concentração, volume dos reticulócitos (VGMr), hemoglobina reticulocitária (CHr) e concentração de hemoglobina reticulocitária globular média (CHGMr). A Contagem de reticulócitos permite o diagnóstico diferencial entre as anemias não regenerativas e regenerativas, permitindo a monitorização da sua evolução clínica e resposta ao tratamento. A determinação da hemoglobina reticulocitária tem o seu maior valor semiológico na identificação das anemias por deficiência funcional de ferro e monitorização da terapêutica com ferro ou fármacos estimulantes da eritropoiese.

O leucograma inclui a contagem do número total de leucócitos e a sua contagem diferencial (em percentagem e em valor absoluto), também designada de fórmula leucocitária, que integra os valores de neutrófilos (segmentados e não segmentados), eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. É importante na avaliação do número e distribuição das células brancas, detetando alterações nas mesmas, bem como alterações atípicas celulares (exemplo: segmentação) e a existência de blastos no sangue periférico. Como tal, é útil no rastreio de infeções e processos inflamatórios, doenças autoimunes e doenças oncológicas.

O trombocitograma compreende a contagem total de plaquetas, o volume médio (VPM) e o coeficiente de distribuição (PDW). O trombocitograma é útil na avaliação da hemostase primária e na detecção de doenças que implicam alterações no número de plaquetas, tais como neoplasias mieloproliferativas e doenças autoimunes e hereditárias.

3.2.2 Equipamento ADVIA® 2120

O equipamento ADVIA® 2120 Hematology System (SIEMENS) é um equipamento automatizado de diagnóstico aplicado à determinação de parâmetros hematológicos, por ensaio colorimétrico e citometria de fluxo, associada a diversas reações citoquímicas, sobretudo a partir de amostras de sangue total.

Os canais do Sistema ADVIA® 2120 e os métodos usados são:

Canal HGB – Hemoglobina - Os eritrócitos são lisados libertando Hb, o ferro do heme da Hb é oxidado, passando do estado ferroso para o estado férrico, sendo depois combinado com o cianeto do reagente ADVIA para formar o produto da reação. As leituras óticas são obtidas colorimetricamente a 546 nm.

Canal RBC/PLT – Eritrócitos e Plaquetas - O reagente ADVIA contém dodecil sulfato de sódio (SDS) e glutaraldeído que provoca a esferificação isovolumétrica dos eritrócitos e plaquetas, de maneira a eliminar a forma como fator de variabilidade. As plaquetas e os eritrócitos são fixados.

Canal Retic. – Reticulócitos - O reagente ADVIA autoRETIC contém um detergente zwitteriônico (surfactante) que esferifica isovolumetricamente os eritrócitos. Também contém um corante vital, oxazina 750, que cora as células de acordo com o seu conteúdo de RNA.

Canal PEROX – Peroxidase - Os surfactantes combinados com stress térmico lisam os eritrócitos. O formaldeído fixa os leucócitos. O meio hipertónico causa alguma contração e crenação dos leucócitos incrementando o índice de refração das células melhorando a detecção dos linfócitos. No citograma Perox (Figura 1) as células absorvem a luz proporcionalmente à quantidade de coloração da peroxidase presente (eixo x). As células dispersam a luz proporcionalmente ao seu tamanho (eixo y). Quando os dados de dispersão da luz e de absorção são traçados, formam-se clusters distintos. A análise de clusters identifica cada população com base na sua posição, área e densidade, a seguir, é processado o número de células de cada população.

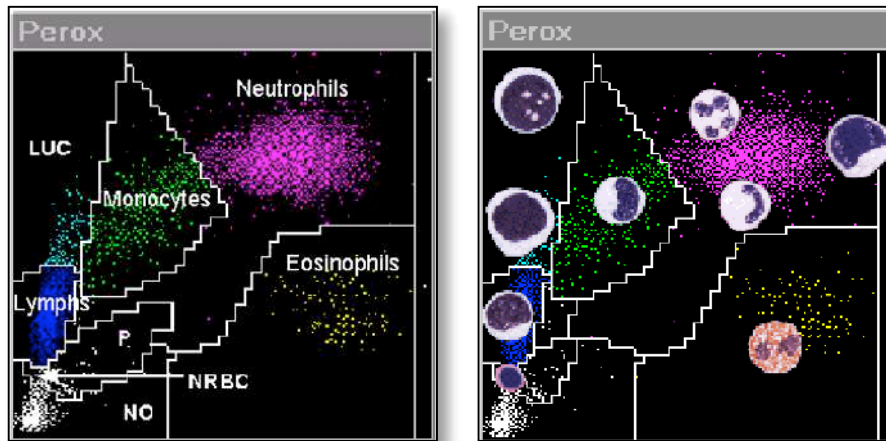


Figura 1) Representação da distribuição celular (citograma Perox). Adaptado de Siemens Healthcare Diagnostics 2010.

Canal BASO - O reagente ADVIA BASO contém ácido ftálico e um surfactante que lisam os eritrócitos, as plaquetas e o citoplasma dos leucócitos com exceção dos basófilos. No citograma BASO (Figura 2) a dispersão da luz relativa à configuração do núcleo é traçada no eixo x e a dispersão da luz relativa ao tamanho da célula é traçada no eixo y e formam-se populações ou clusters diferentes.

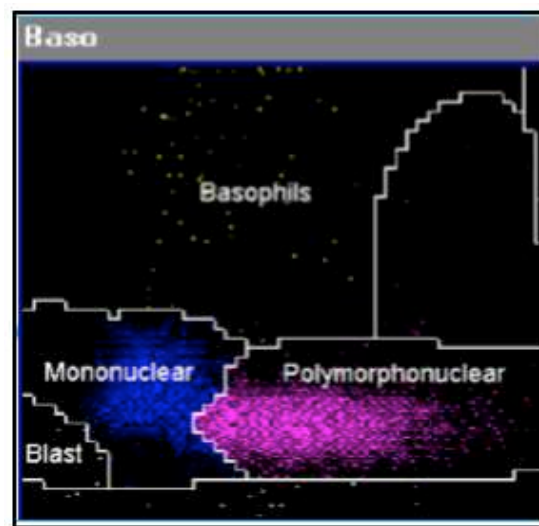


Figura 2) Citograma BASO. Adaptado de Siemens Healthcare Diagnostics 2010

3.2.3 Equipamento ADVIA® 2120 AutoSlide®

Ao sistema hematológico é acoplado o sistema ADVIA® Autoslide que prepara e aplica a coloração nos esfregaços sanguíneos. O método de coloração utilizado é o May-Grünwald-Giemsa, que utiliza um corante modificado de azul metileno-eosina, que contém uma mistura de duas colorações distintas. Durante a coloração, as granulações neutrófilas dos leucócitos e as zonas acidófilas celulares são coradas com a aplicação do corante May-Grünwald (metanol (99,65%) e azul metileno-eosina a 0,35%). Seguidamente, a cromatina dos núcleos e o citoplasma dos monócitos e dos linfócitos são corados através da aplicação de outro corante (metanol (56%), glicerina (43%) e azul metileno-eosina a 1%).

Esfregaço de Sangue Periférico

A observação do esfregaço de sangue periférico permite a caracterização morfológica e a identificação de todos os elementos figurados presentes (células hematopoiéticas e hematozoários). Realiza-se o estudo morfológico da série eritrocitária, leucocitária e plaquetária, identificando e caracterizando células anormais, como as que surgem nas neoplasias linfóides, mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas, reportando as alterações significativas. Os critérios para a observação do esfregaço são estabelecidos pelo laboratório em função dos alarmes quantitativos (altos e baixos) e qualitativos (sinalizadores de morfologia), configurados nos contadores automáticos hematológicos e critérios clínicos.

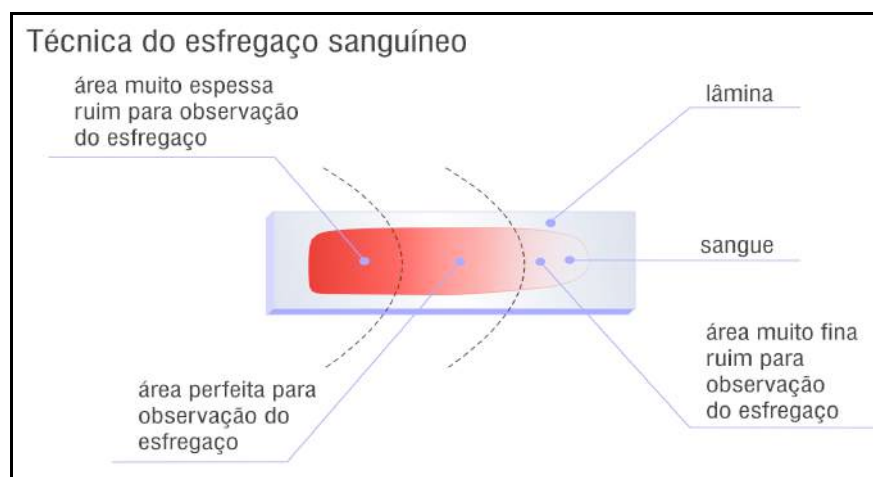


Figura 3) Esfregaço de Sangue Periférico. Adaptado de <http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/tecnica-esfregaco-sanguineo/>

3.2.4 Analisador de Velocidade de Sedimentação VES - MATIC cube 200

O equipamento Analisador de Velocidade de Sedimentação VES - MATIC cube 200 determina diretamente a VS a partir de amostras colhidas em tubo de hemograma, através do método Westergren modificado. As amostras deverão estar à temperatura ambiente e é critério de rejeição a presença de um coágulo ou volume insuficiente (inferior a ± 1.5 ml). A análise inicia-se com a homogeneização da amostra, seguindo-se a sedimentação, durante um período de tempo predeterminado. O equipamento possui sensores analógicos que determinam automaticamente a VS.

A VS é expressa em mm/h e ocorre em 3 fases: agregação (forma-se o rouleaux); precipitação (aumento do processo de sedimentação); empacotamento, onde os agregados de eritrócitos se concentram no fundo. É um método de *screening*, ou seja, é um parâmetro inespecífico e deve ser avaliada em conjunto com os dados e história clínica do paciente. A VS está aumentada, por exemplo, em situações inflamatórias agudas, infeções agudas e crónicas, doenças autoimunes, doenças reumáticas, anemias, em situações de hemólise e, de forma geral, em neoplasias.

3.2.4 Analisador Imunohematológico AutoVue® Innova

É um equipamento automático de imunohematologia, utilizado na fenotipagem sanguínea ABO/Rh e pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários.

O Teste de Coombs e a Fenotipagem ABO/Rh, segundo a ISBT (International Society of Blood Transfusion), atualmente existem 36 sistemas de grupos sanguíneos, sendo o sistema ABO e Rh os mais importantes na prática clínica diária. Os testes de fenotipagem, assim como a pesquisa de anticorpos, são de extrema importância para os bancos de sangue e para a terapêutica transfusional homóloga, a fim de evitar reações transfusionais, sobretudo as imunológicas. Estas reações podem ser imediatas, tal como a hemólise intravascular aguda por incompatibilidade ABO ou tardias, como a hemólise extravascular com icterícia e a púrpura trombocitopénica pós-transfusional. O conhecimento do sistema Rh na grávida é importante na prevenção da doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade feto-maternal de Rh. Na determinação do sistema ABO/Rh, pesquisa-se a presença de antígeno de superfície membranar eritrocitária (prova direta) e a existência de anticorpos presentes no soro/plasma (prova reversa). Na prova direta utilizam-se anticorpos monoclonais (IgM) anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D, enquanto na prova inversa se verifica a ocorrência, ou não, de reação entre o soro/plasma do doente e os eritrócitos A1 e B (testar os eritrócitos A2, ou O, não são obrigatórios).

O antígeno D é o mais imunogénico e clinicamente importante do sistema Rh e, caso os anticorpos monoclonais anti-D reajam com a amostra, considera-se a amostra RhD+.

O teste de Coombs direto utiliza soros anti-IgG/C3d poliespecífica a fim de determinar a presença, ou ausência, de anticorpos e/ou de complemento na superfície de eritrócitos. Um teste positivo pode ocorrer no recém-nascido por incompatibilidade feto-maternal, reações transfusionais e doenças autoimunes. A pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), ou teste Coombs indireto, deteta os anticorpos anti-eritrocitários mais relevantes, sendo útil nas grávidas Rh- e antes de transfusões sanguíneas. Quando se obtém uma amostra positiva, a fim de se obter o título de anticorpos, executa-se uma série de diluições sucessivas, com o objetivo de identificar a mais baixa diluição, onde o

resultado se mantem positivo. Na amostra positiva deve ser identificado o anticorpo específico.

3.2.5 VARIANT™ II Hemoglobin Testing System

O equipamento VARIANT™ II Hemoglobin Testing System possui dois programas distintos, nomeadamente o programa HbA1c e o programa de rastreio de β -talassémias (identifica e quantifica hemoglobinas A2, F e variantes de hemoglobina). O equipamento separa, identifica e determina a percentagem relativa de hemoglobinas, com base nos tempos de retenção e nas áreas dos picos de cada amostra.

A hemoglobina em maior percentagem no adulto é a HbA (95-98%), a qual resulta da junção de 2 cadeias de α -globina com 2 de β -globina. As hemoglobinopatias são doenças genéticas, onde a estrutura ou a hemoglobina estão alteradas. A β -talassémia, α -talassémia e a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH) são hemoglobinopatias do tipo quantitativo, ou seja, resultam da ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia globínica, enquanto que as do tipo qualitativo (variantes de hemoglobina) resultam da alteração da estrutura de uma cadeia globínica. Em Portugal as hemoglobinopatias mais comuns são a β -talassémia e a drepanocitose.

Na deteção de portadores de hemoglobinopatias é fundamental ter em conta aspetos como a história clínica e familiar e o hemograma. O hemograma é útil na diferenciação de talassemias (geralmente, existe anemia microcítica e hipocrómica) de outras hemoglobinopatias, sendo, o passo seguinte, a quantificação de variantes de hemoglobina. Anomalias na cadeia β -globina são uma das alterações mais frequentes nas hemoglobinopatias sintomáticas que levam à diminuição ou ausência de HbA e ao aumento de HbF ($\alpha 2\gamma 2$) e/ou HbA2 ($\alpha 2\delta 2$), sendo o aumento percentual das mesmas, uma pista para a presença de uma hemoglobinopatia. Por exemplo, a persistência de HbA2 ($> 3,5\%$) é característica da β -talassémia e a elevação de HbF (5-30%) típica da HPFH. Na α -talassémia, em casos mais severos (genótipo $--/\alpha$), existe a presença de HbH ($\beta 4$). O sistema cromatográfico permite a identificação presuntiva de HbS, HbC e HbD- Punjab e é o método de referência para a deteção de portadores de hemoglobinopatias, pois permite a quantificação HbA, HbA2 e HbF. Quando a variante não é identificada, pelos dois

métodos anteriormente referidos, é necessário recorrer a métodos adicionais, como a métodos de sequenciamento de ADN (ácido desoxirribonucleico).

3.2.6 Analisador BCS[®] XP

O equipamento BCS[®] XP é um sistema analítico espectrofotométrico automatizado, que permite executar os ensaios utilizados na prática clínica para o estudo da hemostase, trombofilia e da fibrinólise, por métodos baseados na formação e deteção do coágulo (turbidimetria), bem como por métodos cromogénicos e imunológicos, a partir de amostras de plasma anticoagulado com citrato trissódico. A turbidimetria é aplicada na determinação do tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo de trombina, onde se mede o tempo de formação do coágulo, isto é, mede-se o tempo que demora a atingir um ponto final ótico pré-determinado. A turbidimetria é, também, utilizada para detetar a formação de imunocomplexos (método imunológico), como é o caso da determinação de D-dímeros.

No Tempo de Protrombina (TP), os valores do TP/INR refletem a atividade dos fatores do sistema extrínseco (fator VII) e da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio) do sistema da coagulação, que são sintetizados no fígado. Os resultados do TP são reportados em tempo (segundos) e sob a forma de Razão Normalizada Internacional (INR), que é calculada em função do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) da tromboplastina tecidular utilizada, permitindo que os resultados de todos os laboratórios sejam comparáveis entre si, independentemente do tipo de reagente utilizado. Os valores do INR são utilizados para monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais antagonistas da Vitamina K, por exemplo, varfarina e acenocumarol.

No Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), os valores do TTPa refletem a atividade dos fatores de contacto, do sistema intrínseco (fatores VIII e IX) e da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio). O TTPa não é afetado pelas deficiências do fator VII, sendo mais sensível para as dos fatores VIII e IX do que para as de contacto e da via comum. Os seus resultados são reportados em tempo (segundos) e sob a forma de razão, em função de um plasma controlo normal. A determinação do TTPa tem o seu maior valor semiológico no rastreio e diagnóstico das deficiências hereditárias e adquiridas dos fatores do sistema intrínseco e da via comum, assim como na monitorização da terapêutica anticoagulante com heparina não fracionada. É de salientar

que o TTPa, assim como o TP, são testes de *screening* e a obtenção de resultados dentro dos intervalos de referência não anula a possibilidade da existência de um distúrbio hemorrágico, pois podem ocorrer resultados normais num utente com uma suave deficiência num determinado fator.

Os D-dímeros, presentes na circulação sanguínea periférica, advêm da ativação do sistema procoagulante que resulta da atividade da trombina (cliva o fibrinogénio, originando monómeros de fibrina, os quais contêm monómeros D) e do sistema fibrinolítico, onde a plasmina, ao participar na clivagem do fibrinogénio e na destruição do coágulo de fibrina, origina FDPs (Fibrin Degradation Products) que contêm D-dímeros. Logo, os valores de D-dímeros estão diretamente relacionados com o estado de ativação do sistema procoagulante e da fibrinólise, mas não podem ser diretamente correlacionados com a gravidade clínica das patologias responsáveis pelo o seu aumento, nomeadamente as doenças tromboembólicas, como a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar. A determinação da concentração dos D-dímeros é útil, sobretudo, no diagnóstico da doença tromboembólica venosa, nomeadamente na sua exclusão em determinadas situações, bem como no diagnóstico de Coagulação Intravascular Disseminada (CID).

4. Imunologia

As análises de imunologia são realizadas em três diferentes áreas laboratoriais, nomeadamente no designado *Core Laboratorial*, área de Radioimunoensaio e na área de imunologia. No core efetuam-se, automaticamente, grande parte dos testes de *screening* de infeções virais. A área de imunologia inclui os ensaios relacionados com a serologia infecciosa e autoimunidade, nomeadamente técnicas de aglutinação, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e imunofluorescência.

4.1 Métodos Analíticos

ELISA

A técnica de ELISA é das mais utilizadas na rotina laboratorial. Neste tipo de ensaio, um dos componentes da reação está ligado à superfície da fase sólida. A ligação à fase sólida, pode ser por absorção não específica ou ligação química/imunoquímica, a qual facilita a posterior separação dos reagentes ligados dos livres durante as sucessivas lavagens. O princípio básico da técnica consiste na ligação de um antígeno ou anticorpo à fase sólida. O analito está, normalmente, ligado a um anticorpo acoplado a uma enzima, onde a adição do substrato enzimático provoca a alteração de cor no meio. A alteração de cor pode ser detetada e medida por espectrofotometria. A cor produzida no meio é proporcional ao analito na amostra. Este tipo de teste é rápido, de fácil execução e pode ser automatizado, permitindo a análise quantitativa e em simultâneo de um grande volume de amostras.

Imunofluorescência

A imunofluorescência (IF) possui um princípio semelhante ao da técnica ELISA. Os testes de IF podem ser utilizados na deteção de anticorpos ou antígenos presentes na amostra. O método utiliza uma molécula fluorescente como marcador a fim de detetar as reações imunológicas. Neste caso, o fluoróforo usado é a fluoresceína absorve a 490-495 nm, que ao regressar ao estado fundamental emite uma cor esverdeada a 517-520 nm, sendo esta observável ao microscópio de fluorescência. Este tipo de microscópio é capaz de excitar o fluoróforo presente na amostra e captar a energia emitida, permitindo a observação do antígeno/anticorpo (analito) em fundo escuro. Os ensaios de IF podem ser categorizados como indiretos e diretos, dependendo se o primeiro anticorpo tem, ou não, o marcador ligado. Na IF direta é utilizado apenas um anticorpo marcado com o fluoróforo. Esta técnica utiliza-se na deteção de antígenos presentes em fluídos corporais ou tecidos, como biopsias dérmicas. A técnica mais utilizada na deteção de anticorpos é a IF indireta, a qual utiliza um segundo anticorpo marcado. Na IF indireta utiliza-se uma lâmina que contém o substrato (o tipo de substrato é variável), onde se encontram os antígenos. No

final do processo há a formação de imunocomplexos marcados (antigénio - anticorpo (amostra) - anticorpo marcado com fluoresceína), onde a fluorescência emitida é proporcional à quantidade dos anticorpos presentes na amostra. O método indireto é mais sensível do que o direto, uma vez que múltiplos anticorpos podem ligar-se ao anticorpo primário. É uma técnica relativamente rápida, sendo a interpretação subjetiva (dependente da experiência do operador).

Imunoblot

O Imunoblot é utilizado como ensaio complementar e/ou confirmatório. O método consiste na incorporação de proteínas derivadas do agente infeccioso em fitas de papel absorvente ou num gel (western blot ou imunoblot). As fitas são incubadas com a amostra soro/plasma e os respetivos controlos. Se a amostra tiver anticorpos específicos, estes fixam-se às proteínas na fita. Os anticorpos ligados são visualizados através de um ensaio imunoenzimático, semelhante ao ELISA. O anticorpo marcado com uma enzima liga-se ao anticorpo humano, que por sua vez está ligado ao antigénio. A adição do substrato forma linhas visíveis, que correspondem aos locais onde ocorreu a formação de imunocomplexos. É um teste sensível e específico, detetando quantidades mínimas de anticorpo presente na amostra.

Imunodifusão

A Imunodifusão Radial utiliza placas contendo um gel de agarose, onde se encontra os anticorpos específicos, uniformemente distribuídos no suporte em gel. O antigénio (amostra) é aplicado no poço junto ao gel. Após a aplicação, o antigénio difunde-se radialmente para fora do poço, combinando-se com o anticorpo, formando imunocomplexos. A formação dos complexos origina um halo de precipitação. O diâmetro do halo formado é medido, podendo ser comparado com uma curva de calibração, obtendo-se, assim, o valor da concentração do analito.

Na Imunodifusão Dupla o antigénio e o seu anticorpo homólogo solúvel são colocados em diferentes poços, onde estes se difundem independentemente no meio em duas dimensões, horizontal e vertical. Entre os dois poços estabelece-se um gradiente de concentração, variando entre excesso de antigénio (perto do poço do anticorpo), a excesso

de anticorpo (perto do poço do antígeno). O precipitado forma uma linha visível, que corresponde ao ponto de equivalência, onde a densidade da linha reflete a quantidade de complexos formados. Normalmente, a placa contém um poço central, onde é colocado um anticorpo multiespecífico, e diferentes poços circundantes, nos quais é aplicado diferentes antígenos (incluindo as amostras e os controlos), a fim de determinar se os antígenos partilham epítomos idênticos. No final, a posição das bandas permite a comparação entre os antígenos.

Imunocromatografia

A Imunocromatografia é um tipo de ensaio utilizado em testes rápidos qualitativos. Estes tipos de testes são de uso único (descartáveis) e possuem uma elevada sensibilidade e reprodutibilidade. São constituídos por um cartucho de plástico e uma membrana de nitrocelulose, onde é acoplado o antígeno ou anticorpo. À extremidade da tira do dispositivo são adicionados a amostra e o reagente (com o anticorpo ou antígeno marcado), os quais migram em direção à extremidade oposta, onde existe uma almofada absorvente que permite manter um fluxo capilar constante ao longo da membrana. No dispositivo, as zonas de marcação e de deteção são definidas entre as duas extremidades. Na zona de deteção, antígeno ou anticorpo, imobilizado na membrana, capta o imunocomplexo formado, originando uma linha corada na zona. Este tipo de dispositivos contém o seu próprio controlo interno, que permite a validação do teste.

Aglutinação

A Aglutinação consiste na agregação visível (macro ou microscopicamente) de partículas, resultantes da reação de precipitação, que ocorre entre antígenos e os seus respetivos anticorpos específicos (aglutininas). Utiliza-se para a deteção de anticorpos ou antígenos presentes na amostra. O processo de aglutinação ocorre em duas etapas: a sensibilização e formação de agregados. A primeira etapa, consiste na ligação estável e reversível entre os antígenos à superfície da partícula e os anticorpos específicos. A sensibilização é um processo rápido, onde a ligação do anticorpo é determinada pela sua avidéz e afinidade e pela natureza das partículas (número de epítomos e disponibilidade). A segunda etapa, consiste na soma das interações que ocorrem entre os anticorpos e os

seus respectivos epítomos. A ligação dos antígenos às outras partículas, através da criação de pontes entre os anticorpos, forma ligações cruzadas (semelhantes a uma rede), conduzindo à formação de agregados visíveis. É dependente das condições ambientais (pH e temperatura) e das concentrações relativas de antígeno e anticorpo no meio. Os anticorpos IgM são aglutininas mais fortes do que as da classe IgG (são mais pequenas e com uma flexibilidade restrita, condicionando a fase de agregação). As partículas envolvidas na reação, incluem eritrócitos (hemaglutinação), células bacterianas e partículas de látex.

4.2 Serologia Infeciosa

Hepatite A

O vírus da hepatite A (VHA), pertence ao género Hepatovirus (família Picornaviridae), possui um genoma de ARN (ácido ribonucleico) em cadeia simples. A via de transmissão de infeção mais comum é oral-fecal (água e alimentos contaminados), associada a más condições sanitárias, e, raramente, por via sanguínea e sexual. Cerca de 90% dos casos de infeção, ocorrem em crianças. Na Europa a prevalência da infeção nos adultos é entre 10-50%, sendo a infeção normalmente assintomática. O vírus replica-se no fígado e possui um período médio de incubação de 28 dias. Os sintomas, como náuseas, febre e icterícia, surgem após algumas semanas (duram 1-2 semanas), sendo acompanhados com alterações das provas da função hepática, sobretudo da ALT. O diagnóstico inclui a deteção dos anticorpos anti-VHA IgM e totais. Os anticorpos anti-VHA IgM são detetáveis, durante 3 a 6 meses após o aparecimento da doença, sendo a sua determinação importante no diagnóstico de infeções agudas pelo VHA. A determinação de anti-VHA Total deteta todas as classes de anticorpos (incluindo IgG), sendo utilizado para identificar indivíduos suscetíveis à infeção e para determinar a aquisição de imunidade após vacinação.

Hepatite B

O vírus da Hepatite B (VHB) é hepatotrópico, possui cadeia dupla de ADN circular e uma enzima ADN polimerase e pertence à família Hepadnaviridae. A

transmissão da infeção ocorre por via sanguínea, sexual e vertical. A infeção manifesta-se entre 6 semanas a 6 meses após da exposição ao vírus. Os sintomas associados à infeção por VHB são icterícia, vómitos, náuseas e dor abdominal, normalmente, acompanhados do aumento das transaminases e da bilirrubina, devido à destruição dos hepatócitos (mediada pela resposta imunológica). Clinicamente, a infeção pode ser aguda (com ou sem sintomatologia) ou crónica (assintomática ou sintomática). A infeção aguda, dependendo do tipo de vírus e da resposta imunológica do hospedeiro, pode evoluir para infeção crónica ou fulminante (situação rara). A resposta imunológica na maioria dos casos é suficiente para a resolução da infeção com eliminação do vírus, convalescença e, por fim, cura da infeção. Em algumas situações ocorre infeção crónica (infeção aguda não resolvida). A hepatite crónica pode conduzir a cirrose hepática e a carcinoma hepatocelular. O diagnóstico laboratorial consiste na deteção serológica dos antígenos virais (AgHBe e AgHBs) e dos seus respetivos anticorpos (anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc (IgM e IgG)). O primeiro marcador a surgir após a infeção é o AgHBs (antígeno de superfície do VHB), sendo detetável entre 2-8 semanas. O AgHBs desaparece da circulação após 4 a 6 meses, mas se este permanecer por mais de 6 meses, indica infeção crónica. O AgHBs é útil no diagnóstico de infeções agudas e crónicas e, também, na monitorização da resposta à terapêutica. É, igualmente, utilizado para rastreio de infeção durante a gravidez, de forma a determinar o risco de transmissão durante o período perinatal. O AgHBe (antígeno de replicação viral) surge após o AgHBs e antes dos sintomas, sendo um marcador de replicação e, consequentemente, de infeção ativa. Na infeção aguda resolvida o AgHBe desaparece antes do AgHBs, havendo seroconversão. O antígeno pode não ser detetável em indivíduos infetados, denominados mutantes do pré-core (há mutação na região promotora do gene core e pré-core). O anti-HBs (anticorpo específico do AgHBs) indica recuperação e resolução da infeção, embora não seja produzido em algumas infeções agudas (desenvolvimento de infeção crónica). Pode, excecionalmente, coexistir com AgHBs em caso de sub-infeção com subtipos virais diferentes. O anti-HBs pode permanecer por toda a vida, conferindo proteção imunitária. O anti-HBc (anticorpo específico do AgHBc (antígeno do core - não detetável serologicamente) do tipo IgM, é o primeiro anticorpo detetável, surgindo cerca de 1 mês após o AgHBs, e, normalmente, desaparece após 6 meses. Encontra-se presente durante a infeção aguda e pode existir em títulos baixos na infeção crónica. A sua determinação qualitativa, por imunoensaio de captura de IgM, é útil para diagnosticar infeção hepática aguda, pois é dos marcadores mais específicos para esta fase da infeção. O anti-HBc IgG

não é indicador de imunidade (não surge após vacinação), podendo surgir durante ou após uma infeção crónica ou durante o período “janela” (quando não é detetável AgHBs e ainda não existe o anti-HBs).

O anti-HBe (anticorpo específico do AgHBe) surge antes do anti-HBs, no final da fase aguda da infeção, e está associado à resolução da infeção, na ausência do AgHBe. O anticorpo é útil para monitorizar a eficácia da terapêutica.

Hepatite C

O vírus da hepatite C (VHC) é hepatotrópico, pertence à família Flaviviridae, possui 6 genótipos e é um vírus de cadeia simples de ARN. Na grande maioria dos casos de infeção, a transmissão ocorre por via sanguínea (também pode ocorrer por transmissão sexual e vertical). O período de incubação é variável, desde 2-3 semanas até 3 meses. O VHC raramente provoca hepatite aguda, sendo mais comum (70% dos casos) a infeção crónica, que pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. A maior parte das infeções na fase inicial são assintomáticas, sendo a infeção, normalmente, diagnosticada na fase crónica. Para o rastreio da hepatite crónica são determinados os anticorpos anti-VHC IgG. Um resultado positivo é sugestivo de infeção, sendo necessários testes mais específicos e complementares para confirmar a infeção (exemplo: imunoblot e/ou pesquisa de ácidos nucleicos do VHC). A determinação do genótipo é fundamental para a prescrição de terapêutica adequada. Enquanto, a quantificação do ARN viral é fundamental para avaliar estado da infeção.

HIV

O HIV pertence ao género Lentivirus (família Retroviridae). O vírus possui tropismo para as células que expressam o receptor CD4 (monócitos, macrófagos e linfócitos T auxiliares). As vias de transmissão são a via sanguínea, sexual e vertical. Existem dois tipos, HIV 1 e 2, sendo diferentes na estrutura genómica, mas com um modo de propagação e de manifestação clínica indistinguíveis. O HIV-1 é o vírus mais predominante. O HIV-2 possui uma taxa de replicação inferior, transmite-se com menor facilidade e a progressão da infeção para doença é mais prolongada. O vírus está relacionado com a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), que surge quando o

seropositivo apresenta uma contagem de células TCD4+ inferior a 200 células/ μ l. Possui um período de incubação, entre 2-6 semanas, podendo estender-se até 3 meses. No diagnóstico de infeção, a deteção de anticorpos anti-HIV constitui um método indireto de rastreio e confirmação, enquanto a determinação do antígeno viral Ag p24 é considerado um método direto. Um teste positivo para anti-HIV e/ou Ag p24, indica presença de infeção. Uma vez que estes testes não são 100% específicos para resultados positivos, estes devem, obrigatoriamente, ser confirmados por um teste confirmatório (imunoblot), através da repetição do ensaio numa nova colheita de amostra do paciente. O ensaio de screening, utilizado na determinação dos anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, deteta simultaneamente o Ag p24 por imunoensaio em “sanduíche”. A determinação do ARN viral, utiliza-se no diagnóstico de infeções agudas, na monitorização da terapêutica e progressão da doença.

Existem, para além dos testes referidos anteriormente, testes de rastreio rápidos para a deteção de anticorpos HIV-1/HIV-2, executados a partir de amostras de soro, plasma ou sangue total. São testes imunocromatográficos que permitem a deteção qualitativa (simultânea) dos dois tipos de HIV, detetando anticorpos específicos das classes IgA, IgM e IgG. Para a deteção do vírus a membrana está revestida numa determinada região com os antígenos gp14 e p24 (HIV-1) e, noutra região, com antígenos gp36 (HIV-2). Caso o anticorpo esteja presente da amostra, interage com o antígeno, formando uma linha visível na zona correspondente ao HIV-1 ou HIV-2. O resultado positivo implica a pesquisa de anticorpos por outro método.

4.3 Rastreio na Gravidez

Citomegalovirus

O *Citomegalovirus* (CMV) é um vírus da família Herpesviridae (género *Cytomegalovirus*). A transmissão pode ocorrer através da saliva e vias sexual, sanguínea e vertical (durante a gravidez, parto ou aleitamento) e possui um período de incubação de 3-6 semanas. Normalmente, a infeção por CMV está associada a situações benignas ou sem sintomatologia, mas a infeção pode ter proporções mais sérias em grupos de risco, nomeadamente imunocomprometidos e grávidas. O CMV pode provocar diversos tipos de infeções (cujo período de incubação varia entre 3 a 12 semanas), nomeadamente as

congénitas (adquiridas durante a gravidez), podem causar embriopatias graves, sobretudo no primeiro trimestre, as perinatais, geralmente assintomáticas, e as pós-natais. Estas últimas, para além de serem as mais frequentes, são em mais de 90% dos casos assintomáticas, quando ocorrem em crianças e adultos imunocompetentes. Na grávida uma primoinfeção é a situação que apresenta maior risco para o recém-nascido. Durante a gravidez uma primoinfeção apresenta um risco de transmissão congénita de 40%, nos quais, aproximadamente, 1% dos bebés apresentam uma infeção grave/fatal e 10% sintomatologia leve. É de salientar que recém-nascidos assintomáticos, de mães que apresentaram infeção primária durante a gravidez, podem vir a desenvolver surdez e atraso mental a médio prazo. Na grávida, uma reativação viral possui um risco de transmissão quase nulo. Durante o parto e aleitamento, a transmissão do vírus está associada a situações menos graves, para o recém-nascido.

Rubéola

No que diz respeito ao vírus da Rubéola, para além do HIV e da Hepatite B, é, igualmente, recomendável o rastreio da Rubéola durante a gravidez. É um vírus de cadeia simples de ARN, do género *Rubivirus* (família *Togaviridae*). A transmissão ocorre através de gotículas de saliva e secreções nasais. Detém um período de incubação de 14- 21 dias (na maioria entre 16-18 dias). A doença é benigna, normalmente, assintomática ou com erupção máculo-papulosa (duração 3 dias). O grupo de risco integra imunocomprometidos e mulheres grávidas, sobretudo durante o primeiro trimestre. A presença de anticorpos rubéola IgG indica imunidade, nomeadamente, após vacinação (a imunidade adquirida dura cerca de 16 anos). Este teste deve ser realizado numa consulta pré-concepcional, de forma a avaliar a existência ou não de imunidade e o nível de proteção. Durante uma gravidez uma primoinfeção materna durante o primeiro trimestre, constitui um risco de anomalia fetal em 80-85% dos casos, havendo a possibilidade de aborto espontâneo. Este risco é menor numa infeção, após 20 semanas de gravidez. Neste caso, a probabilidade de malformação fetal é menor, mas há a possibilidade de o recém-nascido vir a desenvolver alterações neuro-sensoriais e surdez, sendo aconselhável o acompanhamento do bebé a longo prazo. Uma reinfeção sem sintomatologia, raramente, está associada à transmissão vertical. Caso a grávida não apresente imunidade documentada, deve ser determinado o título de IgG e IgM no primeiro trimestre e se o resultado não demonstrar existência de

imunidade, o teste deve ser repetido no segundo trimestre. O diagnóstico de infecção aguda efetua-se através da determinação de IgM e IgG contra o vírus da rubéola, associando, ou não, à determinação da avidéz da IgG.

Toxoplasma gondii

O *Toxoplasma gondii* é um parasita (protozoário intracelular) transmissível através da ingestão de carne crua/mal cozinhada e por contacto com fezes de gato. Possui um período de incubação 4- 10 dias. O rastreio de toxoplasmose é recomendável pela DGS, visto que as grávidas são suscetíveis a uma infecção severa. Pode haver transmissão materno-fetal em qualquer altura da gravidez. Uma infecção no primeiro trimestre está associada à existência de infecção congénita em cerca de 25% dos casos, dos quais 75% dos fetos infetados desenvolvem lesões severas. No segundo trimestre (54% de probabilidade de infecção congénita) e terceiro trimestre (60-70% de possibilidade de haver infecção congénita), a ocorrência de uma infecção está associada a um menor risco de lesão fetal. A determinação de IgG para toxoplasmose é útil para estabelecer o estado imunitário e para calcular a suscetibilidade de infecção. À semelhança da rubéola, grávidas sem imunidade devem efetuar a determinação IgM e IgG específicas no primeiro trimestre e repetir o teste no segundo trimestre. A avidéz forte de IgG indica que a infecção ocorreu há mais de 4 meses. A presença de IgM específica aponta para a existência de uma infecção aguda/recente (a IgM pode permanecer em circulação durante vários meses).

Sífilis

A Sífilis, causada pelo *Treponema pallidum* (subespécie pallidum) é uma bactéria espiral, causadora da sífilis. É transmissível por via sexual e vertical. A infecção numa grávida pode resultar em infecção congénita, morte fetal ou morte do recém-nascido. A severidade é dependente do estadio da gravidez, sendo mais grave no princípio da mesma, porque a bactéria afeta o desenvolvimento do sistema nervoso central. Ao contrário da transmissão sexual, a vertical pode ocorrer quando a infecção está latente. Segundo as recomendações da DGS, o rastreio de sífilis deve ser efetuado no primeiro e terceiro trimestre de gravidez, através do teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory). Caso o VDRL seja positivo, o diagnóstico deve ser confirmado por um teste treponémico

TPHA (T. pallidum haemagglutination assay) ou FTA-abs (fluorescent treponemal antibody absorption). O diagnóstico da infecção treponémica consiste na combinação da avaliação clínica com a detecção direta da bactéria e testes serológicos. Na infecção primária precoce, antes dos anticorpos serem detetáveis, a detecção direta da bactéria por microscopia e/ou PCR é, especialmente, útil. Contudo, nos restantes estadios da infecção, o diagnóstico laboratorial baseia-se na serologia. Os testes serológicos são classificados em testes treponémicos (detetam anticorpos treponémicos específicos) e não treponémicos (detetam anticorpos não específicos). Numa infecção, o anticorpo IgM treponémico surge após a segunda semana e o anticorpo IgG é detetável, aproximadamente, após 4 semanas. A serologia é aplicável não só no rastreio durante a gravidez, como também na triagem de doadores de sangue e órgãos, no auxílio do diagnóstico de doentes com suspeita de sífilis, na avaliação do estadio da infecção e na monitorização da terapêutica. O VDRL é um teste serológico não treponémico de aglutinação em lâmina para a determinação qualitativa de reagentes plasmáticos. O teste não deteta anticorpos treponémicos, mas sim anticorpos direcionados contra o próprio organismo (reagentes). Um teste positivo corresponde à observação microscópica de aglutinação.

4.4 Autoimunidade

As doenças autoimunes surgem devido à produção, pelo próprio organismo, de autoanticorpos ou células autoreativas, contra componentes do mesmo, como órgãos ou tecidos. Podem ser classificadas, como doenças sistémicas ou específicas de órgão, embora possa ocorrer uma sobreposição das duas situações. O laboratório tem um papel fundamental, desde o rastreio/despiste de uma suspeita, ao auxílio no diagnóstico deste tipo de doenças. As técnicas implementadas englobam a imunofluorescência direta, ELISA e imunoblot. A pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA), um exemplo do tipo de testes efetuados nesta área, cuja finalidade é a pesquisa de doenças autoimunes. É um teste de imunofluorescência direta, onde é possível fazer uma determinação qualitativa ou quantitativa, quanto à presença dos autoanticorpos. O teste utiliza células HEP-2, que permitem a detecção de autoanticorpos (das classes IgA, IgG e IgM) dirigidos contra os vários componentes nucleares. Existem vários subtipos de ANAs e a obtenção de um resultado positivo, implica a interpretação do padrão fluorescente. Neste caso, os padrões mais importantes são os nucleares homogêneos (existência de anticorpos dirigidos ao

ácido nucleico e histonas) e pontilhados (presença de anticorpos direcionados a proteínas nucleares, ribonucleoproteínas e centrómeros). Em células mitóticas é possível distinguir, com maior facilidade, autoanticorpos dirigidos a nucléolos e centrómeros. Um teste de *screening* positivo, implica a realização de testes complementares, a fim de confirmar a suspeita. Consoante o padrão de fluorescência obtido, pode-se proceder para os testes mais específicos, como os ENAs (Extractable Nuclear Antigens) e anti-dsDNA (ADN de hélice dupla). Estes autoanticorpos estão presentes em inúmeras doenças autoimunes, por exemplo, nas doenças reumáticas. Logo, são úteis no diagnóstico de doenças reumáticas inflamatórias, como a artrite reumatoide.

5. Microbiologia

A área da Microbiologia Clínica compreende a bacteriologia, micologia e a parasitologia. O laboratório realiza a análise de diversos produtos biológicos, sendo os mais frequentes as urinas assépticas, as coproculturas e os exsudados, sobretudo os vaginais. A área está organizada de modo a que o fluxo de trabalho cumpra, sempre que possível, o princípio de “marcha em frente”, reduzindo ao máximo o risco de contaminação cruzada. Assim sendo, a área encontra-se dividida em zonas específicas, nomeadamente triagem de amostras, processamento de produtos, identificação e antibiograma, avaliação de exames microbiológicos, parasitologia e citometria de fluxo (urinas).

5.1 Meios de Cultura

Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS)

O COS (meio não seletivo) contém uma mistura de peptonas, que torna o meio indicado para o crescimento de bactérias exigentes, como *Streptococcus* e *Listeria*, e sangue de carneiro que permite o crescimento da maior parte das espécies bacterianas e a visualização da hemólise, a qual é um critério fundamental para a orientação da identificação.

Gelose Mac Conkey (MCK)

O meio seletivo permite a diferenciação de enterobactérias. A gelose contém cristal violeta, que possibilita a demonstração da fermentação da lactose pela mudança da coloração do meio (vermelho neutro). Deste modo, as bactérias fermentadoras da lactose originam colónias vermelhas ou rosa, por vezes, contornadas por um halo de sais biliares.

Os microrganismos não fermentadores da lactose geram colónias incolores ou bege ténue. Os sais biliares, juntamente com o cristal violeta, inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas.

Gelose Chocolate Haemophilus (HAEM)

É um meio seletivo que permite, a partir de uma amostra polimicrobiana, o isolamento das diferentes espécies de Haemophilus. Contém uma base nutritiva, enriquecida em hemina e NAD (nicotinamida adenina dinucleótico), os quais advêm do PolyViteX e da hemoglobina. Inclui, igualmente, uma associação de antifúngicos e antibióticos, que inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e das leveduras, tornando o meio seletivo.

Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)

É um meio de isolamento, concebido para espécies com necessidades nutricionais exigentes, como a Neisseria, Streptococcus pneumoniae e Haemophilus. O isolamento de espécies exigentes é proporcionado pela adição de hemina e NAD, ao meio.

Gelose Chapman (MSA)

Destina-se ao isolamento de Staphylococcus. O meio contém manitol que permite distinguir as bactérias fermentadoras, das não fermentadoras, do manitol. As bactérias fermentadoras originam colónias amarelas (critério para a orientação da identificação de Staphylococcus aureus). O meio contém um elevado teor em cloreto de sódio que restringe o crescimento de alguns microrganismos.

Gelose Gardnerella (GAR)

É um meio de isolamento seletivo para a *Gardnerella vaginalis*. Contém antibióticos (inibem a maioria das leveduras e microrganismos) e sangue humano, que facilita o crescimento e possibilita a visualização da β -hemólise à volta das colónias, que quando obtida, em gelose de sangue humano, significa que existe uma elevada probabilidade de ser *G. vaginalis*.

Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Carneiro (SCS)

A gelose é um meio de isolamento, reservado à pesquisa de microrganismos estritamente anaeróbios e anaeróbios facultativos, em hemoculturas. O meio contém fatores de crescimento, como a hemina, extrato de levedura, vitamina K3 e sangue de carneiro. O desenvolvimento das espécies anaeróbias é favorecido pela adição de um agente redutor (L-cistina) e glucose altamente concentrada.

Gelose CLED (CLED)

Este meio de isolamento destina-se a amostras urinárias. A gelose permite a diferenciação dos microrganismos fermentadores da lactose (exemplo: *E. coli*) e impede o desenvolvimento de *Proteus*. As bactérias lactose positivas, através da acidificação do meio, geram colónias amarelas a amarelas-pálidas, enquanto os microrganismos não fermentadores da lactose originam colónias verdes, azuis ou incolores.

Gelose Hektoen (HEKT)

Destina-se ao isolamento seletivo e diferencial de *Salmonella* e *Shigella*, em coproculturas. O meio tem como princípio a fermentação, de um, dos três açúcares, incluídos no meio (lactose, sacarose e salicina). As colónias de interesse são verdes ou azuis-esverdeadas (não há acidificação do meio), já as restantes são amarelas-salmão ou amarelas (devido à acidificação do meio). O meio contém sais biliares e corantes (citrato de ferro amoniacal, azul de bromotimol e fuscina ácida) que inibem o desenvolvimento de

bactérias Gram positivas e limitam o crescimento de *Proteus*. O meio, também, contém hipossulfito de sódio, o que permite a distinção de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio (H₂S - reduzem o composto adicionado ao meio), através da formação de um centro negro, na colónia. Após a incubação, as colónias de *Salmonella* são verdes ou azuis-esverdeadas, com ou sem centro negro, enquanto as de *Shigella* são da mesma cor, mas sem centro negro.

Gelose Yersinia CN (YER)

Meio de isolamento seletivo de *Yersinia* (coproculturas). O meio contém cefsulodina, irgasan e novobiocina, responsáveis pela seletividade do meio. O irgasan (contém colato, desoxicolato, cristal violeta e antibióticos) inibe o desenvolvimento de bactérias Gram positivas e a maioria das bactérias Gram negativas. O manitol e o vermelho neutro, possibilitam a diferenciação da espécie pretendida, através da coloração. As colónias de *Yersinia* diferenciam-se das restantes bactérias, pela coloração rosa escuro a vermelho (devido à fermentação do manitol) ou, por vezes, incolor com centro colorido, e, ainda, podem apresentar um precipitado (à volta da colónia).

Sangue Desfibrinado de Carneiro ou Cavalo (Todd Hewitt Quilaban)

Meio de enriquecimento, adaptado ao crescimento de bactérias com necessidades nutricionais exigentes. Além de permitir o desenvolvimento de bactérias com um crescimento, ligeiramente mais lento, também permite a visualização da hemólise. Após a utilização do meio, a cultura é repicada para meios seletivos.

Caldo Selenito F

O caldo é um meio de enriquecimento que favorece o crescimento da *Salmonella* (em colheita de fezes). O caldo é constituído por peptonas de caseína, carne e lactose, que favorecem o crescimento das espécies bacterianas, sobretudo as de crescimento mais lento, como a *Salmonella*. Após o enriquecimento, a cultura é repicada para meios seletivos.

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)

Meio seletivo, indicado para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras. A presença de glicose e peptonas, favorece o crescimento de espécies fúngicas. A gentamicina e o cloranfenicol inibem a maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas e melhora a seletividade, em relação a algumas espécies que possam exibir resistência à gentamicina, como o *Streptococcus* e o *Proteus*.

Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro (CNA)

Indicado para o isolamento seletivo de espécies bacterianas exigentes (bactérias Gram positivas). O meio contém ácido nalidíxico e colimicina, que inibem a maioria dos Gram negativos e dos *Bacillus*. Permite a visualização da hemólise, devido à presença de sangue. Também contém uma mistura de peptonas adaptadas a bactérias exigentes, como a *Listeria* e *Streptococcus*.

Gelose Campylosel (CAM)

Utilizada no isolamento seletivo de *Campylobacter* intestinais, como *C. jejuni* e *C. coli* em coproculturas. O meio contém antibióticos, antifúngicos e sangue de carneiro, que facilitam o crescimento da espécie em causa. O *Campylobacter* cresce em colônias pequenas e cinzentas, ao longo das estrias da sementeira.

Gelose chromIDTM Strepto B (STRB)

Meio cromogénico seletivo para a deteção de *Streptococcus* do grupo B de Lancefield, nomeadamente *S. agalactiae*, em recém-nascidos e mulheres grávidas. É composta por uma mistura de peptonas, três substratos cromogénicos e antibióticos, que permitem a deteção de *S. agalactiae* (exibe uma coloração rosa-vermelho).

Meio de Lowenstein-Jensen (LJ-T)

Destina-se à cultura de micobactérias, como o *Mycobacterium tuberculosis*. É um meio de enriquecimento, constituído por ovo, asparagina e fécula, os quais beneficiam o crescimento de micobactérias. Após a incubação, o *M. tuberculosis* apresenta colónias com aspeto “couve-flor”.

Gelose chromIDTM CPS® (CPS)

É um meio cromogénico destinado ao isolamento e identificação de espécies bacterianas em colheitas urinárias. Possibilita a identificação direta de *Escherichia coli*, *Enterococcus*, KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*) e *Proteaeae*. O meio permite a contagem das bactérias (unidades formadoras de colónias - UFC), através da utilização de um método padronizado de sementeira. O meio é composto por uma base nutritiva (mistura de peptonas) e dois substratos cromogénicos, que revelam a respetiva atividade enzimática. A gelose também contém uma elevada concentração de agar, que delimita a invasão do meio pelo *Proteus*. Relativamente à identificação, as colónias de *E. coli* apresentam uma coloração rosa a vermelho escuro (ou translúcida com o centro rosa a vermelho escuro), enquanto os KESC exibem uma coloração verde azulado a azulado-cinza, *Enterococcus* turquesa e *Proteus* beije com um halo castanho. Utiliza-se o meio só para a identificação direta de *E. coli*.

Gelose chromIDTM Candida (CAN)

Meio cromogénico destinado ao isolamento seletivo de leveduras e à identificação direta de *Candida albicans*. Permite a identificação presuntiva de um conjunto de espécies, que incluem *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. Kefyr*. A *C. albicans* apresenta uma coloração azul, devido à hidrólise específica de um substrato cromogénico de hexosaminidase.

5.2 Colorações e Testes de Identificação

Coloração de Gram

É uma técnica de diferenciação microbiológica sobretudo utilizada para distinguir as bactérias Gram positivas das Gram negativas. Permite a determinação da morfologia celular, tamanho e disposição. É utilizada em produtos biológicos e em colónias provenientes dos meios de cultura, sendo, usualmente, o primeiro teste de diferenciação. Em alguns casos permite-nos a identificação presuntiva de um microrganismo ou a eliminação da hipótese de estar presente um determinado microrganismo. A técnica consiste em utilizar uma coloração primária com um corante básico (cristal violeta), após a fixação da amostra. Seguidamente, aplica-se uma solução contendo iodo (agente fixador - forma um complexo com o corante, permitindo o aumento da afinidade da célula para o mesmo). Depois, procede-se à descoloração com álcool (remove a coloração das bactérias Gram negativas). Por fim, aplica-se a safranina (corante básico) que cora as Gram negativas. As bactérias Gram positivas adquirem uma coloração púrpura, enquanto as Gram negativas obtêm uma coloração vermelho a rosa. A técnica baseia-se na diferença da constituição das paredes celulares entre as Gram negativas e as Gram positivas. O agente descorante (álcool) atua nos lípidos (extraí- os), tornando a parede mais porosa das Gram negativas e incapaz de reter o complexo cristal violeta/iodo. Contrariamente, as Gram positivas, devido ao facto de terem uma camada mais espessa de peptidoglicano e um maior número de cross-linking (devido aos ácidos teicóicos), retêm o complexo com uma maior eficácia, o que as torna menos suscetíveis à descoloração.

Coloração Álcool-ácido

Neste caso, utiliza-se o método de Kinyoun (uma variação da coloração de Ziehl-Neelson). É uma coloração diferencial, utilizada para identificar e quantificar Bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), na pesquisa de bactérias do género *Mycobacterium*. A técnica é útil no diagnóstico preliminar da tuberculose, tendo um valor preditivo superior a 90% em amostras de expectoração. Também, é útil para a monitorização da terapêutica antibiótica e para a determinação do grau de contagiosidade. O método baseia-se na

presença de ácido micólico na parede celular de bactérias álcool-ácido resistentes. Este componente da parede possibilita uma maior afinidade para a coloração e uma maior resistência à descoloração microbiológica, pelo tratamento com uma solução ácido-álcool. Primeiro, faz-se uma coloração com a carbolfucsina (composto fenólico e lipossolúvel, com a capacidade de penetrar na parede celular). Uma vez que o corante está concentrado e, também, devido à sua elevada lipossolubilidade, não é necessário aquecimento da preparação (utilizado no método de Ziehl-Neelsen), pois o corante entra, igualmente, para o interior da célula. Depois, procede-se à descoloração com uma solução ácido-álcool (remove a coloração de células não BAAR) e, por fim, aplica-se o azul de metileno (contraste). O fundo é corado de azul para facilitar a visualização dos BAAR, os quais apresentam uma coloração vermelha a púrpura e são os únicos que resistem à coloração álcool-ácido.

Teste da Catalase

Permite identificar a presença da enzima catalase. É utilizado na distinção dos *Staphylococcus* (catalase positiva), dos *Streptococcus* (catalase negativa), orientando a identificação definitiva. A enzima hidrolisa o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio (O_2). Verifica-se a realização da hidrólise pela libertação de oxigénio (há a formação de “pequenas bolhas”).

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Utiliza-se o Kit de identificação rápida Pastorex™ Staph-Plus. O teste contém partículas de látex (reagente) sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos, que permitem detetar os polissacarídeos capsulares de *S. aureus*, a proteína A (presente na parede celular) e, também, possui um fator de afinidade do fibrinogénio (igualmente, denominado de coagulase ligada ou fator de aglutinação). O teste permite detetar bactérias altamente capsuladas através dos anticorpos anti-capsulares, como também estirpes de *S. aureus* mal encapsuladas. As estirpes não encapsuladas são detetadas através do fibrinogénio e da IgG (sensibilizada para a proteína A). O reagente é adicionado a uma amostra proveniente de um isolamento e, caso haja aglutinação visível, o resultado indica a presença de *S. aureus*.

Teste da Oxidase

O teste rápido baseia-se na detecção da enzima intracelular oxidase. As bactérias que apresentam um sistema de transporte de elétrons (cadeia respiratória), designado citocromo oxidase, têm a capacidade de oxidar o citocromo, ao reduzir o oxigénio molecular (aceitador de elétrons da cadeia, em aeróbios). Desta forma, os recetores de elétrons da cadeia podem ser substituídos por substratos artificiais, onde a oxidação dos substratos pelo citocromo oxidase, na presença de oxigénio, produz um produto colorido. As bactérias oxidase positiva são aeróbias, mas tal não significa que sejam estritamente aeróbias, pois também podem ser oxidase negativa (quando não possuem citocromo oxidase). Se o resultado for positivo visualiza-se, em cerca de 10 a 30 segundos, após a adição do reagente oxidase (discos de papel), uma coloração entre o violeta e púrpura. Se o resultado for negativo há ausência de cor .

Utiliza-se o teste na identificação de bactérias Gram negativas, nomeadamente para distinguir as Pseudomonadeceae (oxidase positiva) das Enterobacteriaceae (oxidase negativa). O teste é, igualmente, útil na identificação das Neisseriaceae, pois são oxidase positiva.

Teste da Optoquina

Utiliza-se na identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*. Ao contrário das restantes espécies de *Streptococcus* α -hemolíticos, o *S. pneumoniae* é sensível à optoquina. O composto químico atua ao nível da membrana celular do *S. pneumoniae*, provocando a lise da membrana através da alteração da pressão osmótica. Inoculam-se no meio Columbia, colónias isoladas com α -hemólise sugestivas de *S. pneumoniae*. Coloca-se um disco de optoquina e incuba-se durante 18-24 horas. A formação de um halo de inibição ≥ 15 mm é sugestivo da presença de *S. pneumoniae*. Embora seja raro, pode existir estirpes de *S. pneumoniae* resistentes ao respetivo composto e, nesta situação, os halos são < 5 mm ou não há inibição.

5.3 Testes de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos (TSA)

O Teste de Sensibilidade aos Agentes Antimicrobianos deve ser realizado para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a suscetibilidade não puder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo.

Os critérios para a seleção dos agentes antimicrobianos utilizados e a valorização qualitativa dos seus resultados (sensível, intermédio ou resistente) baseiam-se nas recomendações publicadas pelo EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e pela Direção-Geral da Saúde (Norma 004/2013 - Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Agentes Antimicrobianos). A seleção dos AM e os resultados reportados são condicionados principalmente pelas características do microrganismo identificado e pela localização da infeção. Contudo, existem outros fatores importantes como a idade, o género, a situação clínica do doente e o seu estado fisiológico (exemplos: estado funcional do sistema imunitário e gravidez), para além dos resultados dos exames microbiológicos anteriores, a quimioterapia antimicrobiana efetuada e a resposta ao tratamento.

Os vários tipos de testes de suscetibilidade disponíveis podem-se classificar em dois grandes grupos: testes de diluição e testes de difusão.

O Método de Microdiluição em Meio Líquido é realizado no Vitek® 2 Systems a partir do isolamento de colónias de microrganismos com interesse clínico. O processo baseia-se na monitorização contínua da atividade *in vitro* de cada um dos agentes antimicrobianos presentes nas cartas (placa de microtitulação adequada para o microrganismo) em relação à estirpe bacteriana em estudo. Neste sistema analítico são realizados TSA de bacilos Gram negativos, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae*. O princípio das cartas de antibiograma assenta na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e efetua-se através de uma técnica de microdiluição. Cada carta contém uma combinação de fármacos específicos, adequados ao tipo de microrganismo que pretendemos analisar. Os resultados, facultados pelo equipamento, são reportados para cada fármaco, como “sensível”, “intermedio” ou “resistente”.

O Método de Difusão Kirby-Bauer Modificado é um dos mais utilizados na rotina para testar *in vitro*, a suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias de crescimento rápido e de alguns microrganismos exigentes. Esta metodologia permite obter um resultado qualitativo que se baseia na relação dos “breakpoints” das CMI com os níveis terapêuticos dos antimicrobianos atingidos no sangue nas infecções sistêmicas, ou ainda com níveis de antimicrobianos concentrado na urina para aqueles utilizados apenas em infecções do aparelho urinário. É aplicado na superfície de uma placa de gelose Mueller-Hinton um inóculo padronizado do microrganismo, onde se colocam discos impregnados de antimicrobianos. Após incubação, em geral durante 16-18 horas, são medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada disco. O tamanho do halo de inibição é inversamente proporcional à CMI e os resultados são reportados qualitativamente: sensível, intermédio ou resistente.

5.4 Produtos Biológicos

Urina

A infecção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Os agentes etiológicos mais frequentes, sem outras doenças associadas, são as Enterobacteriaceae com grande destaque para a *Escherichia coli*. No entanto podem ser encontrados para além das Enterobacteriaceae, outros microrganismos, nomeadamente *Enterococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativos e fungos (ex: *Candida albicans*).

A colheita da urina deverá ser obtida, após boa higiene ou desinfecção local, por micção (jato médio), saco de colheita (poe exemplo em crianças) ou cateterismo vesical transuretral (algália). As amostras de urina deverão ser semeadas até uma hora após a colheita ou, em caso de impossibilidade, deverão ser refrigeradas a 4°C e processadas até às 24h após a colheita. Em alternativa, a colheita pode ser efetuada para um recipiente estéril contendo ácido bórico, como conservante.

O exame direto é realizado para identificação e contagem dos elementos figurados presentes (células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos ou parasitas) e para a sua realização as amostras de urina são processadas inicialmente pelo citómetro de fluxo (UF-

1000i). Todas as amostras que apresentem uma leucocitúria $> 20/\mu\text{L}$, uma contagem de bactérias $> 400/\mu\text{L}$ ou ambas, ou de crianças com idade inferior a 7 anos são processadas, sendo realizado o exame cultural.

Para a realização do exame cultural as amostras são semeadas em meios de cultura CLED com uma ansa calibrada (10 μL) descartável. O meio é incubado em atmosfera de aerobiose a 35° C, durante 18 a 24 horas. A valorização dos resultados deverá ter em conta o método de colheita da urina, tipo de doente, sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultados de exames bacteriológicos anteriores. Quando existir crescimento de duas ou mais estirpes bacterianas devemos considerar que houve uma má técnica de colheita da urina, e por esse motivo, devemos requisitar uma nova amostra. Considera-se que uma contagem de colónias $\geq 10^5$ (100 000 UFC) é significativo de infeção urinária.

Exsudado Vaginal e Uretral

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infeções do aparelho genital depende do local de infeção e dos microrganismos. Algumas infeções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita. Nos exsudados vaginais deve ser efetuada pesquisa para *Trichomonas vaginalis* (exame direto a fresco), *Gardnerella vaginalis* (vaginose bacteriana - “clue cells” no exame a fresco), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae* - grupo B (mulheres grávidas entre a 35ª e 37ª semanas para despiste da colonização) e *Candida albicans*. Nos exsudados uretrais, em ambos os géneros, é realizada pesquisa para a presença de *Neisseria gonorrhoeae*.

A colheita do exsudado vaginal é realizada ao nível do colo do útero, endocolo e nas paredes vaginais com zaragatoa, após colocação do espéculo. A zaragatoa deverá ser colocada em meio de Stuart e manter à temperatura ambiente. A operação deverá ser repetida com uma segunda zaragatoa para a realização de esfregaços. O exsudado uretral deverá ser colhido, no mínimo, uma hora depois da última micção. Introduzir a zaragatoa com um movimento de rotação até cerca de 1 cm (género feminino) ou 2 cm (género masculino) dentro da uretra e colocar em meio de Stuart. A operação deverá ser repetida com uma segunda zaragatoa para a realização de esfregaços.

O exame direto é realizado com um exame a fresco, onde é feita uma avaliação do esfregaço quanto à presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e é observada a presença ou não de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes. Após coloração de Gram, deve ser observada e descrita a flora existente.

Para a realização do exame cultural dos exsudados vaginais e uretrais, as amostras são semeadas em meios de cultura Gelose de Sangue. Caso sejam identificadas clue cells no exame a fresco dos exsudados vaginais, é ainda utilizado um meio para *Gardnerella vaginalis*. Todas as amostras de exsudados vaginais são também semeadas em meio de Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol e para ambos os exsudados, vaginais e uretrais, é ainda utilizado o meio de gelose chocolate suplementado com polyvitex - VCAT. Para mulheres entre a 35ª e a 37ª semana de gravidez é semeado também um meio Strep B nos exsudados vaginais.

Exsudado Faríngeo

O aparelho respiratório superior tem caracteristicamente uma flora bacteriana comensal mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios. Vários agentes patogénicos tais como o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem ser isolados e constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis. Usado para a deteção de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A. Se solicitado, poderá ser efetuado para pesquisa de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* (despiste de portadores), *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*.

A colheita deverá ser realizada com uma zaragatoa, pela via oral, sem tocar nos lábios, na língua ou na úvula e deve obter-se uma amostra da orofaringe e das amígdalas. Também pode ser realizada pela via nasal, introduzindo a zaragatoa até sentir uma resistência compatível com a parede posterior da nasofaringe. De seguida, a amostra deverá ser introduzida em meio de Stuart para conservação e transporte.

Para a realização do exame cultural a amostra deverá ser semeada em meios de gelose de sangue, meio de Todd-Hewit suplementado com sangue (após 24h é realizada a sementeira num meio de gelose sangue para o isolamento e identificação dos

Streptococcus β -hemolítico do Grupo A), um meio Chapman para isolamento de *Staphylococcus spp.* e a identificação presuntiva de *S. aureus* e de um meio de Gelose Chocolate – *Haemophilus*. É usada serologia com teste de aglutinação com latex para identificação dos *Streptococcus pyogenes* (colónias pequenas com β -hemólise). A estirpe valorizada é isolada em cultura pura para ser identificada e determinado o TSA.

Exsudado Nasal

É um exame usado essencialmente para a deteção de portadores de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA).

A colheita deverá ser realizada através da inserção de uma zaragatoa em cada narina até encontrar resistência e rodar contra a mucosa nasal. A zaragatoa deverá ser colocada em meio Stuart.

Para realização do exame cultural, a amostra é semeada em meio de Chapman para isolamento de *Staphylococcus spp* e a identificação presuntiva de *S. aureus*. A estirpe valorizada é isolada em cultura pura para ser identificada e determinado o TSA incluindo a pesquisa de estirpes MRSA.

Expetoração e Secreções Brônquicas

O diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por microrganismos presentes na flora comensal da orofaringe e da cavidade oral durante a colheita.

A colheita deve ser, preferencialmente, a primeira expetoração da manhã em jejum provocada por tosse profunda. O utente deverá lavar a boca e gargarejar só com água antes de iniciar a colheita. As amostras devem ser colhidas em recipiente esterilizado, de boca larga de encerramento hermético.

O exame direto é realizado através da observação de esfregaços realizados a partir das porções purulentas ou das amostras. É efetuada a coloração de Gram e a partir da mesma é analisada a presença de células epiteliais pavimentosas e leucócitos.

Para a realização do exame cultural, as amostras são semeadas em meios de gelose de sangue, Gelose Chocolate – *Haemophilus* e de MacConkey utilizando o método dos quatro quadrantes. A valorização do crescimento bacteriano é efetuada em função da história clínica do doente, da observação do Gram e do microrganismo que a partir da 3ª zona de sementeira inclusive é predominante ou apresenta, no mínimo, ≥ 5 colónias. Os microrganismos responsáveis pelas infeções bronco-pulmonares mais prevalentes na comunidade são: *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Enterobacteriaceae* (exemplos: *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp* e *Enterobacter spp*), *S. aureus* e *Moraxella catarrhalis*.

Hemocultura

A grande maioria das doenças infecciosas podem decorrer com bacteriemia transitória, intermitente ou persistente (ex. endocardite). Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção. Geralmente, só é ponderada a valorização do isolamento de mais de uma estirpe microbiana em doentes imunocomprometidos. O isolamento de *Streptococcus* α -hemolíticos só se valoriza se for um *S. pneumoniae*, se estivermos perante uma endocardite ou endarterite, ou essa estirpe voltar a estar presente numa segunda hemocultura. Só se valorizam as estirpes de *Staphylococcus coagulase* negativas se os doentes tiverem material de prótese implantado.

A colheita do sangue para a hemocultura deve ser efetuada por punção venosa de qualquer das veias periféricas. A rolha de borracha do frasco deve ser desinfetada com álcool, o sangue deve ser aspirado e inoculado no frasco, sem mudar de agulha, não ultrapassando a proporção recomendada. São colhidas 3 hemoculturas em 24 horas, em veias periféricas diferentes e distribuídas ao longo do dia, no momento da subida da temperatura corporal (nunca no pico febril) ou imediatamente antes da administração do agente antimicrobiano se o doente estiver a fazer tratamento.

Para a realização do exame cultural são utilizados meios líquidos para aeróbios e para anaeróbios de sistemas automáticos. São também realizadas subculturas das hemoculturas positivas. Para aeróbios é utilizada gelose de sangue e para anaeróbios é utilizado o meio Schaedler com 5% de sangue de carneiro. São utilizados frascos de

hemocultura BacT/Alert FA Plus, adaptados ao sistema de detecção microbiana BacT/Alert 3D-60.

Coprocultura

As fezes são um produto biológico que caracteristicamente têm uma flora saprófita mista muito abundante. São consideradas indicações para coprocultura: diarreia sanguinolenta, febre, tenesmo, sintomas severos e persistentes, presença de leucócitos fecais e história de exposição a agentes bacterianos. No exame bacteriológico das fezes são pesquisados *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Quando solicitado são pesquisados *Campylobacter spp.*, *Yersinia spp.* e *Escherichia coli* enterohemorrágica.

A colheita das amostras deve ser realizada em dias diferentes e devem conter, aproximadamente, o tamanho de uma noz. A amostra deve ser entregue no laboratório tão rapidamente quanto possível, após a colheita.

Para a realização do exame cultural, a amostra é semeada em meio MacConkey, em meio de Hektoen e caldo de selenito F. No dia seguinte é semeado um meio de Hektoen a partir do caldo de selenito F. Caso seja pedida a pesquisa de *Campylobacter spp.*, a amostra é semeada em meio Campylosel; se for pedida a pesquisa de *Yersinia spp.*, a amostra é semeada em meio Yersinia – CYN; e de *Escherichia coli* enterohemorrágica é semeada em meio CPS.

6. Radioimunoensaio (RIA)

A área de RIA está confinada a um espaço laboratorial restrito, devido aos perigos radiológicos existentes durante a execução dos testes. É um método altamente específico, utilizado na quantificação de analitos de diversas naturezas. Devido às suas inúmeras desvantagens, como necessidade de licença da DGS, monitorização da radiação e trabalho manual, só é utilizada em parâmetros analíticos específicos em que não existam métodos alternativos para a sua determinação.

Esta área engloba as técnicas que utilizam radioatividade e as técnicas de alergologia com determinação de IgE total e específica, RAST (*radioallergosorbent test*).

Este tipo de ensaio utiliza isótopos radioativos de iodo como marcadores, sendo o ^{125}I o mais frequente.

6.1 Contador Gama Wallac – Wizzard 1470

O Contador de Raios Gama Wallac Wizard 1470 deteta e quantifica raios gama emitidos pelos isótopos radioativos. O equipamento é constituído por um cristal de iodeto de sódio, com um orifício para colocação das amostras. A absorção da radiação (fótons ^{125}I – isótopos radioativos emissores de raios gama) produz excitação e ionização, que por sua vez converte esta energia absorvida em luz visível ou ultravioleta que vai atingir fotomultiplicador. O tubo fotomultiplicador transforma as cintilações em impulsos elétricos que são medidos. Para a determinação de qualquer parâmetro, é necessária uma curva de calibração.

A intensidade da radiação gama emitida (sinal) é direta ou inversamente proporcional à concentração do analito presente na amostra, conforme o tipo de ensaio que for realizado. No radioimunoensaio competitivo existe uma competição entre um antígeno radioativo e não radioativo para um número fixo de locais de ligação a anticorpos. Neste caso, a quantidade de analito marcado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração do analito presente na amostra. O radioimunoensaio não competitivo é um ensaio imunoradiométrico baseado na separação em fase sólida revestida. O sinal detetado é diretamente proporcional à concentração do antígeno a analisar.

Desta forma, são doseados parâmetros como aldosterona, renina, testosterona livre, entre outros.

6.2 ImmunoCAP 250

O ImmunoCAP 250 é um equipamento totalmente automatizado que se baseia no método de ensaio imunofluorescenzimático (FEIA). A fase sólida consiste em polímeros de derivados de celulose contidos numa cápsula. O alérgeno de interesse, acoplado covalentemente ao ImmunoCAP (inseridos em canetas), reage com a imunoglobulina

respetiva, contida na amostra de soro do doente. Após lavagem, são adicionados anticorpos marcados por uma enzima para formarem complexo. Após incubação, o anticorpo não ligado marcado por enzima é lavado e o complexo ligado é incubado com o substrato que promove a emissão da fluorescência. No final da reação mede-se a fluorescência do eluído, sendo esta diretamente proporcional à concentração do analito específico presente na amostra do doente.

Os testes laboratoriais ImmunoCAP incluem uma grande variedade de ensaios para alergias e asma. Estes ensaios incluem testes que abrangem várias categorias, incluindo pólenes de gramíneas, ervas e árvores, microrganismos, ácaros, cães, gatos e outros animais com pelo, insetos, venenos de animais, alergénios alimentares, ECP (marcador celular de asma e inflamação), triptase (marcador de mastócitos). Para estes ensaios são determinados os níveis de IgE total, IgE específica, IgA específica, IgG específica e IgG4 específica.

7. Química Analítica

7.1 Cromatografia Líquida de Alta Definição (HPLC)

Na área da Química Analítica são aplicados diferentes tipos de metodologias, e uma delas é a Cromatografia Líquida de Alta Definição. Baseia-se na separação de uma mistura de compostos nos seus constituintes, utilizando uma fase líquida móvel sob pressão e uma fase estacionária. A separação baseia-se não só na relação entre a solubilidade dos solutos nas duas fases, mas também na sua interação com a fase estacionária. É uma técnica extremamente versátil devido à extensa variedade de mecanismos de separação, solvente, fases estacionárias e detetores que foram empregues. Um sistema automatizado de HPLC é constituído por uma bomba, um sistema de injeção automática (“auto-sampler”) ou manual, forno de colunas, detetor (eletroquímico, fluorescência, índice de refração ou UV/VIS) e um controlador do sistema.

O sistema de HPLC doseia parâmetros como catecolaminas, hidroxiprolina, metanefrinas, entre outros.

7.2 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-EM)

A cromatografia gasosa é uma técnica que permite a separação de substâncias voláteis arrastadas por um gás, através de uma fase estacionária. Esta fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido que propicia a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases. A fase móvel utilizada é normalmente um gás inerte (azoto, hélio ou argón) que transporta a amostra através da coluna. A separação dos solutos baseia-se em diferenças relativas nas suas pressões de vapor e na sua interação com a fase estacionária. É um método bastante utilizado devido à sua alta resolução, baixos limites de deteção, precisão e tempo analítico curto.

Os parâmetros determinados pelo método GC-EM são os ácidos orgânicos, a cocaína, os opiáceos, entre outros.

7.3 Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA)

A espectrofotometria é um processo de medição da intensidade da luz em função do comprimento de onda. A absorção atômica é uma técnica analítica de deteção qualitativa e determinação quantitativa de determinados elementos, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. A amostra é submetida a altas temperaturas, de forma a ser dissociada nos seus elementos. Quando a radiação incide num grupo de átomos livres, no seu estado fundamental, os átomos podem absorver essa radiação, passando para o estado excitado – Absorção Atômica. Através da medição da quantidade de radiação absorvida, pode determinar-se quantitativamente o elemento presente.

Os parâmetros determinados pelo método EAA incluem o chumbo, selénio, cobre, entre outros.

7.4 Espetroscopia de Infravermelho (IV)

Baseia-se na interação da radiação infravermelha com a configuração atómica dos grupos funcionais de determinadas moléculas, originando espectros de absorção que lhes são característicos. É a metodologia utilizada para determinar a composição química dos cálculos renais e biliares. É possível identificar a natureza do cálculo através da interpretação do espectro originado e respetiva comparação com uma biblioteca de espectros puros. Após a realização da análise macroscópica dos cálculos (peso e coloração), procede-se à realização de uma pastilha homogénea a partir da mistura brometo de potássio com o cálculo, onde esta é prensada e colocada no suporte para leitura do equipamento.

8. Fase Pós-Analítica

Após a colheita dos produtos biológicos e a sua respetiva análise, segue-se a fase pós-analítica. Esta fase compreende a interpretação e a validação dos resultados, iniciando-se após a obtenção de resultados válidos e terminando com a validação do boletim. Materializa-se na emissão do boletim de resultados, no qual a sua qualidade e conteúdo de informação deve merecer grande cuidado.

No processo pós-analítico, a função e responsabilidade do especialista é central e ainda mais predominante que nos restantes processos do laboratório, uma vez que deve existir exclusividade na validação biopatológica, no aconselhamento ao doente e na consultoria ao médico e outros prestadores de serviços de saúde.

Durante esta fase, o especialista deve assegurar a exatidão dos resultados dos exames laboratoriais no boletim, assegurar a confidencialidade de transmissão de resultados e definir atuação perante resultados anómalos ou inesperados. Deve ainda assegurar o aconselhamento ao doente na interpretação dos resultados laboratoriais e assegurar consultoria à comunidade prestadora de serviços de saúde, nomeadamente na seleção de exames laboratoriais (periodicidade e tipo de amostra), bem como na interpretação dos resultados. Por último, deverá garantir que o sistema informático seja

capaz de reproduzir o relatório e todos os dados originais, como valores de referência ou comentários.

O diretor técnico deve assegurar que os processos são sempre realizados por colaboradores qualificados em equipamentos aprovados, segundo métodos e procedimentos específicos e que é feita uma validação biopatológica final integradora para garantir a conformidade com as exigências do serviço prestado e evitar que qualquer deficiência se manifeste posteriormente, depois do serviço ter sido prestado.

No laboratório de análises clínicas o elemento fundamental da comunicação com o utente é o relatório de exames laboratoriais, também denominado boletim de análises. O diretor técnico deve elaborar, aprovar e rever periodicamente o formato dos relatórios de exames laboratoriais, sejam em suporte informático ou em papel.

Estes devem incluir a identificação do laboratório que emite e é responsável pelo relatório; a Identificação do diretor técnico; a identificação da unidade onde foi efetuada a colheita; a identificação do médico prescritor; a identificação inequívoca do doente, em todas as páginas do relatório; a data da colheita da amostra biológica; a data da emissão do relatório; a identificação clara e sem ambiguidades dos exames, resultados obtidos e, quando aplicável, as respetivas unidades de medição em unidades SI ou rastreáveis a unidades SI; a amostra biológica; os valores de referência biológica; e os comentários relativos à qualidade da amostra (como lipémica, hemolisada); o número da página em relação ao número total de páginas; a identificação e assinatura do especialista responsável pela validação do relatório.

A fase pós-analítica encerra o ciclo, referenciando de forma sintética no boletim os esforços de uma equipa especializada, diversos recursos e alta tecnologia, ambos utilizados para contribuir para a saúde, ou a minimização de danos para o utente.

9. Higiene e Segurança no Trabalho

Os laboratórios de análises clínicas são ambientes que trazem vários fatores de risco. Alguns exemplos desses perigos são as contaminações pelo uso ou manuseio de material biológico, solventes orgânicos e material cortante.

Segundo a legislação, o empregador deve assegurar ao trabalhador condições de segurança e saúde em todos os aspetos do seu trabalho e o empregador deve zelar, de forma continuada e permanente, pelo exercício da atividade em condições de segurança e de saúde para o trabalhador.

Os resíduos hospitalares, definidos como resíduos resultantes de atividades de prestação de cuidados de saúde a seres humanos ou animais nas áreas de prevenção, diagnóstico e tratamento, devem ser triados no local de produção para que possa existir uma gestão mais eficaz. Esta operação é a base de uma gestão integrada dos resíduos hospitalares, pois dela depende a redução dos riscos para a saúde e para o ambiente.

O despacho nº 242/96 de 13 de agosto, procede à classificação dos diversos resíduos hospitalares. Os resíduos hospitalares são classificados em 4 grupos: grupo I, grupo II, grupo III e grupo IV.

Os resíduos hospitalares do grupo I são resíduos equiparados a urbanos. Estes tipos de resíduos não necessitam de nenhum tratamento específico, devendo ser o seu acondicionamento efetuado em recipientes de cor preta. Deste grupo fazem parte os seguintes resíduos: resíduos provenientes dos serviços gerais, como por exemplo, resíduos de gabinetes, salas de reunião, salas de convívio, instalações sanitárias, vestiários, etc.; resíduos provenientes de serviços de apoio, como oficinas, jardins, armazéns, entre outros; embalagens e invólucros comuns, como o papel, cartão, mangas mistas e outros de natureza idêntica; resíduos provenientes da hotelaria resultantes da confeção e restos de alimentos servidos a doentes não incluídos no grupo III.

Os resíduos associados ao grupo II, são resíduos hospitalares não perigosos, ou seja, são aqueles resíduos que não estão sujeitos a tratamentos específicos, podendo ser equiparados a urbanos, sendo o seu acondicionamento efetuado em recipientes de cor preta. Neste grupo, são colocados os seguintes: material ortopédico como talas, gessos e ligaduras gessadas que não estejam contaminadas e também sem vestígios de sangue; fraldas e resguardos descartáveis não contaminados e sem vestígios de sangue; material de proteção individual que seja utilizado nos serviços gerais e de apoio, com única exceção do material utilizado na recolha de resíduos; embalagens de medicamentos vazias ou de outros produtos de uso clínico e ou comum, com exceção dos incluídos no grupo III e no grupo IV; frascos de soros não contaminados, com exceção dos do grupo IV.



Figura 4) Contentores para resíduos do grupo I e II. Adaptado de ACSS, 2008

Os resíduos hospitalares do grupo III, são resíduos que se encontram contaminados ou resíduos suspeitos de estarem contaminados, suscetíveis de incineração ou de outro pré-tratamento eficaz, permitindo posteriormente a eliminação como resíduo urbano. Os resíduos deste grupo, serão acondicionados em recipientes de cor branca, com identificação de risco biológico. Neste grupo, incluem-se: todos os resíduos que sejam provenientes de quartos ou enfermarias de doentes infecciosos ou suspeitos, de unidades de hemodiálise, de blocos operatórios, de salas de tratamento, de salas de autópsia e de anatomia patológica, de patologia clínica e de laboratórios de investigação, com exceção dos do grupo IV; todo o material utilizado em diálise; peças anatómicas não identificáveis; resíduos que resultam da administração de sangue e derivados; sistemas utilizados na administração de soros e medicamentos, com exceção dos do grupo IV; sacos coletores de fluídos orgânicos e respetivos sistemas; material ortopédico: talas, gessos e ligaduras gessadas contaminados ou com vestígios de sangue; material de prótese retirado a doentes; fraldas e resguardos descartáveis contaminados ou com vestígios de sangue; material de proteção individual utilizado em cuidados de saúde e serviços de apoio geral em que haja contacto com produtos contaminados (luvas, máscaras, aventais ou outros).



Figura 5) Contentor para resíduos do Grupo III. Adaptado de ACSS, 2008

Por último, destacamos os resíduos hospitalares do grupo IV. Os resíduos deste grupo, são resíduos hospitalares específicos, ou seja, são resíduos de vários tipos de incineração obrigatória. O acondicionamento destes resíduos, é efetuado em recipientes de cor vermelha, exceto materiais cortantes e perfurantes, que devem ser acondicionados em recipientes, contentores que sejam imperfuráveis. Neste grupo incluem-se os seguintes resíduos: peças anatómicas identificáveis, fetos e placentas, até publicação de legislação específica; cadáveres de animais de experiência laboratorial; materiais cortantes e perfurantes: agulhas, cateteres e todo o material invasivo; produtos químicos e fármacos rejeitados, quando não sujeitos a legislação específica; citostáticos e todo o material utilizado na sua manipulação e administração.



Figura 6) Contentor para resíduos do grupo IV. Adaptade de ACSS, 2008

Da atividade dos vários laboratórios existentes nas unidades de saúde, encontram-se resíduos líquidos perigosos (RLP) que são de diferentes composições, como por exemplo, os solventes não halogenados e solventes halogenados. Importa referir que as soluções ácidas, as soluções básicas, ácidos, bases, químicos reveladores e fixadores, soluções que possuem metais pesados, soluções com corantes e efluentes perigosos de equipamentos são também exemplos de RLP. Sempre que os RLP entrem em contacto com material biológico, são classificados como resíduos hospitalares do grupo IV (ACSS, 2008). Como já referido anteriormente, os resíduos hospitalares dos diferentes grupos, necessitam de ser armazenados em condições apropriadas e o mesmo acontece para os resíduos líquidos perigosos. Os RLP devem ser colocados imediatamente em contentores e separadamente, com o objetivo de evitar possíveis reações químicas. Os recipientes para o respetivo acondicionamento dos RLP, têm que ser resistentes, herméticos e devem possuir a correta identificação.



Figura 7) Recipientes com resíduos líquidos perigosos. Adaptado de ACSS, 2008

10. Controlo da Qualidade

10.1 Controlo Interno da Qualidade (CIQ)

O controlo interno da qualidade (CIQ) consiste num conjunto de procedimentos adotados num laboratório, com vista a permitir o controlo e a monitorização da qualidade dos resultados das análises, à medida que estas são executadas. É um processo estatístico capaz de assegurar a fiabilidade, consistência e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Assim sendo, tem como objetivo a deteção de anomalias, a avaliação de erros e a sua imediata correção.

No Laboratório Dr. Joaquim Chaves, cada área analítica possui o seu próprio plano de CIQ. Este é utilizado no arranque dos equipamentos, bem como durante o processamento das amostras dos utentes. Os controlos com valores conhecidos podem ser de origem comercial, fornecidos diretamente com os reagentes nos kits comerciais, ou por uma entidade especializada na produção dos mesmos. Sempre que possível, opta-se pela utilização de controlos comerciais.

Cada parâmetro possui os seus respetivos controlos que apresentam limites estabelecidos de especificação analítica, apresentando o erro máximo admissível. A especificação de qualidade analítica corresponde aos requisitos do processo analítico, que garantem a produção de resultados com um nível de qualidade pretendido. Os principais conceitos relacionados são a inexactidão (avalia o erro sistemático e é representado pelo BIAS, em percentagem) e a imprecisão (estima o erro aleatório e corresponde ao coeficiente de variação, expresso em percentagem). O laboratório utiliza o programa informático Unity Real Time (BioRad), que reúne os dados provenientes dos materiais de controlo utilizados, verificando a sua concordância com os limites do controlo e os limites de especificação analítica, definidos para cada parâmetro pelo laboratório, e, também, permite a comparação em tempo real dos dados obtidos com outros laboratórios, que utilizam o mesmo material de controlo. A partir dos resultados registados são elaboradas cartas de controlo, que permitem monitorizar a estabilidade do desempenho dos sistemas analíticos, onde é calculado a média, o desvio padrão, o BIAS, o coeficiente de variação e o Erro Total.

10.2 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A avaliação externa da qualidade (AEQ) tem como objetivo avaliar a harmonização dos resultados inter-laboratórios, inter-instrumento, e monitorizar o nível de desempenho geral do laboratório. Esta avaliação é retrospectiva e analisa amostras com valor desconhecido provenientes de uma entidade externa. Os programas de AEQ são selecionados em função da frequência de envio de amostras, número de participantes e equidade nos equipamentos utilizados por cada um. Deste modo permitem ao laboratório medir para cada parâmetro a sua capacidade de obter um resultado exato e compará-lo com outros laboratórios equipados com a mesma tecnologia e reagentes, valorizando

assim a exatidão do laboratório. O Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves participa nos programas UKNEQAS e PNAEQ (Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade) do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

Também para a AEQ o laboratório tem um plano que descreve o desempenho de cada área analítica para cada parâmetro. São analisados o ID (índice de desvio), que se deve situar abaixo de 3,0 nos programas que não modulam matematicamente os resultados de todos os participantes e de 2,0 para os que utilizam esta forma de tratar os resultados; quando estes limites e os dos valores do erro total máximo admissível adotado (ETa) em relação à BIAS são ultrapassados é desencadeado um processo de análise que visa corrigir a origem da falha.

Enquanto organização prestadora de serviços na área das análises clínicas, o laboratório Dr. Joaquim Chaves é uma entidade certificada, de acordo com os requisitos da Norma NP-EN-ISO 9001:2008, associada à Norma NP-EN-ISO-IEC-17025:2005 que define os requisitos gerais de competência para o laboratório de ensaio e calibração.

11. Conclusão e Perspetivas futuras

A realização do estágio no Laboratório Dr. Joaquim Chaves, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, foi uma mais-valia para o desenvolvimento da minha formação pessoal e profissional, uma vez que permitiu a consolidação de conhecimentos adquiridos durante o meu percurso académico e complementá-los com a prática clínica.

Considero que os objetivos do estágio foram atingidos, nomeadamente a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde, a aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho e a capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa.

São de destacar os aspetos mais importantes do estágio que realizei, a boa integração nas equipas de trabalho; os conhecimentos, a disponibilidade e simpatia dos profissionais de saúde com que contatei; o contato com os doentes, a exigência do trabalho, não só no que refere à quantidade e multiplicidade de tarefas realizadas diariamente, mas também no que diz respeito ao rigor e à qualidade que é exigida; e a enorme quantidade de conhecimentos e de “ferramentas” que são adquiridas em todo o percurso.

É ainda de referir que o Laboratório Dr. Joaquim Chaves realiza um grande volume de análises e abrange outras áreas analíticas, para além das referidas no presente relatório, existindo mais aspetos que poderiam ter sido discutidos. Assim sendo, optei por destacar apenas os principais parâmetros, procedimentos e equipamentos de ensaio das áreas referidas anteriormente.

12. Referências bibliográficas

1. Mcpherson RA, Pincus MR. HENRY ' S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22 nd. McPherson, Richard A.; Pincus MR, editor. Elsevier Saunders; 2011.
2. Miller WG, Jones GRD, Horowitz GL, Weykamp C. Proficiency Testing / External Quality Assessment : Current Challenges and Future Directions. 2011;57:1670–80.
3. Burtis,C.A.; Ashwood, E.R.; Bruns DE, editor. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. fifth. Elsevier Saunders; 2012.
4. Pimentel R. Marcadores bioquímicos de doença cardiovascular. Chaves CM e DDJ, editor. 2005.
5. Bain, B.J.; Bates, I.; M.A.; Laffa MA. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th Editi. 2011. 668 p.

Parte III

A infecção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos infetados com HIV

Resumo

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) está na origem da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e pode provocar a deterioração progressiva do sistema imunitário, potenciando o desenvolvimento de infeções oportunistas.

O HIV infeta células vitais no sistema imunitário, como os linfócitos T CD4⁺, os macrófagos e as células dendríticas. A infecção por HIV provoca a diminuição do número de linfócitos T CD4⁺, através de diversos mecanismos, incluindo a apoptose. Quando o número de linfócitos T CD4⁺ desce abaixo do limiar aceitável, o corpo perde a imunidade mediada por células e torna-se progressivamente mais suscetível a infeções oportunistas. Destas, a toxoplasmose parece ser uma das mais frequentes.

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que é encontrado nas fezes de gatos e outros felinos e que pode hospedar-se em humanos e outros animais. É causada pela ingestão de água ou alimentos contaminados e é uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo.

Os casos agudos são, geralmente, limitados e com baixas incidências. A fase aguda da infecção tem cura, mas o parasita persiste toda a vida do indivíduo e pode manifestar-se, ou não, em outros momentos e com diferentes tipos de sintomas. Na infecção crónica, a taxa de incidência é baixa até os cinco anos de idade e começa a aumentar a partir dos 20.

A toxoplasmose é a infecção mais frequente do sistema nervoso central, em indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), que não recebem profilaxia apropriada. Em indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose é, habitualmente, assintomática. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos (em fase de SIDA) o parasita pode ser reativado e causar doença, sobretudo quando as contagens de linfócitos TCD4⁺ são inferiores a 200 células/microlitro. Isto acontece em cerca de 30% destes indivíduos.

Palavras-chave: Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, HIV, Co-infecção

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a lentivirus that triggers the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and, in humans, it can cause the progressive deterioration of the immune system, allowing opportunistic infections to thrive.

HIV infects vital immune system cells, such as CD4⁺ T lymphocytes, macrophages and dendritic cells. HIV infection reduces the number of CD4⁺ T lymphocytes through several mechanisms, including apoptosis. When CD4⁺ T lymphocytes count reaches below an acceptable level, innate immunity is lost and susceptibility to opportunistic infections increases, namely toxoplasmosis, which is amongst the most frequent ones.

Toxoplasmosis is an infection caused by a protozoan named *Toxoplasma gondii*, found in cat and other feline's faeces and infect humans and other animals. It is caused by the ingestion of contaminated water or food and is one of the world's most common zoonosis.

Acute cases are typically limited and with low incidence. The infection's acute phase is curable, but the parasite remains throughout the individual's life and can be asymptomatic or manifest through different types of symptoms. Chronic infection has low incidence rate in individuals up to 5 years old and starts increasing from age 20.

Toxoplasmosis is the most frequent infection of the central nervous system in individuals with AIDS that do not receive appropriate prophylaxis. It is typically asymptomatic in immunocompetent individuals. However, it can be reactivated by the parasite in immunocompromised individuals with AIDS, particularly when CD4⁺ T lymphocyte counts are lower than 200 cells/microliter, which happens in around 30% of patients.

Key-words: toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, HIV, co-infection

Objetivos

A presente dissertação visa rever e analisar a situação epidemiológica da coinfeção por *Toxoplasma gondii* e HIV e em fase clínica de SIDA. Pretende-se também destacar as abordagens eficazes de prevenção, bem como rever os fármacos utilizados no tratamento e na profilaxia da coinfeção toxoplasmose/HIV.

Material e Métodos

Para a realização da presente monografia foi efetuada uma pesquisa de artigos científicos na base de dados *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). De modo a complementar a informação, foram ainda consultados alguns livros, de acordo com as temáticas abordadas: HIV e Toxoplasmose.

Foram de especial interesse fontes bibliográficas como o *Centers for Disease Control and Prevention* (www.cdc.gov), *World Health Organization* (www.who.gov) e Direção Geral de Saúde (<https://www.dgs.pt/>).

Toda a pesquisa bibliográfica foi realizada no período de janeiro a dezembro de 2019, com base nas seguintes palavras chave: HIV, Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii* e coinfeção.

1. Introdução

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus, reportado pela primeira vez no início da década de 1980. Pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e ao género *Lentivirus* e tem como característica o lento período de incubação e o longo período de infeção. [1]–[3], [4]

1.1.1 Epidemiologia

A origem do HIV foi identificada em África, sendo os chimpanzés a fonte da infeção em humanos. Acredita-se que estes animais estivessem infetados com o vírus da imunodeficiência em símios (SIV) e que com o passar dos anos tivessem ocorrido mutações que o transformaram em HIV, sendo este depois transmitido aos humanos. Esta transmissão poderá ter ocorrido através de refeições com carnes mal cozinhadas e de sangue infetado com o vírus. [1]–[3], [5]

Até à presente data, foram identificados dois tipos de HIV (1 e 2), que se distinguem entre si, sobretudo pelo tipo de patogenicidade e disseminação mundial. O HIV-1 é o mais patogénico, o mais disseminado pelo mundo e o que apresenta maior carga viral, enquanto que o HIV-2 apresenta um risco de contágio menor e restringe-se a uma área geográfica, maioritariamente no continente africano. [1]–[3], [4], [6]

Atualmente, a infeção por HIV continua a ser um problema de saúde pública em algumas partes do mundo, tendo já sido responsável pela perda de mais de 32 milhões de vidas. [5], [7]

Estima-se que em 2018, existiram cerca de 1.8 milhões de novos casos no mundo e que cerca de 37.9 milhões de pessoas viviam com HIV. Destes, 23.3 milhões estavam a receber terapia antirretroviral. No mesmo ano, 940 000 pessoas morreram com a

Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A África Subsaariana é a região do mundo mais afetada, contando com cerca de 66% de novos casos, no referido período. Outras regiões significativamente afetadas incluem-se na Ásia e no Pacífico, na América latina e Caraíbas e na Europa ocidental. (Fig. 8) [5], [7]

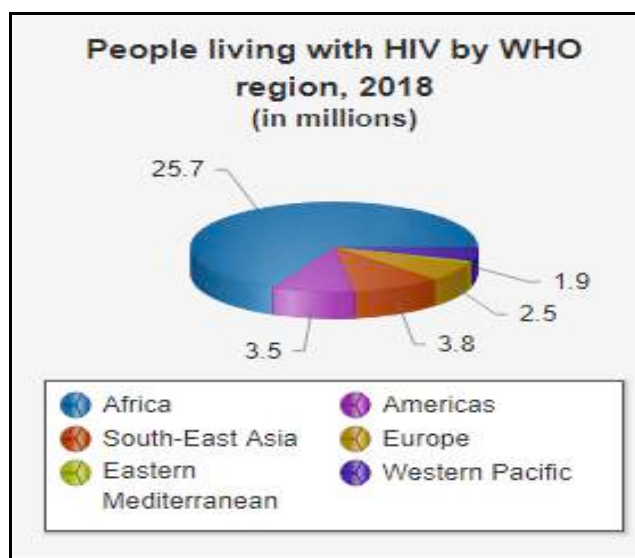


Figura 8) Pessoas que vivem com HIV por região, 2018. Adaptado de [5]

Devido aos esforços que foram realizados por diversas organizações, as taxas de prevalência da SIDA têm vindo a estabilizar nos últimos anos. Os dados relativos à presença do HIV incluem o somatório do registo de infeções quer pelo HIV-1 quer pelo HIV-2, uma vez que os testes utilizados para diagnóstico detetam ambos os tipos virais. No entanto, a classificação serológica permitiu verificar que as infeções pelo HIV-2 estavam restritas a apenas alguns locais, sobretudo no continente africano, tais como Angola, Cabo Verde e Moçambique, podendo também ser identificadas em outros países desde que exista a mobilidade do vírus através de indivíduos infetados, como acontece no Brasil. [1], [5], [7]

Em Portugal, os primeiros casos de infeção com HIV datam de 1983 e ao longo destes últimos 35 anos existiram diversas alterações em termos médicos, sociais e culturais. Foram notificados cerca de 57 574 casos e destes, 22 028 atingiram o estadió de SIDA e para 14 500 foi notificado o óbito (Fig. 9). De acordo com os dados estatísticos, em 2017 foram notificados 886 novos casos de infeção. À semelhança do que aconteceu

em anos anteriores, a transmissão por contacto heterossexual mantém-se a mais frequente (60,6%) seguida pela transmissão por relações sexuais entre homens (36,9%). [8]

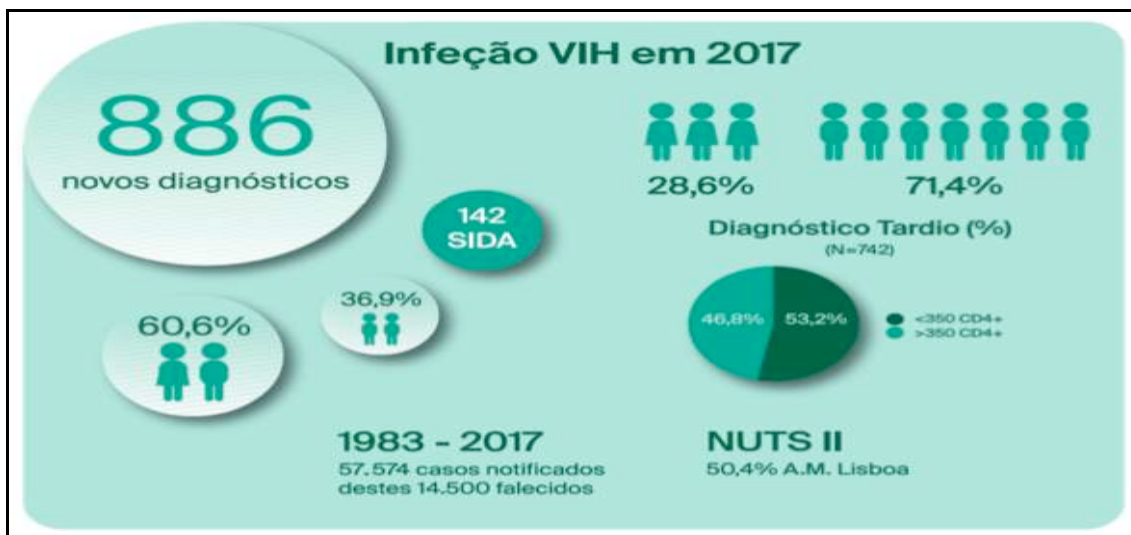


Figura 9) Infeção por HIV em 2017. Adaptado de [8]

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dados mais recentes demonstram que em Portugal, no ano de 2018, existem cerca de 41 000 pessoas que vivem com HIV. No mesmo ano, foram notificados cerca de 740 novos casos e o número de mortes devido a infeção por HIV ou em fase de SIDA é inferior a 500. Estima-se ainda que o número de indivíduos infetados que se encontram a receber terapêutica antirretroviral é de 37 200, o que corresponde a cerca de 90%. [5]

A SIDA é uma doença crónica e as diretrizes de tratamento exigem que os indivíduos infetados compareçam no serviço especializado no mínimo uma vez por mês, o que resulta num volume enorme de dados longitudinais para monitorizar a evolução da doença e o tratamento. A avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+ e da carga viral regularmente, a garantia da adesão ao tratamento e a monitorização dos efeitos colaterais provocados pelos medicamentos, são componentes essenciais dos cuidados que devem ser garantidos a estes indivíduos infetados. [9]

1.1.2 Estrutura

A partícula viral do HIV mede cerca de 100 a 120 nm de diâmetro e é constituída por um invólucro glicoproteico, derivado da célula infectada da qual o vírus saiu. Neste invólucro estão inseridas as glicoproteínas de superfície (gp120) e as transmembranares (gp41) e, por baixo do mesmo, encontra-se a matriz do vírus que envolve a cápside formada pela proteína p24. A cápside protege o material genético. (Fig. 10) [4]

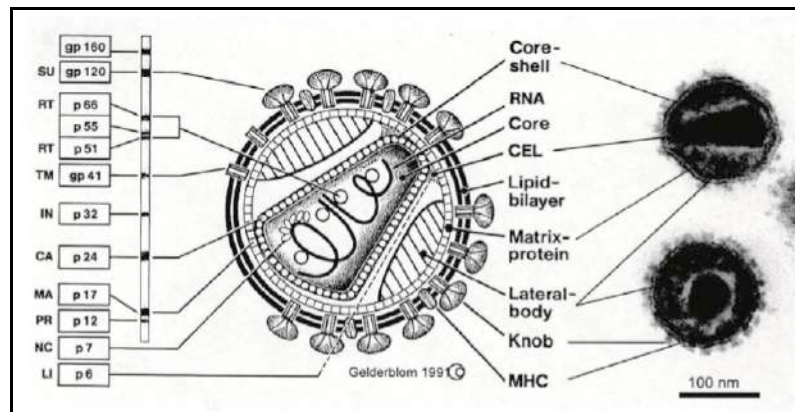


Figura 10) Visão esquemática da partícula de HIV por micrografia eletrônica (direita) e bandas de imunoblot (esquerda). Gp = Glicoproteína; p = proteínas; SU = Proteína de Superfície; TM = Proteína Transmembranar; RT = Transcriptase Reversa; IN = Integrase; CA = Proteína da Cápside; MA = Proteína da Matriz; PR = Protease; NC = Proteína de Ligação a ácido nucleico; LI = Proteína de Ligação; MHC (Complexo Major de Histocompatibilidade) são Antígenos HLA. Adaptado de [4]

O genoma do HIV é constituído por duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples e de polaridade positiva (RNA⁺). Estas cadeias não servem como molde para síntese de proteínas virais, devendo ser primeiramente transcritas pela transcriptase reversa (TR) em ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadeia dupla. Este, será integrado no genoma da célula hospedeira, para que possa haver a transcrição do DNA proviral e tradução nas diferentes proteínas virais. Existem 3 genes que codificam para proteínas estruturais: Gag, Pol e Env. O gene *gag* codifica para a proteína da cápside (p24), proteína da matriz (p17) e proteína da cápside (p7). O gene *pol* codifica para protease (p10), transcriptase reversa (p51) e integrase (p32). O gene *env* codifica para a glicoproteína de superfície (gp120) e transmembranar (gp41). [4]

As diferenças fundamentais entre o HIV-1 e o HIV-2 residem no material genético de ambos, que difere em cerca de 55%. O HIV-2 codifica para a proteína acessória Vpx, (do Inglês, *Viral Protein X*), enquanto que o HIV-1 codifica para a Vpu (do Inglês,

Viral Protein U). Diferem ainda no mecanismo da patogénese retroviral, que não é inteiramente claro ainda, pelo que os testes mais específicos para detetar um destes vírus não detetarão o outro. [1], [10], [4]

O HIV-1 e o HIV-2 têm muitas semelhanças, tais como a forma de replicação celular, a transmissão e os efeitos clínicos, conduzindo ambos à SIDA. Contudo, com o HIV-2 a progressão da doença faz-se de uma forma mais lenta. Os indivíduos infectados por HIV-2 permanecerem, na maior parte dos casos, como não evolutivos durante um longo período de tempo, contrariamente aos contaminados com HIV-1 que evoluem mais rapidamente. Se houver progressão, o processo patológico para ambos os vírus é idêntico, embora o HIV-2 apresente contagens de células T CD4+ mais altas e cargas virais mais baixas. No entanto, a resposta imune do indivíduo é mais protetora no caso da infeção pelo HIV-2, o que retarda a progressão da doença. [1], [10]

O HIV-1 e o HIV-2 compreendem vários grupos e subtipos. O HIV-1 apresenta o grupo M (subdividido em subtipos geneticamente distintos: A, B, C, D, F, G, H, J e K), o grupo N, o grupo O e o grupo P. O grupo M é o maior responsável pela propagação da SIDA no mundo inteiro. O subtipo B do HIV é o dominante e é encontrado nas Américas, Austrália, e Europa ocidental, pelo que a pesquisa clínica sobre o HIV é focada neste subtipo e nestas populações. O padrão da distribuição dos subtipos através do globo tem vindo a ser alterado devido à mistura da população e à migração. [4], [6], [11]

Os dois subtipos principais de HIV-2, que são responsáveis pela epidemia são o A e o B, embora no total haja 8 subtipos HIV-2 identificados até agora. As infeções do grupo A do HIV-2 ocorrem, maioritariamente, na África ocidental, embora alguns casos tenham sido relatados no Brasil, na Europa, nos EUA e na Índia. As infeções pelo grupo B do HIV-2 ocorrem praticamente só na África ocidental. [10]

1.1.3 Ciclo de Replicação/Transmissão

O ciclo de replicação do HIV, ou biossíntese viral, pode ser dividido em 5 etapas principais (Fig. 11):

(i) Adsorção, fusão e penetração; (ii) Transcrição reversa e integração proviral; (iii) Transcrição genómica do DNA do HIV; (iv) *Splicing* do mRNA do HIV; (v) Integração, libertação e maturação viral. [1], [11]

A primeira etapa inicia-se com o contacto inicial da partícula viral com a célula alvo, através da ligação da proteína de superfície gp120 (no caso do HIV-1) com o recetor CD4 das células T, dos macrófagos e das células dendríticas. A proteína de superfície gp120 e a proteína transmembrana gp41 permanecem associadas por uma ligação não covalente. A glicoproteína gp120 permite, desta forma, a ligação viral aos recetores CD4 e a gp41 está envolvida na fusão entre o invólucro viral e a membrana da célula hospedeira. [11]

Após ligação ao CD4, a gp120 sofre alterações conformacionais que levam à exposição do local de ligação ao coreceptor. Os recetores mediadores mais comuns da entrada do HIV-1 *in vitro* são o CCR5 e CXCR4. Este processo de fusão viral pode ocorrer através de um mecanismo de fusão direta com a membrana plasmática ou de um processo de endocitose e fusão com endossomas. [11]

Após a fusão, a cápside entra no citoplasma e o RNA viral é convertido em DNA de cadeia dupla, sendo esta reação mediada pela TR. O resultado é uma réplica de DNA de cadeia dupla do RNA genómico original. Este DNA penetra no núcleo da célula hospedeira através dos poros da membrana nuclear. A enzima integrase, permite a inserção do DNA viral no DNA cromossómico da célula hospedeira. Nas células ativadas, este DNA proviral é transcrito atuando como modelo para a síntese de mRNA. [1], [11]

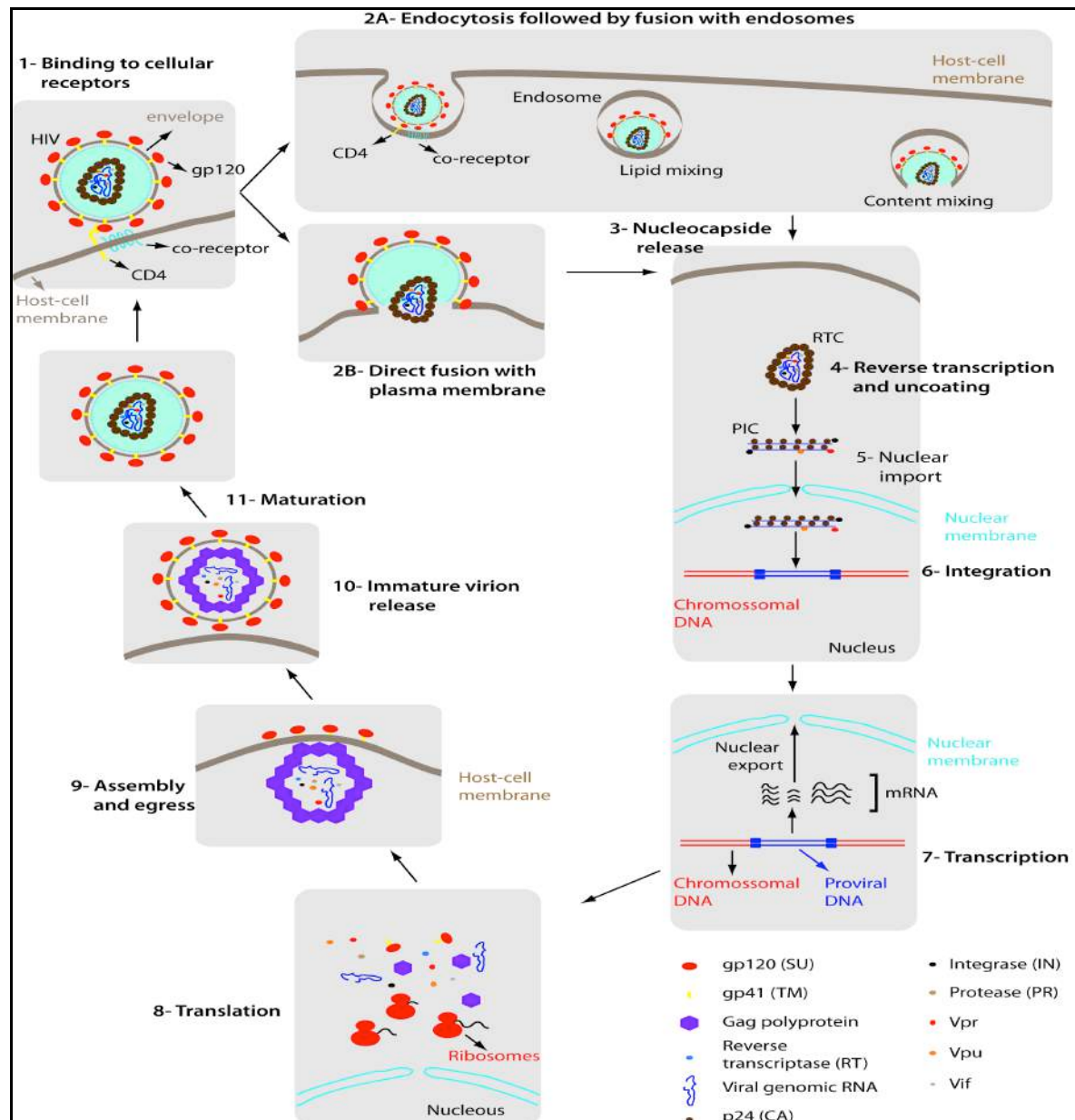


Figura 11) Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). (1) O HIV inicia a infecção ligando-se aos recetores celulares CD4 e a uma quimiocina. (2) As interações entre os recetores desencadeiam a fusão entre o invólucro viral e a membrana celular após endocitose (2A) ou por fusão direta com a membrana plasmática (2B). (3) A libertação da nucleocápside no citoplasma precede a formação do complexo da transcriptase reversa, onde ocorre a transcrição reversa (4). Componentes celulares e virais são transportados para o núcleo e o DNA viral é integrado ao DNA cromossômico celular (5 e 6). O DNA proviral é transcrito (7) e o mRNA migra para o citoplasma e é traduzido para proteínas virais (8). A montagem de diferentes proteínas virais ocorre na membrana plasmática (9). Após saída e libertação dos viriões imaturos (10) ocorre a clivagem proteolítica da poliproteína Gag, levando à produção de viriões maduros (11). Adaptado de [11]

Após replicação, transcrição e tradução o genoma viral está pronto para a etapa final, a montagem viral, libertação e maturação dos viriões formados. A nucleocápside ocorre através da interação proteína-proteína, mediada pela proteína Gag. A montagem da partícula do vírus, cujas etapas finais ocorrem na membrana plasmática é regulada pelas proteínas Vpu e Vif que desempenham um papel importante na montagem do vírus. Na membrana celular, os vírus imaturos são libertados e o vírus maduro é agora capaz de infectar outras células. [1], [11]

O HIV pode ser transmitido através de atividades específicas como relações sexuais desprotegidas, exposição a sangue contaminado ou de mãe para filho. Apenas alguns fluídos corporais podem transmitir o HIV, sendo estes o sangue, o sémen, os fluidos vaginais e o leite materno. Para que a transmissão ocorra, estes fluídos devem entrar em contacto com uma membrana mucosa ou um tecido danificado ou ser diretamente injetados na corrente sanguínea. [1], [7]

1.1.4 Manifestações clínicas

A infecção pelo HIV gera uma doença crónica caracterizada pela diminuição dos linfócitos T CD4⁺ e pela disfunção imunológica, tornando-se o indivíduo suscetível a infecções oportunistas e a uma maior morbilidade e mortalidade causadas pelas mais distintas infecções. [1], [7], [4], [6]

A infecção pelo HIV pode levar à SIDA se não for tratada e, ao contrário do que acontece com outros vírus, o organismo humano não o consegue eliminar, mesmo com medicação. Desta forma, a história natural da infecção pode ser descrita em 3 fases: fase aguda ou infecção primária, fase persistente ou crónica, e SIDA. Os marcadores que definem essas etapas são a contagem de linfócitos T CD4⁺, a carga viral e a presença ou não de manifestações clínicas. [1], [7] (Fig. 12)

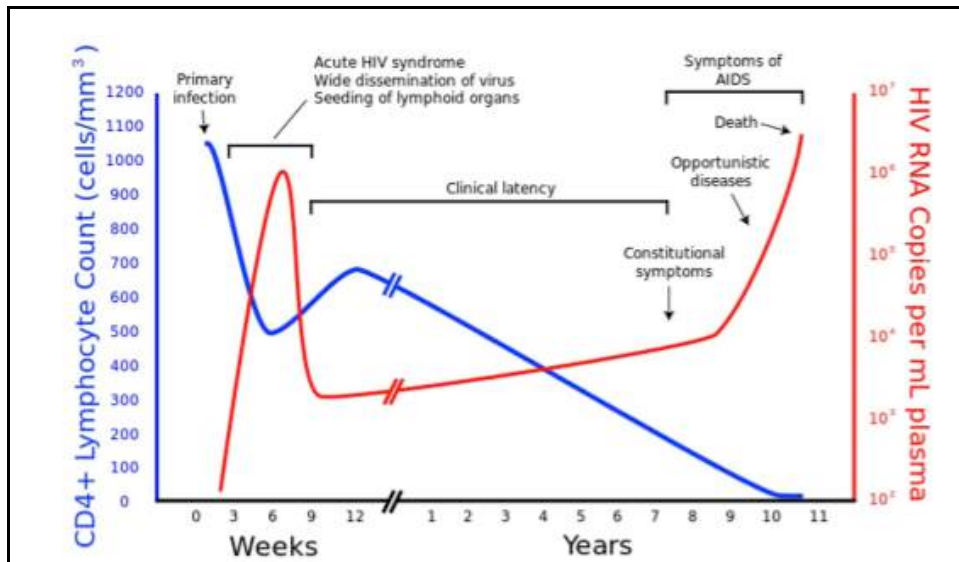


Figura 12) Fases da infecção pelo HIV. Adaptado de [6]

A primeira fase é caracterizada por uma infecção aguda pelo HIV, que ocorrem nas primeiras semanas de infecção. Nesta fase, existe uma replicação intensa do vírus, aumentando a carga viral e diminuindo consequentemente, os linfócitos T CD4+ circulantes. A contagem destes linfócitos será igual ou superior a 500 células/ μ l. O indivíduo pode, ou não, apresentar sintomatologia clínica. Cerca de 50-90% dos indivíduos apresentam um conjunto de sintomas designados por síndrome retroviral aguda, cujo início ocorre entre 2 a 4 semanas após a exposição viral. Os sintomas são inespecíficos e assemelham-se a manifestações gripais, incluindo febre alta, linfadenopatias, mal-estar, perda de apetite, náuseas, vômitos, perda de peso, depressão, úlceras na pele, boca e genitais, dores nos músculos e articulações, hepatoesplenomegália, meningoencefalite, entre outros. Os anticorpos são detetáveis a partir de 2 a 4 semanas de infecção. Uma vez que a carga viral está elevada nesta fase, a probabilidade de transmissão da doença também é elevada. [1], [7]

Na segunda fase da infecção pelo HIV ocorre a latência clínica. Este período é caracterizado por uma infecção crônica, por vezes assintomática e por ter valores de linfócitos T CD4+ entre as 200 e as 499 células/ μ l. É nesta fase que é decisiva a progressão da doença através da adesão, ou não, à terapêutica. Para indivíduos que não iniciam terapêutica para infecção com HIV, este período pode durar uma década ou mais. No entanto, aqueles que iniciam terapêutica, poderão permanecer nesta fase durante vários

anos. No final desta fase, a carga viral começa a aumentar e a contagem dos linfócitos T CD4+ começa a diminuir. [1], [7]

A terceira fase é chamada de SIDA e é a mais severa da infecção pelo HIV. É caracterizada pela diminuição maciça do número de linfócitos T CD4+, podendo ocorrer contagens de células inferiores a 200/ μ l, altos níveis de vírus circulante e aparecimento de manifestações clínicas características de imunodeficiência, tais como as infeções oportunistas. À medida que a infecção progride, a resposta às infeções bacterianas torna-se atípica, aumentando o tempo de resposta à antibioterapia, podendo haver reativação de infeções anteriores podendo o doente apresentar fadiga, diarreia crónica e lesões orais. [1], [7]

1.1.5 Diagnóstico Laboratorial

A única forma de saber se um indivíduo está infetado com HIV é através de resultados de testes laboratoriais, que permitirão a realização de um diagnóstico. É recomendado que todos os indivíduos entre os 18 e 64 anos de idade façam o teste, como cuidado de saúde de rotina. [7], [12]

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), independentemente da idade, o rastreio deve ser efetuado em utentes a quem foi diagnosticada uma infeção sexualmente transmissível, parceiros sexuais de homens e mulheres a quem foi diagnosticada infeção por HIV, homens que tiveram sexo com outros homens, mulheres parceiras de homens que tiveram sexo com outros homens, pessoas com história de utilização de estupefacientes endovenosos, reclusos, populações nómadas e sem abrigo. [12]

O rastreio deve ser efetuado por rotina em grávidas, crianças nascidas de mães que recusaram a realização do teste durante o período pré-natal, dadores de sangue, utentes em diálise e dadores e recetores de órgãos transplantados. Alguns grupos deverão realizar o teste com periodicidade definida, sendo estes: pessoas com teste HIV negativo durante o período de janela imunológica, pessoas com teste HIV indeterminado, utilizadores de drogas endovenosas, trabalhadores do sexo e “sem-abrigo”. [12]

São indicados os testes serológicos de 4ª geração, onde pesquisam em simultâneo os anticorpos anti-HIV1 e anti-HIV2 e o antigénio p24, uma vez que estes métodos apresentam uma excelente sensibilidade e especificidade. Se reativo, o teste deve ser

repetido em duplicado. Se pelo menos um destes for reativo, deve ser efetuado um teste rápido serológico de discriminação HIV-1/HIV-2:

- Reportar como HIV-1 positivo, se o teste HIV-1 reativo e HIV-2 não reativo;
- Reportar como HIV-2 positivo, se o teste HIV-1 não reativo e HIV-2 reativo;
- Reportar como HIV positivo se o teste HIV-1 reativo e o teste HIV-2 reativo, e enviar amostra de sangue para laboratório de referência;
- Se teste HIV-1 não reativo e teste HIV-2 não reativo ou inconclusivo, deve ser efetuado teste de ácidos nucleicos para RNA do HIV-1;
- Se nenhum deles for reativo, reportar como HIV-negativo. (Fig. 13) [12]

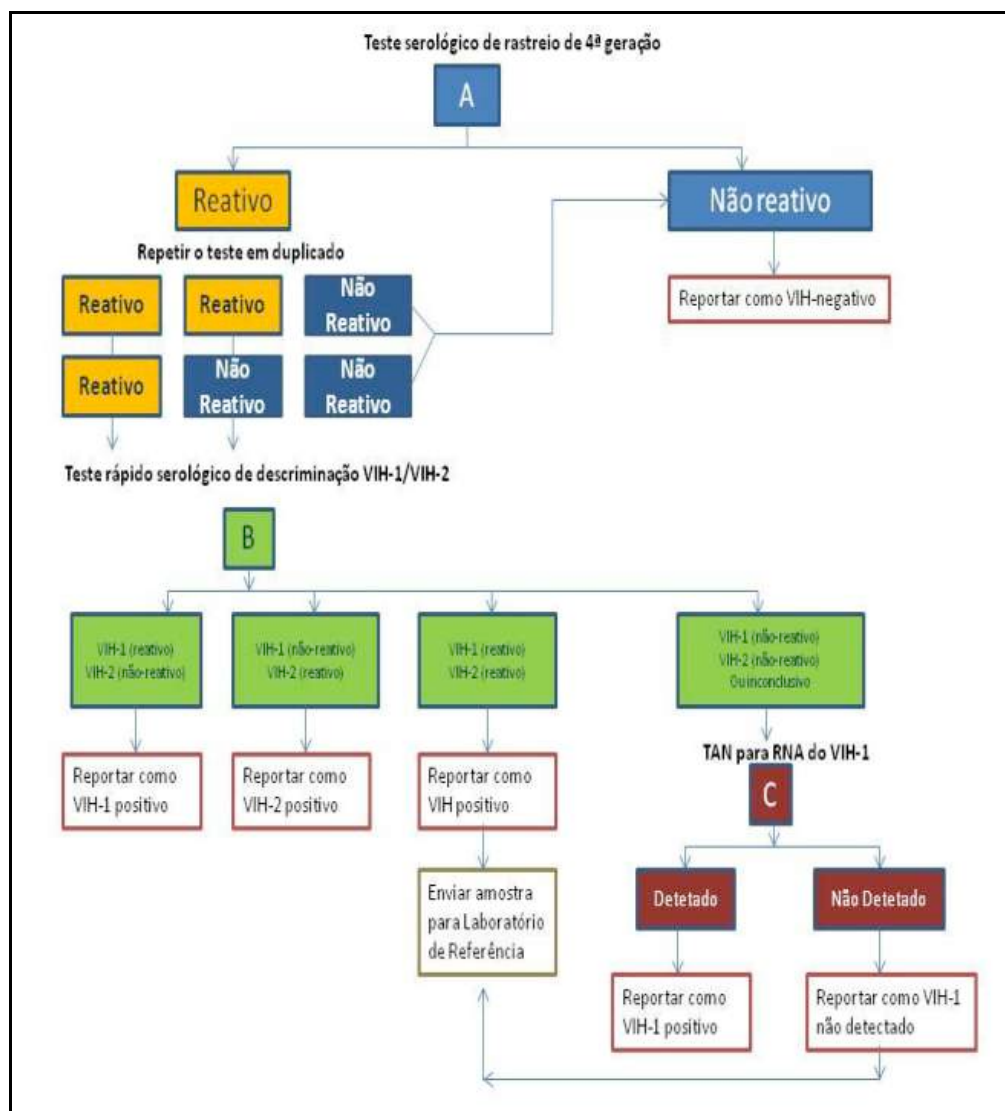


Figura 13) Algoritmo clínico do diagnóstico laboratorial da infecção por HIV. Adaptado de [12]

O diagnóstico da infecção por HIV é baseado na detecção de anticorpos específicos, antígenos ou ambos, e para isso, estão disponíveis vários kits comerciais. O RNA viral pode ser detetado no sangue através de testes de ácidos nucleicos (NAT). Para diagnóstico primário da infecção por HIV podem ser usados testes de *screening* de pesquisa de anticorpos, seguido de um teste confirmatório em caso de um resultado reativo no teste anterior. Atualmente, existem os seguintes testes disponíveis: [4], [13]

1) Os testes rápidos são imunoensaios simples, com um resultado obtido até 30 minutos, em ambiente não laboratorial e com amostra de sangue total ou amostra de fluido oral. Os testes mais frequentemente utilizados são os que recorrem à imunocromatografia. Estes tipos de testes surgem como ferramentas importantes para vigilância, *screening* e diagnóstico. As duas limitações destes testes são a detecção da infecção durante a fase de infecção primária, quando os anticorpos ainda estão ausentes, bem como em crianças com menos de 18 meses que podem conter anticorpos maternos. [14], [4], [13]

2) Os testes imunológicos de reação Ag/Ac detetam antígeno e anticorpo anti-HIV. Os anticorpos são produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro, após contactar com o vírus. Os antígenos são as proteínas externas que induzem a ativação do sistema imunológico. Na infecção pelo HIV, o Ag p24 é produzido antes do desenvolvimento de anticorpos. Estes, são os testes recomendados para os laboratórios e alguns são de execução rápida. A maioria dos testes rápidos são de detecção de anticorpos. Estes, procuram os anticorpos no sangue ou no fluido oral, sendo o do sangue mais rápido na detecção. Se o primeiro teste realizado para detecção de HIV tiver um resultado positivo, deverá ser confirmado. [7] Atualmente, os testes mais frequentemente utilizados para diagnóstico da infecção por HIV são baseados em imunoensaios. Nas últimas décadas foram desenvolvidas 4 gerações destes testes, definidas de acordo com a evolução das metodologias utilizadas. [14]

Os ensaios de primeira geração são caracterizados pelo seu formato indireto, no qual a presença de anticorpos específicos é detetada por Ac anti-IgG humana. São ensaios pouco específicos e, pelo facto de detetarem apenas IgG, também são menos sensíveis do que os ensaios de gerações posteriores, pelo que já deixaram de ser utilizados na rotina diagnóstica dos laboratórios. [14]

Os ensaios de segunda geração também têm um formato indireto, no entanto são mais sensíveis e específicos, por conterem uma maior concentração de proteínas (epítopos imunodominantes) relevantes. [14]

Os ensaios de terceira geração têm o formato *sandwich*, no qual são utilizados antígenos recombinantes ou péptidos sintéticos, tanto na fase sólida como na fase do conjugado. Desta forma, permitem a detecção simultânea de Acs anti HIV tipo IgG e IgM. A detecção de anticorpos do tipo IgM torna este ensaio mais sensível do que os das gerações anteriores. Há, também, aumento da especificidade pois o conjugado (Ag) liga-se apenas à valência livre do anticorpo que está no complexo imune. [14]

Os testes de quarta geração detetam simultaneamente o Ag p24 e anticorpos específicos do HIV. Para detecção dos anticorpos, é utilizado o formato *sandwich* e para detecção de Ag p24 é usado um anticorpo monoclonal na fase sólida e um conjugado constituído por um anticorpo poliespcifico anti-p24. [14]

3) Os testes complementares ou testes confirmatórios utilizam diferentes formatos e princípios. Entre eles destacam-se os de *Western Blot* e de *Imunoblot* incluindo a Imunofluorescência (IF) indireta. Mais recentemente surgiram os testes moleculares que auxiliam no esclarecimento de resultados de infecção aguda pelo HIV, nos casos de reatividade em testes de 4ª geração com detecção do Ag p24 e ausência de anticorpos circulantes. [14]

4) Os testes de ácidos nucleicos (NAT), são testes que detetam RNA viral. Os NAT detetam o vírus, podendo fornecer um resultado positivo ou negativo ou, ainda, quantificar o números de partículas víricas presentes no sangue, conhecida como a carga viral. Estes testes são bastante dispendiosos e, por esse motivo, não são utilizados para rastreio ou diagnóstico de rotina. [7]

1.2 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário que integra o filo Apicomplexa, classe *Sporozoea* e sub-classe *Coccidida*. Foi descrito pela primeira vez em 1908 no norte de África e no Brasil. É um dos parasitas mais bem-sucedidos, que infeta a maioria dos animais de sangue quente, incluindo humanos. É a única espécie conhecida do género

Toxoplasma e tem os felinos como hospedeiro definitivo. É o agente causador da toxoplasmose, uma antroponose de distribuição cosmopolita. É um parasita intracelular obrigatório e existem 3 formas morfológicas durante o seu ciclo biológico: oocisto, taquizoíto e bradizoíto. [16], [17], [18]

Os oocistos resultam da reprodução sexuada do parasita, que ocorre nas células intestinais dos felinos. São eliminados na forma imatura, juntamente com as fezes, levando cerca de 2 a 5 dias para amadurecimento no meio ambiente. Caracterizam-se pelo seu formato esférico e parede dupla bastante resistente às condições do meio ambiente e, por este motivo, são designados como forma de resistência. Após esporulação no meio ambiente, o oocisto contém dois esporoquistos e cada um destes contém 4 esporozoítos. Após maturação, passam a ser infectantes se ingeridos por gatos ou outros animais suscetíveis (aves, mamíferos ou homem) (Fig. 14). [16]



Figura 14) Oocisto não esporulado e oocisto esporulado. Adaptado de [7]

Os taquizoítos são a forma encontrada durante a fase aguda da infecção. Têm a forma de arco (toxon = arco), que deu o nome ao gênero e apresentam-se com a forma grosseira de banana ou meia-lua, com uma das extremidades afiladas e a outra arredondada. A sua multiplicação é rápida, a cada 6 a 8 horas, através de processos de endogenia, sendo esta uma forma especializada de reprodução assexuada. Estas formas que atravessam a barreira hematoencefálica e transplacentária são capazes de infectar células nucleadas e disseminar-se através do organismo. (Fig. 15) [16]

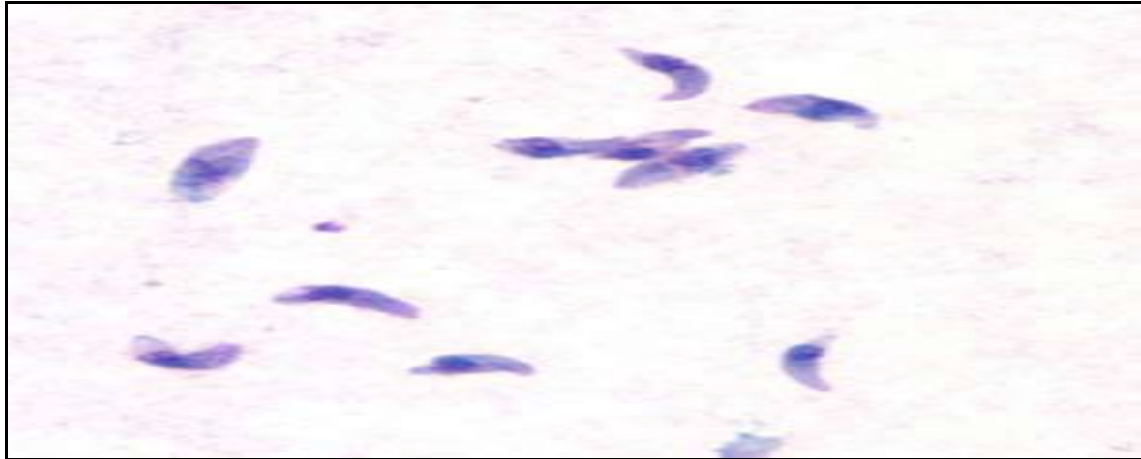


Figura 15) Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Adaptado de [7]

Os bradizoítos são as formas encontradas em vários tecidos, tais como os musculares esqueléticos e cardíacos, o nervoso e a retina. Geralmente, ocorrem na fase crónica da infeção e são encontrados dentro dos quistos, onde se multiplicam lentamente. São mais resistentes à tripsina e pepsina do que os taquizoítos e podem permanecer viáveis durante vários anos. [16]

Os primeiros estudos de genotipagem do *Toxoplasma gondii* demonstraram uma estrutura de população clonal com três linhagens principais, denominadas tipo I, II e III. Apesar da sua distribuição global, este parasita apresenta uma baixa diversidade genética. Foram identificados 11 haplogrupos distintos, em que três desses haplogrupos pertencem às linhagens previamente conhecidas: tipo I, II e III. As restantes oito são linhagens recentemente reconhecidas, designadas por atípicas, exóticas ou recombinantes. [18], [19]

De acordo com alguns estudos, o tipo I é o genótipo mais predominante na toxoplasmose humana. As linhagens do tipo I apresentam maior virulência do que as linhagens do tipo II e III. [19]

1.2.1 Epidemiologia

A toxoplasmose é mais elevada em áreas quentes e húmidas, com más condições de higiene pessoal e em ambientes precários. Isto deve-se, em parte, ao facto dos oocistos perderem a virulência quando secos ou congelados. [16], [18]

É uma das parasitoses mais comuns em gatos e estima-se que atinja mais de metade da população mundial em determinados países. No entanto, os casos de doença clínica são menos frequentes e a sua prevalência nos países industrializados tem vindo a diminuir nos últimos 30 anos. As áreas de maior prevalência são América Latina, África e Sudeste Asiático. [16], [18]

Estima-se que um terço da população mundial esteja infetada e, nos EUA, registam-se anualmente 750 mortes por toxoplasmose e cerca de 50% destas infeções são de origem alimentar. [20], [18]

Em Portugal, e de acordo com diferentes estudos, a informação acerca da prevalência da toxoplasmose é escassa. No entanto, alguns dados apontam para um valor de 47%. [20]

1.2.2 Ciclo de vida/transmissão

O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* tem como únicos hospedeiros definitivos a família *Felidae*, principalmente os gatos domésticos (Fig. 16). O ciclo inicia-se com a eliminação de oocistos não esporulados nas fezes dos gatos. Estes, levam 1 a 5 dias para esporular no ambiente e tornarem-se infecciosos. Os hospedeiros intermediários (aves e roedores) são infetados após a ingestão de produtos do solo, água ou material vegetal contaminado. Após a ingestão, os oocistos transformam-se em taquizoítos. Estes taquizoítos desenvolvem-se no tecido neural e muscular e evoluem para bradizoítos. [7]

Os gatos são infetados após consumir hospedeiros intermediários que contém quistos nos tecidos ou, diretamente, após a ingestão de oocistos esporulados. Os animais para consumo humano também podem ser infetados através da ingestão de quistos do meio ambiente. [7]

O ser humano pode ser infetado através da ingestão de carne mal cozinhada, ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de gatos, transfusão de sangue, transplante de órgãos ou de transmissão de mãe para filho, através da placenta. [7]

No hospedeiro humano, os parasitas formam quistos no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos. O diagnóstico é normalmente realizado por sorologia e, nas

infecções congénitas, pode ser realizado através da detecção de DNA do parasita no líquido amniótico, utilizando métodos moleculares como a *polymerase chain reaction* (PCR). [7]

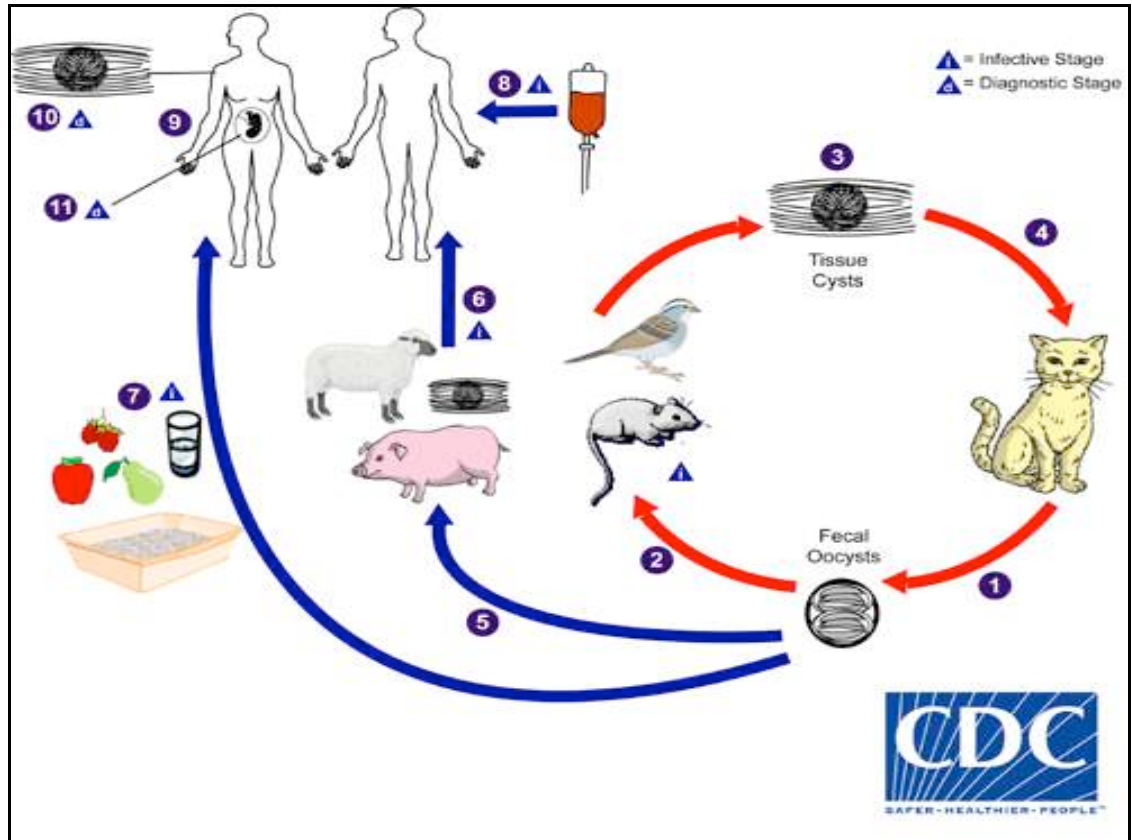


Figura 16) Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Adaptado de [7]

A toxoplasmose não é transmitida de pessoa para pessoa, à exceção dos casos de mãe para filho (infecção congénita), transfusão de sangue ou transplante de órgãos. Usualmente, são destacadas três vias de transmissão mais comuns: ingestão de carne contaminada e mal cozinhada, transmissão de animal para humano (através de fezes de gatos contaminadas) e infecção congénita (quando a infecção ocorre imediatamente antes ou durante a gravidez). [7]

Quando a transmissão é efetuada através de quistos teciduais, estes encontram-se no músculo e no cérebro dos hospedeiros intermediários. Os gatos adquirem toxoplasmose através da ingestão de presas infetadas (roedores ou aves), nas quais ocorre o ciclo enteroepitelial, a reprodução sexual e a produção de oocistos. Os animais carnívoros ingerem quistos teciduais e os humanos adquirem a infecção através do consumo de carne mal cozinhada. Quando um quisto tecidual é ingerido, a sua parede é destruída

por enzimas proteolíticas no estômago, libertando os bradizoítos. Estes são resistentes às enzimas proteolíticas o que os permite sobreviver à digestão. Desta forma, conseguem iniciar a infecção no intestino. [18]

Caso a transmissão seja efetuada pelos oocistos, estes são excretados pelos gatos infectados em grande número, até duas semanas após a infecção. Quando libertado, o oocisto torna-se infeccioso após esporulação, podendo permanecer desta forma por mais de um ano em solo húmido. O homem pode ser infectado através da ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água contaminada. [18]

A transmissão congénita ocorre durante uma toxoplasmose aguda em mães seronegativas quando os taquizoítos presentes no sangue podem atravessar a placenta e infectar o feto. O estágio da gravidez em que a toxoplasmose materna é adquirida é um fator importante tanto na frequência de transmissão como na gravidade da infecção congénita. Os casos em que a infecção ocorre no início da gestação são os mais graves, podendo resultar em aborto espontâneo, hidrocefalias e atraso mental. Nos casos em que a infecção ocorre no último trimestre da gravidez as taxas de transmissão são mais altas, mas a maioria desses casos são subclínicos uma vez que as infeções resultantes são assintomáticas ou podem originar coriorretinites recorrentes que se apenas se manifestam no início da vida adulta. [18]

1.2.3 Manifestações Clínicas

Numa infecção por *Toxoplasma gondii*, podem ocorrer diferentes manifestações clínicas de acordo com o estado de saúde do indivíduo infectado. A toxoplasmose pode ser adquirida por indivíduos imunocompetentes, toxoplasmose congénita, toxoplasmose ocular (adquirida ou congénita) ou toxoplasmose cerebral, geralmente resultante de infeções reativadas em indivíduos infectados imunocomprometidos. Dados recentes demonstram que as infeções latentes poderão originar desordens psiquiátricas em alguns indivíduos imunocompetentes. [18]

Em indivíduos saudáveis, a infecção por *Toxoplasma gondii* é geralmente assintomática (cerca de 80% dos casos), uma vez que o seu sistema imunitário impede o parasita de causar doença. Nos casos em que existe sintomatologia, esta é semelhante a síndromes gripais, podendo ocorrer febre baixa, dores musculares, astenia e adenopatias

cervicais. Duas a três semanas após a infecção, devido a uma resposta imune eficaz do hospedeiro os taquizoítos são diferenciados em bradizoítos. Na fase crónica da infecção estes são encontrados em quistos teciduais localizados principalmente no tecido muscular e neural, que podem persistir por longos períodos de tempo. Desta forma, o parasita mantém-se no organismo de forma inativada, podendo existir reativação em situações de imunodepressão. [7], [16], [18]

A toxoplasmose congénita é o resultado de uma infecção primária por *Toxoplasma gondii* durante a gravidez, na qual ocorre a passagem de taquizoítos pela placenta (transmissão vertical) e infetam o feto. A transmissão da infecção varia durante a gestação, sendo baixa (5-25%) no primeiro trimestre e aumentando até 90% no final da gravidez. Se a mulher for infetada antes de engravidar, o feto estará protegido por imunidade materna. Caso a infecção ocorra durante a gravidez, os danos no feto são tanto mais graves quanto mais cedo ocorrer a transmissão. Quando a infecção ocorre no primeiro trimestre da gravidez, pode resultar em morte fetal devido a esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia e exantema. Este último quadro raramente é observado, uma vez que ocorre durante a vida intrauterina, levando à morte. Se a infecção ocorrer no último trimestre da gravidez, a maioria das crianças nasce assintomática, podendo apresentar sintomatologia mais tardiamente. A tríade clássica de sintomas da toxoplasmose congénita é a coriorretinite, hidrocefalia e calcificações intracranianas. [7], [16], [18]

A toxoplasmose ocular, que se pode manifestar através de coriorretinite, pode ser adquirida após o nascimento ou o resultado de uma infecção congénita. É geralmente a consequência de uma infecção aguda com a presença de taquizoítos ou crónica, com presença de quistos contendo bradizoítos, localizados na retina. A toxoplasmose ocular ativa consiste num foco de coagulação e necrótico bem definido na retina. Pode ainda estar presente uma inflamação difusa da retina e da coróide. Esta, pode provocar sintomatologia como dor nos olhos, sensibilidade à luz (fotofobia) e visão embaciada. Se as estruturas centrais da retina estiverem envolvidas, haverá uma perda progressiva da visão que poderá levar à cegueira. Estudos demonstram que a predominância do genótipo do tipo I poderá estar na origem desta manifestação clínica. [7], [16], [18]

A toxoplasmose cerebral deve-se geralmente à reativação de infeções latentes em indivíduos imunocomprometidos. É a doença oportunista mais comum em indivíduos infetados com HIV em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No entanto, a introdução

da terapêutica antirretroviral reduziu a incidência de toxoplasmose cerebral. Esta pode causar lesões unifocais ou multifocais e as manifestações clínicas irão depender da localização e do número de lesões. Os sintomas incluem cefaleias, febre, convulsões, confusão mental, ataxia, letargia e alterações visuais. A sintomatologia pode ainda incluir disfunção cognitiva, pressão intracraniana e movimentos involuntários. [18]

Na última década houve um interesse crescente na possibilidade de associação de infecção por *Toxoplasma gondii* e distúrbios psiquiátricos, como a depressão ou a esquizofrenia. Apesar do mecanismo ainda não estar completamente esclarecido, sabe-se que está associado ao genótipo deste parasita, uma vez que as linhagens do tipo I têm um maior efeito da expressão do gene nas células neuroepiteliais e afetam amplamente os genes associados com o sistema nervoso central. Este facto ajudaria na explicação de apesar de um terço da população estar infetada com toxoplasmose, apenas uma pequena fração apresenta distúrbios psiquiátricos. [18]

Nos indivíduos imunocomprometidos, quer seja por transplante ou por infecção por HIV, a toxoplasmose assume um carácter mais grave. Indivíduos que foram infetados por *Toxoplasma gondii* antes de serem imunocomprometidos, poderão sofrer reativação da toxoplasmose, surgindo sintomas como febre, confusão mental, dor de cabeça, convulsões, náuseas e má coordenação. Em mulheres grávidas imunocomprometidas, que foram infetadas por *Toxoplasma gondii* antes da gravidez, pode ocorrer reativação da doença, que poderá originar infecção congénita. [7], [16]

1.2.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico clínico é praticamente impossível na toxoplasmose do adulto assintomático ou com sintomas indefinidos e, por este motivo, o exame clínico apenas pode sugerir a eventualidade dessa etiologia. Nos casos de coriorretinite, as suspeitas são grandes. No entanto, o quadro clínico não é suficiente para afirmar o diagnóstico, dependendo este de confirmação laboratorial. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado indiretamente, através de métodos serológicos ou diretamente, por PCR, hibridação e anatomopatologia. [16], [21]

O primeiro teste serológico disponível para a deteção de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* foi a reação Sabin-Feldman (*Dye Test*), descoberta em 1948. É

um teste com elevada sensibilidade e especificidade. A sua principal desvantagem é a utilização de parasitas vivos, o que pode limitar a sua disponibilidade. Por esta razão, a sua utilização tem sido restrita. [21], [22]

O diagnóstico laboratorial de uma infecção crónica é geralmente efetuado por testes serológicos através da deteção de anticorpos e o mais comum é a deteção da Imunoglobulina G (IgG), para saber se o indivíduo foi infectado. Para conseguirmos estimar o início da infecção, que tem uma importância particular nas mulheres grávidas, é comum a determinação da Imunoglobulina M (IgM) e ainda o teste da avidéz. [7], [16]

Atualmente, o diagnóstico da toxoplasmose é, sobretudo, efetuado pelo doseamento de IgG ou IgM, por técnicas de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), e pela Imunofluorescência (IF) indireta. A técnica de ELISA geralmente inclui o antígeno ou o anticorpo em fase sólida, o antígeno ou anticorpo marcado com enzima e o substrato da reação enzimática. (Fig. 17) [7], [22]

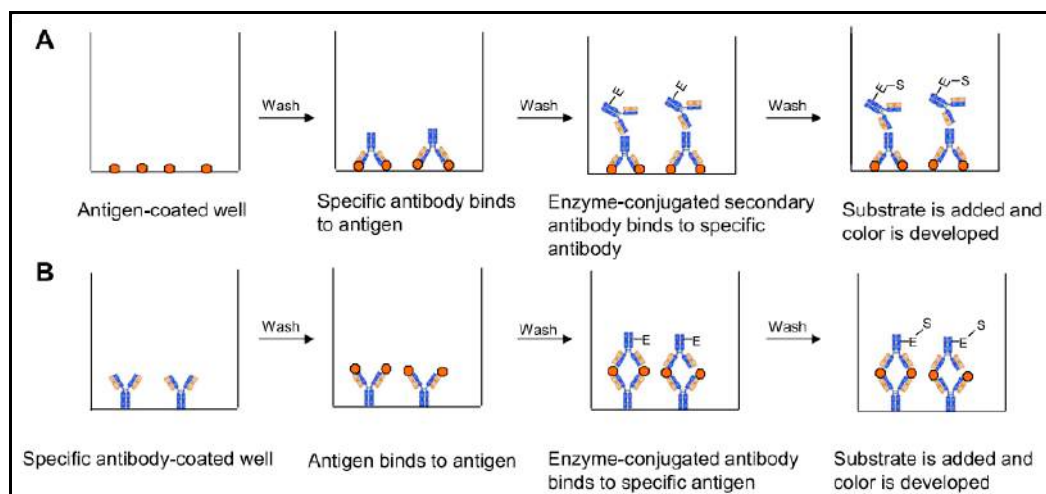


Figura 17) Diagrama esquemático da técnica de ELISA. **a** Reação ELISA indireta, usada para deteção de anticorpos anti-*T. gondii*, envolve o antígeno específico revestido na fase sólida, anticorpo secundário conjugado com a enzima e o substrato. **b** Reação de ELISA sandwich que deteta antígenos de *T. gondii*, envolvendo o anticorpo específico revestido na fase sólida, anticorpo conjugado com enzima e substrato. Adaptado de [22]

A reação de ELISA para deteção do *Toxoplasma gondii* pode ser de indireta ou *sandwich*. Na reação de ELISA indireta, o antígeno é revestido na fase sólida e a amostra que contém os anticorpos é posteriormente adicionada. A reação é melhorada através da adição de um anticorpo secundário ligado a uma enzima e pode ser avaliada pela quantificação da cor desenvolvida (Fig. 17A). Este teste deteta maioritariamente

anticorpos anti-*T. gondii* IgG, IgM e IgA. Na reação de ELISA sandwich os antígenos ou anticorpos são revestidos na fase sólida e a amostra é posteriormente adicionada. Após incubação e lavagem o complexo antígeno-anticorpo é ligado à fase sólida. Os anticorpos ou antígeno são detetados pela adição de anticorpos ou antígenos marcados com enzimas (Fig. 17B). Este teste está desenvolvido tanto para a detecção de anticorpos como antígenos. [22]

Os anticorpos IgM específicos aparecem na primeira semana de infecção e apresentam o seu pico dentro de um mês, deixando de ser detetados entre o terceiro e o quinto mês, pós-infecção. Um resultado de IgM negativo, exclui uma infecção de toxoplasmose em fase aguda e com menos de 3 semanas de duração, mas não exclui a possibilidade de infecções mais antigas. Os anticorpos IgG específicos podem indicar presença de uma infecção aguda, sempre que a comparação de duas amostras de soro do paciente, recolhidas com intervalo de 3 semanas, acusar uma elevação de título. No caso de mulheres grávidas, o teste da avidéz tem sido utilizado para ajudar a distinguir entre uma infecção passada e uma recentemente adquirida. Um resultado de IgM negativo nas três primeiras semanas da gestação indica que a toxoplasmose não foi adquirida durante esse tempo. Por outro lado, depois de três semanas, um teste negativo para IgM não exclui a possibilidade da infecção ter começado antes ou após a concepção. [7], [16]

A observação direta do parasita é considerada outro método de diagnóstico laboratorial, embora menos comum, uma vez que são utilizadas amostras de difícil obtenção, como o líquido cefalorraquidiano (LCR) ou biópsias de órgãos ou tecidos. [7], [16]

Para além dos testes serológicos convencionais, as técnicas moleculares como a PCR, podem ser utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose. Os métodos convencionais são geralmente fiáveis, no entanto têm algumas limitações ao nível de indivíduos imunocomprometidos e em situações de gravidez (incapacidade de detecção de uma infecção congénita no feto). Estes testes detetam o DNA do parasita no líquido amniótico, o que pode ser útil em casos de infecção congénita. A PCR é um método eficiente de amplificação enzimática *in vitro* que permite a amplificação específica de DNA a partir de pequenas quantidades de material e em pouco tempo. [7], [16], [22]

1.3 Toxoplasmose em indivíduos infetados com HIV

O *Toxoplasma gondii* é um parasita presente em todo o mundo e causa infeções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, como é o caso dos indivíduos infetados com HIV. Na maioria dos casos, a doença ocorre após reativação da infeção latente devido à perda progressiva de imunidade celular. [23]–[25]

1.3.1 Epidemiologia e patogénese da co-infeção toxoplasmose/ HIV

A prevalência da infeção por *Toxoplasma gondii* varia de acordo com a área geográfica e os grupos populacionais e o mesmo acontece nos indivíduos seropositivos para HIV. Nestes, geralmente, a reativação da infeção ocorre quando os linfócitos T CD4+ descem para valores inferiores a 200 células/ml. Assim sendo, a probabilidade de desenvolver a reativação da toxoplasmose é de cerca de 30%. [24]–[27]

Segundo estudos realizados, sabe-se que nos EUA, um terço dos indivíduos infetados com HIV tem anticorpos contra o *Toxoplasma gondii* e a prevalência da reativação ronda os 3 a 22%. Em países como a Nigéria ou o Brasil a prevalência é de cerca de 75%, 30% na República Checa e 12.5% na China. Na Índia, a seroprevalência nos indivíduos infetados com HIV é reportada com cerca de 34.78% dos casos e também de 67.8%. Esta variação de valores deve-se às diferenças de áreas geográficas e ao facto de a infeção ser mais comum em áreas tropicais do que em regiões frias e de elevada altitude. [23]

Relativamente à sua patogénese, a resistência ao *Toxoplasma gondii* é mediada por uma resposta imune das células do tipo Th-1. Estas, dependem da produção de interleucina-12 (IL-12) e de interferão-gama (IFN-gama). A síntese de IL-12 é estimulada pelas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos que são infetados pelo parasita no início da infeção. Desta forma, a síntese de INF-gama e linfócitos NK e T é induzida. Contrastando com a infeção em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose assume um carácter mais grave em indivíduos imunocomprometidos. Na infeção por HIV, devido à imunossupressão, as infeções oportunistas ocorrem, pois, há diminuição das células T

CD4+ e produção comprometida de IL-12 e de IFN gama, em resposta à presença do parasita. [23], [24]

Após a ingestão de alimentos contaminados, os taquizoítos disseminam-se através do organismo, infetando as células nucleadas. Desta forma, levam à produção de focos necróticos, rodeados de inflamação. Os taquizoítos transformam-se em quistos, resultando em infecção de longa duração. A imunidade celular mediada pelas células T, macrófagos e citocinas, como a IL-12 e o IFN gama, são necessárias para manter a latência da infecção crónica pelo *Toxoplasma gondii*. [23]

1.3.2 Manifestações clínicas da co-infecção toxoplasmose/ HIV

Na co-infecção toxoplasmose/HIV, os indivíduos manifestam maioritariamente toxoplasmose cerebral, coriorretinite, pneumonias ou infeções disseminadas, dependendo as manifestações clínicas do estado do sistema imunitário do hospedeiro. [18], [19]

Na toxoplasmose cerebral ocorrem inicialmente sintomas subagudos, tais como sinais neurológicos associados a febre, alterações sensoriais e dor de cabeça. As lesões do sistema nervoso central (SNC) podem estar presentes em mais de 50% dos casos, resultando em hemiparesia ou anomalias da fala. Em alguns casos, podem ocorrer distúrbios neuropsiquiátricos incluindo psicose, demência, ansiedade ou distúrbios de personalidade. Estas manifestações são geralmente fatais para indivíduos infetados com HIV que não recebem terapêutica antirretroviral. [19], [28], [29]

Embora a toxoplasmose cerebral seja ainda uma das maiores causas de morbilidade e mortalidade nos indivíduos infetados com HIV, a introdução de terapêutica antirretroviral veio reduzir drasticamente a sua incidência, aumentando a sobrevivência destes indivíduos. Apesar das melhorias observadas, o facto de os sobreviventes apresentarem défices neurológicos persistentes indica que ainda existe a necessidade de estudo acerca da terapêutica para a toxoplasmose. [18], [26], [30]

Para além da toxoplasmose cerebral, as apresentações mais comuns são a doença ocular e pulmonar. Indivíduos com coriorretinite apresentam visão turva, escotoma, dor ou fotofobia. Poderão ainda existir lesões discretas ou multifocais e pode estar presente uma

necrose difusa da retina, associada a inflamação e a elevado número de parasitas. As lesões podem evoluir para cegueira parcial ou total. [19], [26], [23], [31]

Em indivíduos infectados pelo HIV, pode ocorrer uma toxoplasmose disseminada, com febre, síndrome do tipo sepsis, com hipotensão, coagulação intravascular disseminada e elevação da lactato desidrogenase (LDH). As manifestações pulmonares são semelhantes à pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*. [15], [31]

1.3.3 Diagnóstico da co-infecção toxoplasmose/ HIV

Na co-infecção Toxoplasmose/HIV, os indivíduos manifestam maioritariamente toxoplasmose cerebral, sendo esta a manifestação mais grave. Por este motivo, o diagnóstico definitivo assume um papel importante. O diagnóstico inicial/presuntivo pode ser feito com base nas manifestações clínicas, radiologia, estudos moleculares, testes serológicos e ainda, resposta à terapêutica. [15], [18]

1.3.3.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico e presuntivo de toxoplasmose em indivíduos infectados com HIV, pode ser feito quando a contagem de células é inferior a 200 linfócitos TCD4⁺/μl, apresentando lesões neurológicas compatíveis e sem profilaxia eficaz. Em casos de toxoplasmose cerebral, poderá existir uma melhoria nas características clínicas e radiológicas após 2 a 3 semanas de terapia empírica. [15]

1.3.3.2 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de serologia. Os anticorpos anti-Toxoplasma gondii IgG começam a aumentar após 1 a 2 semanas de infeção e atingem o pico após 6 a 8 semanas. Ocorre uma diminuição gradual nos 1 a 2 anos seguintes, mas eles podem persistir durante toda a vida. A presença de títulos de Ac anti-IgG com alta avididade das IgG, dá-nos a evidência de infeção e indica-nos a reativação secundária de infeção crónica latente. É importante detetar a seropositividade para o

Toxoplasma gondii em todos os indivíduos infetados com HIV para avaliar e monitorizar o risco de toxoplasmose cerebral. [15], [31]

Devido ao facto de a toxoplasmose cerebral ser a causa mais frequente de lesões focais intracerebrais, o seu diagnóstico pode ser realizado por tomografia computadorizada (TC) ou por ressonância magnética (RM), sendo estes testes indispensáveis para o estudo desses indivíduos infetados. As lesões apresentam-se hipodensas, múltiplas, bilaterais e com edema, e são observadas na maioria dos indivíduos infetados. [15], [16]

O diagnóstico molecular pode ser efetuado através da deteção do DNA do *Toxoplasma gondii* em amostras biológicas por PCR. Os métodos moleculares são particularmente apropriados para indivíduos infetados com HIV, uma vez que não são afetados pelo estado imunológico do indivíduo, são rápidos, sensíveis e específicos. Podem ser utilizadas amostras de LCR e de sangue, sendo as primeiras de difícil obtenção e consideradas bastante invasivas. Nestes casos, a sensibilidade é variável como reflexo da variabilidade dos métodos utilizados. [15], [18]

O diagnóstico pode ainda ser efetuado através de biópsias do tecido cerebral para a demonstração da presença de taquizóitos e de quistos tecidulares que dão o diagnóstico definitivo. No entanto, este método não é frequentemente aplicado, uma vez que o resultado da terapia utilizada na suspeita de toxoplasmose permite a confirmação do diagnóstico. [15], [24]

1.3.4 Tratamento da co-infecção toxoplasmose/ HIV

Para os indivíduos infetados com HIV e outros imunocomprometidos é imprescindível fazer o diagnóstico serológico da infecção por *Toxoplasma gondii*, para se conhecer a real situação de risco existente. Por norma, como terapêutica primária, são utilizadas combinações de sulfonamidas e pirimetamina. [16]

1.3.4.1 Profilaxia farmacológica

A profilaxia de pré exposição da infecção por HIV (PrEP) no adulto deve ser aplicada às pessoas com risco acrescido de aquisição de infecção por HIV, sejam estas

peessoas cujo parceiro está infetado por HIV, utilizadores de drogas injetáveis ou parceiros serodiscordantes em situação de preconceção ou gravidez. Só devem ser elegíveis para PrEP os indivíduos com resultado negativo após realização de teste serológico de 4ª geração (Ac anti HIV1/2 + Ag p24). [32]

A prescrição desta profilaxia pré-exposição deve ser realizada por médicos e contempla um dos seguintes regimes profiláticos: tenofovir/emtricitabina (200 mg + 245 mg) via oral 1x dia; tenofovir/emtricitabina (200 mg + 245 mg) *on demand* na dose 2 comprimidos 2 a 24 horas antes da exposição e 1 comprimido cada 24 horas até à última exposição; monoterapia com tenofovir (200 mg) via oral 1x dia, na presença de intolerância ou toxicidade à emtricitabina. [32]

Estudos demonstram que a PrEP reduz o risco de contrair HIV em cerca de 99% quando tomado diariamente. Entre os utilizadores de estupefacientes injetáveis, reduz o risco de contrair HIV em pelo menos 74% dos casos, quando tomado diariamente. [7]

A profilaxia pós exposição (PEP) consiste no uso de medicamentos antirretrovirais para prevenir a infeção por HIV em pessoas HIV negativas que tiveram uma exposição específica de risco, quer seja através de relações sexuais ou partilha de seringas, com alguém que tenha ou possa ter infeção por HIV. Deve ser iniciada o mais rapidamente possível para ser eficaz, até 72 horas após uma possível exposição e continuada por 4 semanas. [7]

A prescrição deve ser realizada por médicos e contempla um regime que deve ser constituído por 3 fármacos antirretrovirais, durante 28 dias: tenofovir + emtricitabina (uma vez ao dia) + raltegravir (duas vezes ao dia) ou dolutegravir (uma vez ao dia). [7]

Em indivíduos imunocompetentes, a infeção por *Toxoplasma gondii* resulta normalmente em doença leve e autolimitada. No caso de indivíduos imunocomprometidos e com o recente aumento da prevalência mundial do HIV, a infeção assume um papel clinicamente significativo e a profilaxia farmacológica pode ser recomendada. Existe, desta forma, um interesse acrescido em prevenção e tratamento da toxoplasmose. [33]

A reativação da toxoplasmose latente que ocorre em indivíduos infetados com HIV tem efeitos devastadores. A encefalite toxoplásmica ou toxoplasmose cerebral é a manifestação clínica mais comum, principalmente quando a contagem de linfócitos

TCD4+ é inferior a 100 células/ μ l. Nestes casos, e quando a IgG está positiva, a profilaxia primária é indicada. [33]

Vários estudos têm demonstrado a eficácia de sulfametoxazol-trimetoprim e em alternativa, dapsona-pirimetamina. [15], [31], [33]

1.3.4.2 Tratamento

O tratamento da toxoplasmose em indivíduos infectados com HIV inclui a terapia antirretroviral direcionada para o HIV e a terapia antimicrobiana direcionada para o *Toxoplasma gondii*. Segundo diversos estudos, a pirimetamina e a sulfadiazina são a combinação mais utilizada e ambos os fármacos bloqueiam sinergicamente o metabolismo do ácido fólico, necessário para o desenvolvimento do parasita. [24], [34]

A sulfadiazina é a mais utilizada das sulfonamidas. Para adultos e crianças, a dosagem recomendada é de 100 a 125 mg/kg de peso e por dia, divididas em quatro doses e por via oral. O tratamento deve ser realizado durante duas a quatro semanas. [16]

A pirimetamina deve ser administrada oralmente, em associação com as sulfonamidas. Para os adultos é recomendada a dose de 75 a 100 mg, durante 10 dias, reduzindo para 50 mg por mais 10 dias e depois para 25 mg diariamente. Uma a duas vezes por semana é necessário controlar os indivíduos infectados com exames de sangue completos, com hemograma incluindo plaquetas, uma vez que a pirimetamina pode diminuir a atividade da medula óssea. Para neutralizar essa ação, deverá ser administrado em simultâneo ácido folínico, de 2 a 10 mg por dia, no adulto. [16]

A clindamicina pode ser utilizada em casos de intolerância às sulfonamidas. Esta, é administrada por via endovenosa, 900 a 1200 mg a cada 6 ou 8 horas, durante 6 semanas, em associação à pirimetamina. Por via oral, a posologia é de 450 mg a cada 6 horas. Segundo alguns estudos, o regime terapêutico contendo clindamicina é menos eficaz, no entanto apresenta a mesma taxa de toxicidade. Caso este fármaco também não seja tolerado, a atovaquona pode ainda ser associada com a pirimetamina, tal como a azitromicina. [16], [34], [35]

Nos indivíduos imunocomprometidos, a associação da sulfonamida, pirimetamina e ácido folínico deve ser realizada durante pelo menos 6 semanas. Deve-se continuar

depois com tratamento supressivo à base de pirimetamina, 25 a 50 mg diariamente, por via oral. A natureza recidivante da encefalite torna este tratamento permanentemente necessário nos casos dos indivíduos infetados com HIV. [16]

Após alguns estudos, é apresentado o benefício do co-trimoxazol no tratamento presuntivo da toxoplasmose cerebral, em países onde os recursos são limitados e a sulfadizina possa não estar disponível. [29]

A terapêutica inicial é seguida de profilaxia secundária ou terapêutica de manutenção, que deverá ser continuada até que a contagem de linfócitos TCD4+ seja superior a 200 células/ μ l e por mais 3 meses. Esta profilaxia irá ajudar a garantir a recuperação do sistema imunitário e permitir que os quistos se mantenham adormecidos e não desencadeiem novo processo infeccioso. [24]

Para o caso de mulheres grávidas, a espiramicina é o fármaco escolhido para o primeiro trimestre, uma vez que a pirimetamina pode ter efeitos teratogénicos. Pertence ao grupo dos macrólidos e concentra-se ao nível da placenta. Devido à baixa incidência de efeitos adversos é uma opção de tratamento confortável. Sabe-se também que é ineficaz numa infecção fetal, uma vez que não atravessa a barreira placentária. [24], [34]

A terapêutica atual apresenta ainda grandes efeitos secundários a longo prazo, como por exemplo a mielotoxicidade. Uma vez que os tratamentos são prolongados, estes efeitos poderão levar à sua descontinuação ou falta de adesão. Inicialmente, são obtidos resultados favoráveis em 80 a 90% dos casos, no entanto, os efeitos tóxicos sobre a medula acabam por exigir a suspensão desta medicação devido às alterações hematológicas. [16], [34]

1.3.5 Prevenção da co-infecção toxoplasmose/ HIV

Todos os indivíduos infetados com HIV devem efetuar a pesquisa para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, para detetar possíveis infeções latentes. Nestes casos, a toxoplasmose pode ter efeitos devastadores e, por esse motivo, a profilaxia primária e secundária poderá ser benéfica. Idealmente, indivíduos infetados com HIV seriam submetidos a testes para toxoplasmose, no momento do diagnóstico. A profilaxia primária

é indicada em indivíduos infetados com HIV com contagem de células T CD4+ inferior a 200 células/ μ l. [7], [33]

Para que a prevenção seja eficaz, devem existir modificações gerais no estilo de vida que sejam complementares às opções farmacológicas. Assim, indivíduos de risco deverão preservar a exposição a eventuais contaminações com *Toxoplasma gondii*, evitando alimentos crus ou pouco cozinhados, o contacto com a caixa de areia dos gatos e procedendo à lavagem das mãos de forma eficiente e regular. [7], [33]

2. Discussão

Vários estudos realizados mostraram que o HIV origina alterações significativas do sistema imunológico, relacionadas principalmente com a imunidade celular, levando à diminuição do número de linfócitos T CD4+ circulantes. As manifestações clínicas, que normalmente apresentam os indivíduos infectados com HIV, devem-se à disfunção imunológica decorrente da infecção e, segundo alguns autores, devido ao efeito citopático. Este, caracteriza-se pela destruição das células T CD4+, o que leva o indivíduo à imunodepressão. [36]

A toxoplasmose é uma das mais importantes infecções oportunistas que afetam os indivíduos imunocomprometidos, tendo efeitos devastadores e podendo ser fatal em casos de indivíduos infectados com HIV. [36]

Após algumas pesquisas, verificou-se que as taxas de prevalência da infecção do *Toxoplasma gondii* em indivíduos infectados com HIV, variam conforme a área geográfica, que as taxas de infecção aumentam com a idade e que o risco de infecção aumenta à medida que os linfócitos T CD4+ diminuem. [23]

Vários autores descrevem diversas manifestações clínicas associadas à co-infecção Toxoplasmose/HIV. No entanto, a de maior destaque e gravidade é a toxoplasmose cerebral, sendo o SNC o local mais comumente afetado pelo *Toxoplasma gondii*. Esta, ocorre quando os títulos de linfócitos T CD4+ são inferiores a 200 células/ μ l e a sintomatologia apresentada é um quadro de alteração de um estado mental, convulsões, perturbações sensoriais e distúrbios do movimento. Outra manifestação clínica que obteve algum destaque ao longo da presente monografia, e pela maioria dos autores, foi a toxoplasmose ocular. São descritos na literatura, um número crescente de lesões retinianas associadas ao HIV. [37], [38], [39]

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser efetuado de diversas formas, sendo a sorologia a mais comum, através da detecção de anticorpos IgG e IgM. Para a toxoplasmose cerebral, o diagnóstico baseia-se em sinais e sintomas clínicos, pesquisa de anticorpos no LCR e/ou no soro e, ainda, tomografia computadorizada do crânio. Para a toxoplasmose ocular, o diagnóstico é presuntivo, tendo em consideração a clínica do

indivíduo e a exclusão de outras doenças. Na maioria dos indivíduos, pode ser diagnosticada com um simples exame ao olho. [36], [37], [39]

Segundo alguns estudos, a utilização de terapêutica antirretroviral em indivíduos infectados com HIV não exclui a possibilidade de desenvolvimento de toxoplasmose cerebral. Num estudo que comparou dois grupos de indivíduos, com avaliação antes e depois da utilização da terapêutica, foi observada uma diminuição nos parâmetros de infecção por citomegalovírus e herpes, mas isso não aconteceu com a toxoplasmose. [38]

Há estudos que demonstram que o início imediato da terapêutica antirretroviral com um inibidor da proteinase aumentado por ritonavir e dois inibidores da transcriptase reversa nucleósidos é segura e não tem efeitos negativos na incidência e na progressão da doença, bem como nos eventos imunológicos e virológicos, nem na qualidade de vida do doente. [40]

Dada a elevada prevalência de lesões focais no cérebro de indivíduos co-infectados com toxoplasmose/HIV há resultados de estudos que enfatizam a necessidade de monitorização e profilaxia neste contexto. Dadas as importantes manifestações clínicas que ocorrem em caso de reativação do parasita deverá proceder-se a uma identificação precoce da seropositividade pois recomenda-se iniciar a profilaxia entre os indivíduos infectados que apresentem contagens de linfócitos T CD4+ inferior a 200 células/ μ l. [41], [42]

Da bibliografia consultada destaca-se a importância da criação de programas para a prevenção primária da infecção por *Toxoplasma gondii*, de modo a reduzir os riscos de transmissão da infecção aos indivíduos seronegativos. Esta prevenção é imprescindível quando se trata de indivíduos imunocomprometidos, nos quais esta pode ser fatal. [39]

Algumas pesquisas revelam a prevalência de baixa escolaridade entre os indivíduos, bem como a falta de conhecimento acerca da infecção, o que confirma a necessidade de disseminar a informação através de propagandas de fácil acesso. Cuidados simples como a lavagem correta dos alimentos, consumo de carnes bem cozinhadas e não contactar com fezes de felinos, podem diminuir o risco de primoinfecção. [39]

Estudos demonstram que o índice de infecção aumenta com a idade. No Brasil, 42% das crianças até 5 anos de idade apresentavam anticorpos circulantes contra o parasita, aumentando a seropositividade para 56% entre 5 e 20 anos, e chegando a mais de

70% após os 20 anos. Este dado reforça a necessidade da realização de testes serológicos, para o acompanhamento de indivíduos com a saúde mais fragilizada. [39]

O tratamento de toxoplasmose está indicado nos casos agudos e nas reativações e tem como finalidade o combate das formas de trofozoítos, uma vez que os fármacos não têm ação sobre a forma de quistos, não existindo indicações para a forma crônica da doença. [36]

Por norma, como terapêutica primária são utilizadas combinações de sulfonamidas e de pirimetamina. A sulfadiazina é a mais utilizada das sulfonamidas. A pirimetamina demonstrou que pode diminuir a atividade da medula óssea e, por esse motivo, os indivíduos medicados deverão realizar exames regularmente e tomar ácido fólico para neutralizar a ação. Em casos de intolerância às sulfonamidas, poderá ser utilizada a clindamicina em associação com a pirimetamina. [16]

Alguns autores que a testaram atividade *in vitro* de diferentes antirretrovirais, em presença do *Toxoplasma gondii*, verificaram que alguns deles (tais como alguns inibidores da protease do HIV-I) inibiam o crescimento do parasita, sugerindo que o uso desses agentes poderá ser usado para limitar a ocorrência de encefalite, com origem na toxoplasmose. [43]

Nos indivíduos imunocomprometidos, a associação da sulfonamida, pirimetamina e ácido fólico deve ser realizada durante pelo menos 6 semanas. Inicialmente, são obtidos resultados favoráveis em 80 a 90% dos casos, no entanto, os efeitos tóxicos sobre a medula acabam por exigir a suspensão desta medicação devido às alterações hematológicas. [16]

Após alguns estudos, é apresentado o benefício do co-trimoxazol no tratamento presuntivo da toxoplasmose cerebral, em países onde os recursos são limitados e a sulfadiazina possa não estar disponível. [29]

3. Conclusão e perspectivas futuras

Ao longo dos tempos e em diferentes locais do mundo, este protozoário e intracelular, o *Toxoplasma gondii* tem sido reportado como um dos principais agentes de infeções oportunistas que ocorrem em indivíduos com infetados com HIV. A prevalência da toxoplasmose em indivíduos com HIV varia consoante a região geográfica e aumenta com a idade e o risco de infeção é maior quando os linfócitos T CD4 + são inferiores a 200 células/ μ l. [23]

Apesar do sucesso da terapia antirretroviral as co-infeções toxoplasmose/HIV continuam a ser uma importante causa de mortalidade. [44]

Devido à imunossupressão, existe muitas vezes a reativação da infeção crónica latente, resultando frequentemente em toxoplasmose cerebral. As lesões focais no cérebro são frequentes nos indivíduos com a co-infeção toxoplasmose/HIV e, por isso, o diagnóstico deverá ser clínico e laboratorial, através de serologia e com outros exames menos invasivos como a TAC e a RM. [23]

Devido à elevada taxa de reativação da toxoplasmose nos indivíduos infetados com HIV, deve ser efetuado o teste para deteção da presença de Acs anti-*Toxoplasma gondii* e, nos casos positivos, os indivíduos deverão ser selecionados para quimioprevenção. Deverá ser realizado o tratamento adequado e adoção de medidas profiláticas, como as higiénicas, evitando a contaminação, e a infeção deverá ser monitorizada. Dada a elevada prevalência desta coinfeção no continente africano e das consequentes lesões neurológicas e elevado grau de mortalidade deverão ser implementadas estas estratégias bem como a implementação da terapêutica antirretroviral, de forma a reduzir a morbilidade e a mortalidade desta população. [23],[45]

Vários estudos demonstram que, nos últimos anos, a principal forma de transmissão do HIV é por via sexual, sobretudo em populações de homens homossexuais, ocorrendo também casos de transmissão associada à administração de drogas por via intravenosa. [46]

O risco de transmissão vertical em mulheres infetadas com HIV é baixo e está associado à imunossupressão da mulher e elevadas cargas virais. No entanto, os recém-nascidos devem ser seguidos e monitorizados para a toxoplasmose congénita. [25]

Há estudos que mostram que cerca de um quarto das crianças nascidas de mães infetadas com HIV, também se encontram infetados com o vírus. [46]

Futuramente, será importante refletir no investimento de fármacos utilizados para o tratamento da toxoplasmose. A investigação de novos compostos contra o *Toxoplasma gondii*, particularmente aqueles que possam atuar nos bradizoítos, que estão presentes nos quistos que ocorrem nas fases crónicas terá bastante relevância. Deverão prosseguir-se estudos, em modelos experimentais, que testem novos compostos ativos contra as formas de bradizoítos mas também de taquizoítos. [47]

Considerando os dados da prevalência da toxoplasmose e as consequências da reativação da infeção, é importante a necessidade de informação à população acerca das formas de transmissão. Desta forma, deverão também ser realizados investimentos na prevenção, que poderão evitar gastos futuros no tratamento, melhorando a qualidade e expectativa de vida do paciente. [36]

Os indivíduos imunocomprometidos deverão ser monitorizados e realizar exames serológicos de forma periódica. Deverão ainda ser realizados estudos com vista à prevenção, mas também com o objetivo da quimioprevenção e imunização. [23]

Desta forma, atualmente existe apenas uma vacina comercializada, utilizada para proteger as ovelhas contra abortos provocados pelo *Toxoplasma gondii*. Apesar do impacto que a toxoplasmose tem em humanos, não existe ainda nenhuma vacina disponível. O principal objetivo de uma vacina humana aponta para a prevenção de consequências de toxoplasmose congénita em mulheres grávidas. Alguns estudos demonstram que para o programa de vacinação ser mais eficaz, deveria ser direcionado para raparigas adolescentes, tal como é feito para o papilomavírus humano (HPV). Para além da prevenção da doença congénita, os objetivos prendem-se em reduzir os quistos tecidulares na comida proveniente de animais e reduzir a libertação de quistos nas fezes de gatos. [48]

4. Referências Bibliográficas

- [1] N. S. de O. Santos, M. T. V. Romanos, and M. D. Wigg, *Virologia Humana*, Terceira E. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2015.
- [2] G. Moore, G. Knight, and A. Blann, *HAEMATOLOGY*. Oxford University Press, 2010.
- [3] A. V. Hoffbrand and J. E. Pettit, *Color Atlas of Clinical Hematology*, Third Edit. MOSBY, 2000.
- [4] R. Seitz, “Human Immunodeficiency Virus (HIV),” *Transfus. Med. Hemotherapy*, vol. 43, no. 3, pp. 203–222, 2016.
- [5] “World Health Organization.” [Online]. Available: <https://www.who.int/>. [Accessed: 22-Sep-2019].
- [6] A. B. Bhatti, M. Usman, and V. Kandi, “Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy,” *Cureus*, vol. 8, no. 3, pp. 1–12, 2016.
- [7] “CDC.” [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/>. [Accessed: 22-Sep-2019].
- [8] “SNS.” [Online]. Available: https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2018/07/RelatorioVIH_SIDA2018.pdf. [Accessed: 22-Sep-2019].
- [9] J. L. G. Da Silva, J. F. P. Rezer, C. F. Barcellos, and V. Battisti, “Prevalência De Co-Infecções Em Pacientes Hiv/Aids Na Região Noroeste Do Rio Grande Do Sul 1,” *Unijuí Univ. Reg.*, pp. 1–6, 2016.
- [10] “HIV.” [Online]. Available: [https://www.news-medical.net/health/HIV-1-versus-HIV-2-Whate28099s-the-Difference-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/health/HIV-1-versus-HIV-2-Whate28099s-the-Difference-(Portuguese).aspx). [Accessed: 22-Sep-2019].
- [11] J.M. Azevedo-Pereira, Pedro Canhão, Marta Calado, Quirina Santos- Costa and Pedro Barroca. “Repliação do HIV.” [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/trends-in-basic-and-therapeutic-options-in-hiv-infection-towards-a-functional-cure/inhibition-of-hiv-replication-by-host-cellular-factors>; [Accessed: 29-Sep-2019].

- [12] Direção-Geral da Saúde, “Diagnóstico e Rastreio Laboratorial da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana,” *Direção Geral da Saúde*, pp. 1–4, 2011.
- [13] V. Simon, D. D. Ho, and Q. A. Karim, “treatment,” vol. 368, no. 9534, pp. 489–504, 2010.
- [14] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde., “Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças,” p. 149, 2016.
- [15] D. P. Neves, A. L. Melo, P. M. Linardi, and R. W. A. Vitor, *PARASITOLOGIA HUMANA*, 11th ed. Atheneu.
- [16] L. Rey, *PARASITOLOGIA*, 4th ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN LTDA, 2008.
- [17] A. A. Aguirre *et al.*, “The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies,” *Ecohealth*, vol. 16, no. 2, pp. 378–390, 2019.
- [18] S. Halonen and L. Weiss, *Handb clin Neurol*. 2014.
- [19] S. A. Hosseini *et al.*, “Human toxoplasmosis: A systematic review for ótic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples,” *Epidemiol. Infect.*, vol. 147, 2019.
- [20] A. Vilares, I. Ferreira, S. Martins, and T. Reis, “Toxoplasmose: diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção entre 2009 e 2013,” *Observações*, vol. 4, no. 13, pp. 11–15, 2015.
- [21] A. Kompalic-Cristo, C. Britto, and O. Fernandes, “Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão,” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 41, no. 4, pp. 229–235, 2005.
- [22] Q. Liu, Z. D. Wang, S. Y. Huang, and X. Q. Zhu, “Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*,” *Parasites and Vectors*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [23] A. Basavaraju, “Toxoplasmosis in HIV infection: An overview,” *Trop. Parasitol.*, 2016.
- [24] F. Ayoade and A. Chamdranesan, “HIV-1 Associated Opportunistic Infections, Toxoplasmosis,” *Treasure Isl.*, 2019.
- [25] F. A. Campos, G. M. Q. de Andrade, A. de Pádua Santos Lanna, B. F. Lage, M. V. M. Assumpção, and J. A. Pinto, “Incidence of congenital toxoplasmosis among

- infants born to HIV-coinfected mothers: Case series and literature review,” *Brazilian J. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 6, pp. 609–617, 2014.
- [26] W. ZD *et al.*, “Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis,” *Lancet HIV*, 2017.
- [27] F. Wei, Z.-D. Wang, Y.-K. Zhao, X.-Q. Zhu, and Q. Liu, “Neglected risk factors for HIV and *Toxoplasma gondii* co-infection,” *Lancet HIV*, 2017.
- [28] C. S. Bambu *et al.*, “Usefulness of Stereotactic biopsy and neuroimaging in management of HIV-1 clade C associated focal brain lesions with special focus on cerebral toxoplasmosis,” *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 2013.
- [29] S. Bamba, J. Zoungrana, Z. Nikièma, A. K. Sondo, J. L. Ndiaye, and S. Bretagne, “Impact of alternative treatment approach for cerebral toxoplasmosis among HIV/AIDS patients from a resource-poor setting in Burkina Faso,” *Ann. Parasitol.*, vol. 63, no. 3, 2017.
- [30] E. Yenilmez and R. A. Çetinkaya, “Difference in *Toxoplasma gondii* Seroprevalence Rates Due to Low and High CD4 Counts in Patients with HIV/AIDS,” *Turkiye parazitolojii Derg.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–7, 2019.
- [31] O. Villard *et al.*, “Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 84, no. 1, pp. 22–33, 2016.
- [32] Direção-Geral da Saúde, “Norma n.º 025/2017 de 28/11/2017 atualizada a 16/05/2018,” pp. 1–20, 2018.
- [33] S. Rajapakse, P. Weeratunga, C. Rodrigo, N. L. de Silva, and S. D. Fernando, “Prophylaxis of human toxoplasmosis: a systematic review,” *Pathog. Glob. Health*, vol. 111, no. 7, pp. 333–342, 2017.
- [34] N. Konstantinovic, H. Guegan, T. Stājner, S. Belaz, and F. Robert-Gangneux, “Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives,” *Food Waterborne Parasitol.*, vol. 15, 2019.
- [35] P. H. Alday and J. S. Doggett, “Drugs in development for toxoplasmosis: Advances, challenges, and current status,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 11, pp. 273–293, 2017.

- [36] J. Fontoura, R. M. Lara, C. R. Borges, and J. C. Miné, “Seroprevalence of toxoplasmosis among HIV positive patients treated by SAE/CTA,” *Rev. Bras. Análises Clin.*, vol. 51, 2019.
- [37] J. Montoya and P. O. Liesenfeld, “Toxoplasmosis,” *Lancet*, 2004.
- [38] L. M. Weiss and J. P. Dubey, “Toxoplasmosis: a history of clinical observations,” *Int. J. Parasitol.*, 2009.
- [39] M. Zajdenweber, C. Muccioli, and R. Belfort, “Acometimento ocular em pacientes com AIDS e toxoplasmose do sistema nervoso central - Antes e depois do HAART,” *Arq. Bras. Oftalmol.*, vol. 68, no. 6, pp. 773–775, 2005.
- [40] G. Schäfer *et al.*, “Immediate versus deferred antiretroviral therapy in HIV-infected patients presenting with acute AIDS-defining events (toxoplasmosis, Pneumocystis jirovecii-pneumonia): A prospective, randomized, open-label multicenter study (IDEAL-study),” *AIDS Res. Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [41] J. E. Vidal, “HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease,” *J. Int. Assoc. Provid. AIDS Care*, vol. 18, pp. 1–20, 2019.
- [42] H. Safarpour, M. Cevik, M. Zarean, A. Barac, and K. Hatam-Nahavandi, “Global status of Toxoplasma gondii infection and associated risk factors in people living with HIV: A systematic review and meta-analysis,” 2019.
- [43] J. Wang, H. Elsheikha, T. Li, J. He, M. Bai, and Q. Liang, “Efficacy of antiretroviral compounds against Toxoplasma gondii in vitro,” *Int J Antimicrob Agents*, 2019.
- [44] B. Silva, V. Santos, I. Santos, M. Batista, L. Gonçalves, and L. Lemos, “Prevalence of coinfections in women living with human immunodeficiency virus in Northeast Brazil,” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2019.
- [45] W. P. Howlett, “Neurological disorders in HIV in Africa: A review,” *Afr. Health Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 1953–1977, 2019.
- [46] C. Jianu, S. D. Bolboacă, A. V. Topan, I. Filipescu, M. E. Jianu, and C. Itu-Mureșan, “A view of human immunodeficiency virus infections in the North-West region of Romania,” *Med.*, vol. 55, no. 12, pp. 1–10, 2019.

- [47] J. Portes and W. De Souza, “Development of an in vitro system, to study the developmental stages of *Toxoplasma gondii* using a genetically modified strain expressing markers for tachyzoites and bradyzoites,” *Protozool. - Orig. Pap.*, 2019.
- [48] E. A. Innes, C. Hamilton, J. L. Garcia, A. Chrysafidis, and D. Smith, “A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*,” *Food Waterborne Parasitol.*, vol. 15, 2019.

