

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO E MONOGRAFIA

Carina Sofia Medeiros Pavão

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, 2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Laboratório de Análises Clínicas Dr. José Aires Raposo & Dr.^a
Teresinha Raposo Lda.

Orientação: Dr. José Aires Raposo

Carina Sofia Medeiros Pavão

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, 2015

Agradecimentos

É com satisfação que expresso o meu agradecimento a todos os que contribuíram para que chegasse até aqui.

Aos meus pais, Cidália e Albano, pois sem eles nada disto seria possível. Obrigada por tudo, pelos valores transmitidos desde sempre, pelo amor e apoio incondicional em todos os sentidos. À minha irmã Paula, a quem devo muita da minha aprendizagem ao longo destes 25 anos.

À minha família, namorado e amigos, por me acompanharem, aconselharem e incentivarem durante este percurso.

Aos colegas de mestrado, pelos momentos que passamos juntos, pela amizade, troca de experiências e sabedoria.

Aos professores do Mestrado em Análises clínicas, pela aprendizagem que proporcionaram, em especial à Dr.^a Cristina Marques pela orientação na monografia.

Aos funcionários do laboratório onde estagiei, em especial ao Dr. José Aires Raposo e Dr.^a Mónica Azevedo, pela oportunidade de realizar esta fantástica experiência e por toda a paciência, amizade e conhecimentos transmitidos. Ao Dr. Gonçalo Raposo, por toda a amizade e disponibilidade.

Ao Dr. Luís Sequeira Dias do Hospital do Divino Espírito Santo, pelas aulas de hematologia prática e Dr.^a Elsa Freitas, pelo material disponibilizado para a monografia.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Índice

Resumo	11
Abstract.....	11
1. Caraterização do Laboratório de Estágio.....	12
2. Fase pré-analítica.....	13
2.1. Atendimento ao utente	13
2.2. Colheita das amostras	13
2.2.1. Colheita de sangue	14
2.3. Triagem e conservação das amostras	16
3. Valência de Microbiologia	18
3.1. Introdução	18
3.2. Ciclo de diagnóstico.....	18
3.2.1. Normas gerais de colheita	18
3.2.2. Exame microscópico	19
3.2.2.1. Exame a fresco.....	19
3.2.2.2. Exame após coloração	20
3.2.3. Exame cultural	21
3.2.4. Testes rápidos de identificação	25
3.2.5. Vitek [®] 2 Compact 15	27
3.2.5.1. Identificação de microrganismos	28
3.2.5.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos	29
3.3. Trato urinário	31
3.3.1. Urina.....	32
3.3.1.1. Colheita.....	32
3.3.1.2. Procedimento laboratorial.....	33
3.4. Trato genital	35
3.4.1. Exsudado vaginal	35
3.4.1.1. Colheita.....	35
3.4.1.2. Procedimento laboratorial.....	36
3.4.2. Exsudado uretral.....	38
3.4.2.1. Colheita.....	38
3.4.2.2. Procedimento laboratorial.....	38
3.5. Trato respiratório superior	39

3.5.1. Exsudado nasal.....	39
3.5.1.1. Colheita.....	40
3.5.1.2. Procedimento laboratorial.....	40
3.5.2. Exsudado faríngeo.....	40
3.5.2.1. Colheita.....	41
3.5.2.2. Procedimento laboratorial.....	41
3.6. Trato respiratório inferior	41
3.6.1. Expetoração.....	41
3.6.1.1. Colheita.....	41
3.6.1.2. Procedimento laboratorial.....	42
3.7. Trato gastrointestinal	43
3.7.1. Coprocultura.....	43
3.7.1.1. Colheita.....	43
3.7.1.2. Procedimento laboratorial.....	44
3.8. Olho.....	44
3.8.1. Exsudado ocular	45
3.8.1.1. Colheita.....	45
3.8.1.2. Procedimento laboratorial.....	45
3.9. Ouvido.....	46
3.9.1. Exsudado auricular.....	46
3.9.1.1. Colheita.....	46
3.9.1.2. Procedimento laboratorial.....	46
3.10. Exsudados purulentos	47
3.10.1. Amostra.....	47
3.10.1.1. Colheita.....	47
3.10.1.2. Procedimento laboratorial.....	47
4. Valência de Hematologia.....	48
4.1. Introdução	48
4.2. Hemograma.....	48
4.2.1. Cell-Dyn Sapphire.....	49
4.2.2. Eritrograma	50
4.2.3. Leucograma.....	52
4.2.4. Plaquetas	54

4.2.5 Reticulócitos.....	55
4.3. Estudo morfológico do sangue periférico	55
4.3.1. Técnica de execução do esfregaço	57
4.3.2. Coloração de MayGrunwald Giemsa	58
4.4. Velocidade de Sedimentação	58
4.4.1. Alifax Test 1 BCL.....	59
4.5. Hemoglobina glicosilada (HbA1C)	59
4.5.1. Adams HÁ 8160	60
4.6. Técnicas manuais em Imunohematologia	61
4.6.1. Grupo sanguíneo	61
4.6.1.1. Tipagem ABO e Rh	61
4.7. Estudo da coagulação.....	63
4.7.1. Tempo de protrombina.....	63
4.7.1.1. Fundamento do método	64
4.7.1.2. Procedimento	64
4.7.1.3. Interpretação de resultados	64
4.7.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada	64
4.7.2.1. Fundamento do método	65
4.7.2.2. Procedimento	65
4.7.2.3. Expressão do resultado	65
5. Valência de Bioquímica.....	66
5.1. Introdução	66
5.2. Cobas 6000 e parâmetros analisados	66
5.2.1. Glucose.....	68
5.2.1.1. Princípio do teste	68
4.2.1.2. Diagnóstico da Diabetes	68
5.2.2. Colesterol total	69
5.2.2.1. Princípio do teste	69
5.2.3. Colesterol HDL	70
5.2.3.1. Princípio do teste	70
5.2.4. Colesterol LDL.....	71
5.2.4.1. Método	71
5.2.5. Triglicéridos	71

5.2.5.1. Princípio do teste	71
5.2.6. Proteínas totais	72
5.2.6.1. Princípio do teste	72
5.2.7. Albumina.....	73
5.2.7.1. Princípio do teste	73
5.2.8. Proteína C reativa.....	73
5.2.8.1. Princípio do teste	74
5.2.9. Ácido úrico.....	74
5.2.9.1. Princípio do teste	74
5.2.10. Creatinina	74
5.2.10.1. Princípio do teste	75
5.2.10.2. <i>Clearance</i> da creatinina	75
5.2.11. Bilirrubina total e direta	75
5.2.11.1. Princípio do teste da bilirrubina total.....	76
5.2.11.2. Princípio do teste da bilirrubina direta.....	76
5.2.12. Ionograma	76
5.2.13. Cálcio	77
5.2.13.1. Princípio do teste	78
5.2.14. Fósforo	78
5.2.14.1. Princípio do teste	79
5.2.15. Magnésio.....	79
5.2.15.1. Princípio do teste	80
5.2.16. Ferro.....	80
5.2.16.1. Princípio do teste	81
5.2.17. Título de antiestreptolisina O (TASO).....	81
5.2.17.1. Princípio do teste	81
5.2.18. Fator reumatóide	81
5.2.18.1. Princípio do teste	81
5.2.19. Aspartato aminotransferase	82
5.2.19.1. Princípio do teste	82
5.2.20. Alanina aminotransferase	82
5.2.20.1. Princípio do teste	82
5.2.21. Gama glutamil transpeptidase	83

5.2.21.1. Princípio do teste	83
5.2.22. Fosfatase alcalina	83
5.2.22.1. Princípio do teste	83
5.2.23. Lactato desidrogenase	84
5.2.23.1. Princípio do teste	84
5.2.24. Creatinina cinase	84
5.2.24.1. Princípio do teste	84
5.2.25. Amilase	85
5.2.25.1. Princípio do teste	85
5.2.26. Fosfatase ácida	85
5.2.26.1. Princípio do teste	86
5.3. Eletroforese das proteínas plasmáticas	86
5.3.1. Minicap	87
5.4. Análise bioquímica da Urina	88
5.4.1. Urina tipo II.....	88
5.4.2. Urina a tempo determinado (urina de 24 horas)	90
5.4.3. Pesquisa de drogas de abuso	91
5.5. Pesquisa de sangue oculto nas fezes	91
5.5.1. Colheita da amostra.....	92
5.5.2. Princípio do método	92
6. Controlo de qualidade	93
6.1. Controlo de qualidade interno.....	93
6.2. Avaliação externa da qualidade	94
7. Conclusão	95
8. Bibliografia.....	96

Índice de figuras

Figura 1 - Tubos de soro, citrato e EDTA.	16
Figura 2 - Centrifugadora refrigerada e centrifugadora das urinas	16
Figura 3 – Colónias na gelose ChromID Candida e respetiva identificação	23
Figura 4 - Kit PASTOREX™ STAPH-PLUS_.....	26
Figura 5 - VITEK® 2 Compact 15	28
Figura 6 - Cartas de VITEK no respetivo suporte de manuseamento.	29
Figura 7 - Cell-dyn Sapphire® da <i>Abbott Diagnosis</i>	49
Figura 8 - Histograma de dispersão de volume dos eritrócitos	51
Figura 9 – Detalhe do sistema de deteção MAPSS™ da Abbott	54
Figura 10 - Alifax Test 1 BCL.....	59
Figura 11 - ADAMS A1c HA-8160	60
Figura 12 - Coagulómetro ST4 da STAGO.....	63
Figura 13 - Cobas 6000 <i>Analyser Series HITACHI Roche® Diagnostics</i>	66
Figura 14- Proteinogramas eletroforéticos: normal e patológico	87
Figura 15 - MINICAP - Sebia® electrophoresis	87
Figura 16 - Urisys 2400®.....	88
Figura 17 - Esquema ilustrativo do teste rápido bioNexia® Biomérieux	92

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação da qualidade da expectoração (Murray e Washington).	42
Tabela 2 - Principais parâmetros analisados e respetivo método	50
Tabela 3 - Interpretação de alterações nos eritrócitos	56
Tabela 4 - Aglutinação dos anticorpos consoante o grupo sanguíneo.....	62
Tabela 5 - Valores de INR e respetiva interpretação	64
Tabela 6 - Parâmetros analisados no Urisys 2400® e respetivo princípio do teste.....	89

Resumo

O presente trabalho é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e inclui o relatório de estágio das valências de Microbiologia, Hematologia e Bioquímica, realizado no laboratório Dr. Aires Raposo & Doutora Teresinha Raposo Lda. no período de 5 de fevereiro a 31 de julho de 2014.

Este relatório teve como objetivo fazer uma apresentação do local onde decorreu o estágio e descrever a atividade desenvolvida, destacando os parâmetros analíticos efetuados, os equipamentos utilizados, o fundamento dos métodos, as técnicas manuais, o controlo de qualidade e os aspetos mais relevantes no que diz respeito à experiência desenvolvida e ao enquadramento dos conhecimentos adquiridos no contexto geral do Laboratório e da sua aplicação à Clínica.

Abstract

This work is part of the Master's degree program in Clinical Analyses, Pharmacy School, University of Lisbon. It features the internship report in Microbiology, Hematology and Biochemistry clinical areas, produced and conducted in the Dr. Aires Raposo & Dr. Teresa Raposo laboratory from 5th February to 31st July 2014.

The report addresses the venue where the internship has taken place and describes the respective scientific work. In particular, it highlights the parameters, the types of samples and the equipment used, the foundation of the methods employed, and the quality control. By focusing on these and other most relevant aspects of the conducted experiments, the report provides a framework for the application of the acquired knowledge in the general context of laboratory work, with an emphasis on its application in the field of clinical medicine.

1. Caracterização do laboratório de estágio

O Laboratório de Análises Clínicas Dr. Aires Raposo & Dr.^a Teresinha Raposo Lda. situa-se na Rua da Misericórdia, no centro de Ponta Delgada. A direção técnica encontra-se a cargo do Dr. José Aires Raposo, farmacêutico especialista em análises clínicas.

Com uma capacidade de resposta multidisciplinar, este laboratório intervém na área da Hematologia e Coagulação, Alergologia, Urianálise, Rastreio pré-natal, Endocrinologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia. Dispõe de um serviço de recolha, tanto no próprio laboratório como em postos de colheitas e ao domicílio, e elabora parâmetros de urgência e de qualidade.

Apresenta instalações amplas e funcionais, bem iluminadas e climatizadas, de forma a garantir a satisfação de utentes e funcionários. Encontra-se na sua maioria automatizado com tecnologia avançada e totalmente informatizado.

O laboratório encontra-se certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008. A Política de qualidade envolve o desenvolvimento e aperfeiçoamento contínuo das técnicas e equipamentos, bem como a formação contínua dos seus colaboradores, por forma a garantir a satisfação das expetativas e exigências dos utentes.

2. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inclui o atendimento ao utente, a colheita e identificação da amostra, o transporte, conservação e triagem. É a fase mais sujeita a erros, sendo por isso importante que os procedimentos envolvidos estejam dotados de rigor, para que o resultado final seja clinicamente válido.

Durante o estágio tive a oportunidade de elaborar, em conjunto com o Dr. Gonçalo Raposo, uma pequena apresentação em formato PowerPoint sobre a fase pré-analítica, a qual apresentamos aos funcionários do laboratório, como parte do programa de formação interno.

2.1. Atendimento ao utente

A primeira etapa da fase pré-analítica no laboratório é o atendimento ao utente. Na receção deste laboratório encontram-se 2 técnicas administrativas cujas principais funções desempenhadas são: proceder ao atendimento dos utentes; informatizar os dados dos utentes, bem como as informações registadas na ficha do utente pelo técnico de colheitas; efetuar a cobrança do serviço prestado e respetivo controlo; imprimir, envelopar e arquivar os boletins após validação biopatológica dos resultados; receber e encaminhar visitantes (ex: fornecedores, auditores).

O atendimento é sempre efetuado pela ordem de chegada, à exceção dos utentes prioritários, como grávidas, crianças pequenas, diabéticos, deficientes e situações particulares de utentes com provas funcionais.

2.2. Colheita das amostras

Durante o estágio tive a oportunidade de aprender e realizar colheitas de sangue e exsudados vaginais, bem como interagir com os utentes e explicar-lhes como colher corretamente amostras de urina, fezes e expetoração.

Neste capítulo detalha-se a colheita das amostras de sangue, efetuada através de punção venosa. A colheita das restantes amostras será detalhada no seguimento do relatório.

2.2.1. Colheita de sangue

A colheita de sangue neste laboratório é feita por técnicos habilitados para o efeito. Idealmente o doente deverá estar sentado alguns minutos antes da colheita, por forma a minimizar variações na concentração dos constituintes do sangue. A escolha da veia deve permitir a recolha de sangue em quantidade suficiente. Normalmente a punção é efetuada na veia basílica, cubital mediana ou cefálica, mas em situações mais complicadas poderá ser efetuada a partir de outras veias (ex: veias do braço, mão). O procedimento de colheita consiste em:

- Reunir o equipamento necessário;
- Fazer a higienização das mãos;
- Identificar e preparar o utente;
- Escolher o local para a punção;
- Aplicar o garrote 4-5 dedos acima do local escolhido para a punção;
- Pedir ao paciente para que feche a mão, de modo a tornar as veias mais proeminentes;
- Calçar luvas bem ajustadas ao tamanho das mãos;
- Desinfetar o local usando álcool isopropílico a 70% e deixar secar completamente;
- Dar firmeza à veia segurando o braço do paciente e colocar o polegar abaixo do sítio da venopunção;
- Inserir a agulha com um ângulo de 30°;
- Uma vez colhida uma quantidade suficiente de sangue, aliviar o garrote antes de retirar a agulha;
- Retirar delicadamente a agulha e colocar algodão seco no local, exercendo uma ligeira pressão;
- Descartar a agulha usada para um recipiente apropriado (resíduos nível IV);
- Etiquetar os tubos e confirmar o número com o da requisição;
- Colocar no recipiente adequado (contentor nível III) os objetos dos quais podem gotejar sangue ou líquidos corporais;
- Descartar as luvas e fazer novamente a higienização das mãos.

No momento da colheita é importante ter em conta as variáveis pré-analíticas que poderão condicionar o resultado da análise. Algumas delas são controláveis, outras não.

A hora em que a colheita é realizada pode ter influência nas determinações dado que para alguns parâmetros analíticos existe variação circadiana (ex: cortisol). O tempo e a pressão imposta pelo garrote, assim como o stress do utente no ato da colheita, também são condicionantes. A escolha do material de punção também é importante, para evitar situações de hemólise, hematomas ou outras complicações. O laboratório dispõe do sistema de vácuo, sistema de agulha com asas ou “borboleta” e o sistema clássico de agulha e seringa.

Deve ter-se em conta o facto de o utente ser, por exemplo, atleta de alta competição, vegetariano, fumador, consumidor de álcool ou drogas, ou tomar certos medicamentos. Nestes casos, o técnico de colheitas deve conversar com o utente, de forma a obter o máximo de informação pertinente. Esta medida não só irá facilitar a interpretação de resultados laboratoriais, como ajudará o utente a ultrapassar o momento, pois descentra a sua atenção do ato da colheita.

De acordo com a análise requisitada, o técnico escolhe os tubos nos quais o sangue será colhido. O sangue pode ser colhido para tubo seco, do qual se obtém o soro, utilizado para a maioria das determinações analíticas na área da bioquímica, imunologia e endocrinologia. Para a obtenção de plasma, o sangue é colhido para um tubo com anticoagulante, que poderá ser EDTA ou citrato de sódio, salvo raras situações mais específicas.

O EDTA é o anticoagulante mais usado na rotina hematológica para a execução do hemograma, velocidade de sedimentação, hemoglobinas glicosiladas e grupos de sangue. Atua por quelação irreversível do cálcio, elemento essencial no processo de coagulação do sangue. O citrato trissódico também atua por quelação do cálcio, mas de forma fraca e reversível, sendo o anticoagulante de referência para o estudo da coagulação (na proporção de 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante).

Os tubos têm uma marca que indica o limite de enchimento do sangue colhido, para que a proporção sangue/anticoagulante seja respeitada. Se a quantidade de sangue colocada for superior, a quantidade de anticoagulante poderá não ser suficiente para exercer a função de quelante, e neste caso poderão surgir coágulos na amostra. Por outro lado, se o volume de sangue for inferior à quantidade indicada, o anticoagulante estará em excesso, podendo causar, entre outros, a alteração da morfologia celular.



Figura 1 - Tubos de soro, citrato e EDTA.

2.3. Triagem e conservação das amostras

O laboratório dispõe de uma área física para a triagem, onde se colocam as amostras colhidas em suportes adequados, ao abrigo da luz e de qualquer fonte de calor. A triagem é uma etapa importante, uma vez que dela podem ocorrer erros que comprometem os resultados das análises.

No período da manhã realiza-se a maior parte da atividade nesta área. As amostras de soro e plasma colhido em citrato são centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, numa centrifugadora refrigerada (Figura 2). Os volumes de urina a tempo determinado são medidos. As amostras são rastreadas utilizando o programa informático *Process Systems Manager* (PSM) da Roche®, através de uma unidade de leitura do código de barras, e são encaminhadas para os respetivos setores, juntamente com a folha de trabalho correspondente.



Figura 2 - Centrifugadora refrigerada e centrifugadora das urinas.

As amostras de soro e urina para análise bioquímica e imunológica são encaminhadas para estes setores através do elevador existente para o efeito. Depois de analisadas são

refrigeradas a -4°C ou congeladas na seroteca (-20°C). Quando a análise não é realizada no próprio dia, os soros são congelados na seroteca e posteriormente analisados dentro do prazo estipulado (recomendado nas bulas dos fornecedores), para que mantenham a viabilidade.

Amostras de urina para exame microscópico do sedimento (urinas tipo II e asséticas) são centrifugadas em centrifugadora própria (Figura 2).

As amostras para análise hematológica são encaminhadas diretamente para este setor, que está equipado com uma unidade informática própria para a rastreabilidade das amostras de sangue total em EDTA. Depois de analisadas são armazenadas a 4°C.

O hemograma é efetuado até 2 horas após a colheita para que não ocorram alterações a nível da contagem e morfologia celular. Os testes de coagulação devem ser realizados em 2 horas quando o plasma é mantido à temperatura ambiente e em 4 horas se conservado a 4°C. Quando uma análise não é realizada no próprio dia, os soros são congelados na seroteca.

As amostras para análise microbiológica são encaminhadas para este setor e, dependendo do tipo de produto biológico, o processamento é efetuado no momento ou a amostra é refrigerada a 4°C até à hora da manipulação.

3. Valência de Microbiologia

3.1. Introdução

O fluxo de trabalho no setor da Microbiologia no laboratório Dr. Aires Raposo & Dr.^a Teresinha Raposo Lda. abrange as áreas da bacteriologia, micologia e parasitologia, incidindo principalmente na análise de urinas, coproculturas e análise de exsudados (maioritariamente vaginais).

As colheitas do material biológico para análise microbiológica são efetuadas no laboratório e respetivos postos de colheitas, à exceção das fezes, expectoração, das urinas que também são colhidas nos domicílios (doentes com pouca mobilidade) e de algumas amostras vindas da Unidade de Saúde da ilha de Santa Maria.

Todas as amostras são processadas numa sala isolada para o efeito, onde se situam os aparelhos automáticos da microbiologia, zona de colorações e lavagens, bancada e estufa para o exame cultural, e zona para o exame microscópico. O processamento é efetuado no período da manhã, à exceção das urinas assépticas, em que o exame microscópico do sedimento e a sementeira são feitos no período da tarde.

Na elaboração do relatório procurou-se fazer uma apresentação geral do trabalho que realizado neste setor e inclui a colheita do produto biológico, o exame microscópico e cultural, os testes de identificação e de suscetibilidade aos antibióticos, bem como os aparelhos automáticos utilizados.

3.2. Ciclo de diagnóstico

3.2.1. Normas gerais de colheita

O laboratório de Microbiologia pode fornecer informação crucial para o diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas suspeitas ou confirmadas. No entanto, só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas por informação clínica pertinente. As informações que se descrevem a seguir, de modo geral, devem ser respeitadas para que o diagnóstico seja bem-sucedido.

- A colheita deve ser realizada em condições de assepsia e a amostra colhida deve ser representativa do local da infecção;
- A colheita deve ser feita sempre que possível antes de se iniciar a terapêutica anti-microbiana;
- Deve colher-se produto em quantidade suficiente para os exames requisitados;
- Os recipientes para a recolha de produtos líquidos não devem encher-se para além dos seus 2/3 de capacidade. Utilizar recipientes inquebráveis, esterilizados e de encerramento hermético;

Cada produto é devidamente identificado com código de barras no momento da colheita e são recolhidos dados relevantes para a orientação do diagnóstico, como queixas de odor, comichão, administração prévia de antibiótico.

3.2.2. Exame microscópico

O exame microscópico é a primeira etapa do estudo e identificação de um microrganismo e inclui o exame “a fresco” e o exame após coloração. Nesta fase é efetuado o estudo da morfologia, que irá variar consoante o microrganismo em questão. Além disso, os microrganismos podem ser acompanhados de elementos celulares cuja presença pode facilitar o diagnóstico. Nas situações em que a flora microbiana é mais complexa apenas o exame microscópico direto pode revelar a predominância de uma ou mais espécies.

3.2.2.1. Exame a fresco

O exame microscópico “a fresco” permite uma avaliação semi-quantitativa de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e microrganismos, sendo útil na análise de urinas assépticas, exsudados vaginal e uretral. É também utilizado no diagnóstico parasitológico em amostras de fezes ou urina e permite a deteção da mobilidade característica de *Trichomonas vaginalis*.

O procedimento consiste em colocar o produto no centro de uma lâmina, cobrir com uma lamela (para evitar a formação de bolhas de ar) e observar ao microscópio com objetiva de 40x (o condensador deverá estar em baixo e o diafragma fechado).

3.2.2.2. Exame após coloração

O exame microscópico corado permite precisar as características morfológicas das bactérias (forma e afinidade para corantes). As técnicas utilizadas são feitas sobre esfregaços secos e fixados pelo calor, o que faz com que as formas vegetativas morram, se tornem impermeáveis aos corantes e adiram à lâmina. A observação é feita com a objetiva de imersão (100x) com o condensador em cima e o diafragma aberto. Utilizam-se neste laboratório a coloração de Gram (COLOR GRAM 2 – F da Biomérieux) e Solução de Kinyoun – Gabett (BKK-F e BKG-F da Biomérieux).

A coloração de Gram é frequentemente utilizada para observação microscópica de produtos biológicos e de colônias isoladas provenientes do exame cultural. Esta coloração permite a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A diferença entre os dois tipos de células está na estrutura da sua parede celular: enquanto as bactérias Gram-positivas têm uma parede formada por uma camada espessa de peptidoglicano, a parede celular das Gram-negativas é formada por uma fina camada de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeos e proteínas. Diferenças na permeabilidade destas membranas aos reagentes químicos levam a diferenças de coloração.

Na técnica de Gram, utiliza-se primeiro um corante básico (cristal violeta) seguido de um agente fixador (iodo) que aumenta a afinidade da célula para o corante. Segue-se um agente descolorante (álcool e acetona) que remove o corante e, finalmente, um segundo corante básico (safranina). As células que retêm o primeiro corante são as Gram-positivas (coram de roxo) e as que descoram e ficam coradas pelo segundo corante são as Gram-negativas (coram de vermelho).

A Solução de Kinyoun – Gabett é utilizada na pesquisa de bactérias ácido-álcool resistentes (BAAR). É o caso de *Mycobacterium*, cuja parede celular é resistente à coloração. A fucsina básica (contida na solução de Kinyoun) cora todas as bactérias, sendo a sua ação melhorada pela presença de fenol. O ácido sulfúrico (contido na solução de Gabett) age como descolorante: as micobactérias têm a propriedade de não descorar sob a ação do ácido, contrariamente à maioria dos outros grupos de bactérias. O azul de metileno (contido na solução de Gabett) age como descolorante de contraste e facilita a observação microscópica.

Os bacilos álcool-ácido resistentes coram de vermelho pela fucsina, pois são os únicos elementos que resistem à ação descorante do álcool-ácido. Para facilitar a sua visualização, cora-se o fundo com azul de metileno, ficando assim um contraste nítido.

3.2.3. Exame cultural

No exame cultural é importante:

- Adequar os meios de cultura ao produto biológico a analisar, bem como aos microrganismos patogénicos que possam estar presentes neste mesmo produto biológico;
- Conhecer a temperatura e atmosfera de incubação ótimas para o crescimento dos microrganismos de interesse;
- Selecionar as colónias que requerem re-isolamento, identificação e/ou antibiograma.

Os meios de cultura são escolhidos conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório e podem ser:

- **Não seletivos:** sem inibidores de crescimento e com nutrientes, permitem o crescimento de qualquer microrganismo encontrado em produtos biológicos.
- **Seletivos:** com antibióticos, antifúngicos ou substâncias químicas, permitem o crescimento de alguns microrganismos em detrimento de outros, cujo crescimento é inibido.
- **Diferenciais:** com substâncias químicas ou corantes, que permitem distinguir grupos de microrganismos presentes no mesmo inóculo.
- **De enriquecimento:** com nutrientes, permitem a multiplicação de microrganismos de interesse que se encontram no produto biológico em baixo inóculo.
- **De transporte:** mantêm a viabilidade dos microrganismos mas inibindo a sua multiplicação.
- **De identificação:** evidenciam características bioquímicas de determinadas espécies, permitindo o seu reconhecimento e identificação.
- **De conservação:** mantêm os microrganismos num estado de vida latente.

Os meios de cultura são de natureza sólida, semi-sólida e líquida. Os meios **sólidos** permitem a observação de colónias de bactérias ou leveduras que se desenvolvem à superfície da gelose, com diferentes aspetos, cores e texturas que auxiliam na sua identificação. Os meios de cultura **semi-sólidos** são usados em estudos de mobilidade bacteriana e para o crescimento de microrganismos anaeróbios. Os meios de cultura **líquidos** são usados para o enriquecimento de produtos biológicos. Neste laboratório são utilizados meios de cultura sólidos e líquidos da BioMérieux®, que são descritos em seguida:

➤ Gelose CLED

O meio de cultura CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) é não seletivo, utilizado para o isolamento de microrganismos urinários. Também permite diferenciar os microrganismos que fermentam a lactose dos não fermentativos.

As bactérias lactose-positivas originam colónias amarelas-pálidas e amarelas por acidificação do meio. As lactose-negativas originam colónias verdes, azuis ou incolores. A composição do meio permite limitar a invasão da gelose por *Proteus*.

➤ ChromID™ CPS Agar

Este é um meio de isolamento e de identificação que se destina às amostras urinárias. Permite efetuar a contagem microbiana da amostra e identificação da espécie ou dos géneros bacterianos.

A cor revelada pelas colónias permite a identificação das seguintes bactérias: *Escherichia coli* (apresenta coloração espontânea rosa a *bordeaux*); *Enterococcus* (apresentam coloração espontânea turquesa); grupo KESC, constituído por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (apresenta coloração espontânea azul-verde a azul-cinza) e *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* (apresentam coloração espontânea castanha).

➤ Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes. A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise, que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana.

Características hemolíticas:

Sem hemólise – o meio não muda de cor;

Alfa-hemólise – presença de uma zona verde à volta da colónia;

Beta-hemólise – presença de uma zona clara à volta da colónia.

➤ Gelose Chocolate PolyviteX

É um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes como *Neisseria* e *Haemophilus*, que não crescem na gelose de sangue. A gelose é composta por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyviteX.

➤ Caldo Coração – cérebro (BHI)

Este caldo é não seletivo e está especificamente adaptado ao crescimento dos microrganismos aeróbios exigentes. É composto por uma base nutritiva enriquecida.

➤ Gelose chromID TM Candida

Destina-se ao isolamento seletivo das leveduras, à identificação da espécie *C. albicans* e à identificação presuntiva de um conjunto de espécies que agrupa *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, e *C. kefyr*.

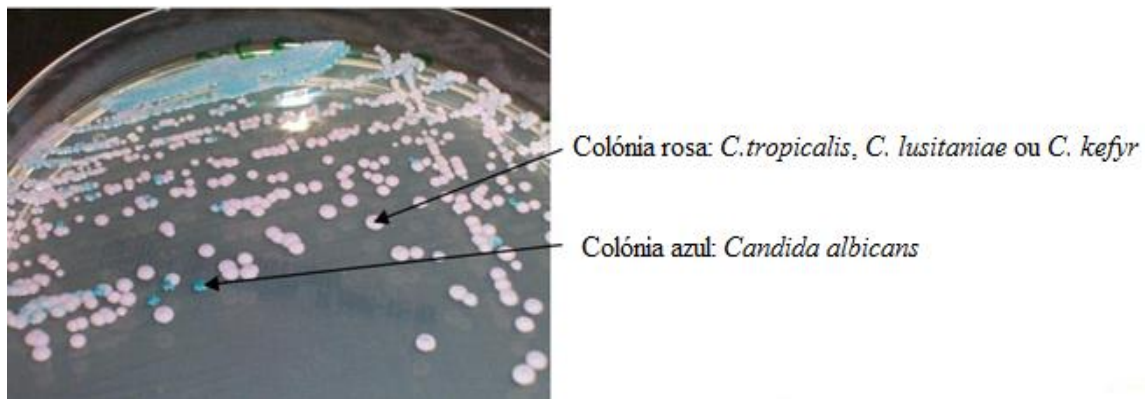


Figura 3 - Colónias na gelose chromID Candida e respetiva identificação.

Fonte: <http://www.microbiologie-medicale.fr/mycologie/identificationchampignons.htm>

A hidrólise específica de um substrato cromogénio de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima leva à coloração azul das colónias de *C. albicans*. A eventual hidrólise de um segundo substrato permite diferenciar as culturas mistas e orientar a identificação para outras espécies. As colónias que hidrolisam este substrato são

pigmentadas de rosa. A mistura de um inibidor permite inibir o crescimento da maior parte das bactérias.

➤ Caldo GranadaTM bifásico

Este é um meio seletivo utilizado para a detecção e a identificação de *Streptococcus agalactiae* nas mulheres grávidas.

O caldo é constituído por uma base nutritiva que associa uma peptona, piruvato e glucose. A presença de metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento laranja-avermelhado específico das colónias de estreptococos hemolíticos do grupo B. A mistura de antibióticos que o compõe inibe a maioria das bactérias Gram-negativas e leveduras.

➤ Caldo Selenito

Destina-se ao enriquecimento de *Salmonella* a partir das fezes. A seletividade do meio baseia-se na presença de selenito, que inibe bactérias Gram-positivas e a maioria dos Gram-negativos fecais, com exceção da *Salmonella*. Após a etapa de enriquecimento, o caldo deve ser repicado em meios destinados à detecção da *Salmonella*.

➤ Gelose SS

É um meio de isolamento seletivo e diferencial destinado à pesquisa das espécies de *Salmonella* e *Shigella* a partir de fezes. O meio permite evidenciar colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H₂S). Os microrganismos que fermentam a lactose (Lac +) originam colónias rosa, os outros (Lac -) originam colónias incolores. Os microrganismos que produzem H₂S originam colónias com centro negro. A presença de colónias incolores ou ligeiramente coloridas com ou sem centro negro representa uma forte possibilidade de *Salmonella* ou *Shigella*. A inibição das bactérias Gram-positivas obtém-se pela mistura de sais biliares e de corantes.

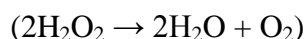
As condições de incubação dos meios de cultura vão variar consoante as necessidades dos microrganismos em pesquisa. A temperatura a 37°C é fornecida por uma estufa, e o meio enriquecido em CO₂ é obtido através do sistema de jarra com vela acesa.

3.2.4. Testes rápidos de identificação

Após o isolamento de um microrganismo em meio de cultura procede-se à sua identificação baseada nas suas características metabólicas. São vários os testes rápidos que auxiliam na identificação das bactérias. De seguida, descrevem-se os testes utilizados no decorrer do estágio.

➤ ID color Catalase (ID – ASE)

Este teste permite evidenciar a presença de uma catalase nas bactérias que a possuem. É detetada nos microrganismos por libertação de oxigénio a partir de água oxigenada. A enzima desdobra o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio:



A presença de um agente espessante e de um corante (azul de Evans) facilitam a observação da emissão gasosa. O procedimento consiste em colocar na lâmina uma gota de ID color Catalase e, de seguida, dispersar uma a duas colónias na gota.

A reação positiva traduz-se pela emissão imediata de bolhas de oxigénio. O teste é utilizado para distinguir *Staphylococcus spp.* (catalase-positivos, observa-se a emissão de bolhas) de *Streptococcus spp.* (catalase-negativos).

➤ PASTOREX STAPH-PLUS

Este teste foi desenvolvido para dar uma resposta rápida na identificação de *Staphylococcus aureus*. Consiste num teste de aglutinação em látex, com deteção simultânea do fator de afinidade para o fibrinogénio (*clumping factor*), proteína A (com afinidade para o fragmento Fc das IgG) e polissacáridos capsulares. A combinação de fibrinogénio, IgG e anticorpos monoclonais anti-capsulares no mesmo reagente permite o reconhecimento de estirpes muito e pouco encapsuladas. Para estirpes muito encapsuladas, os anticorpos contra os polissacáridos capsulares aglutinam a bactéria. Para estirpes que perderam o polissacárido capsular, a bactéria é aglutinada pelo fibrinogénio e IgG.

Os isolados de *S. aureus* são misturados no látex com o reagente, visualizando-se a presença de aglutinação, que indica a presença de *S. aureus*.



Figura 4 - Kit PASTOREX™ STAPH-PLUS

O procedimento consiste em dissolver uma colónia de *Staphylococcus spp.* numa gota de reagente sobre a carta de aglutinação fornecida no kit. Uma reação positiva é revelada pelo aparecimento de coágulos. A figura 4 mostra a realização do teste em colónias suspeitas, isoladas da gelose CPS.

➤ SLIDEX® Strepto Plus

Permite a grupagem de *Streptococcus* β-hemolíticos dos grupos A, B, C, D, F e G segundo a classificação de Lancefield.

Os estreptococos β-hemolíticos possuem frequentemente antígenos específicos do grupo no qual se inserem que podem ser extraídos e identificados com anti-soros. Os reagentes são constituídos por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos dirigidos contra os antígenos de grupo. A presença de antígenos correspondentes provoca uma aglutinação visível das partículas de látex. O procedimento consiste em:

- Depositar numa carta uma gota de cada um dos látex previamente homogeneizados nos locais correspondentes, e colocar uma gota de suspensão da colónia suspeita.
- Utilizando um bastonete (fornecido no kit), misturar as duas gotas utilizando toda a superfície de cada zona reacional.
- Dar à carta um movimento de rotação durante 2 minutos e ler sob luz normal. Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento de uma aglutinação nítida.

Se o antígeno estiver presente, o reagente látex correspondente é aglutinado. Se o antígeno estiver ausente, o reagente látex permanece em suspensão homogénea.

➤ Teste da Oxidase

O teste é utilizado na diferenciação dos bacilos de Gram negativo com metabolismo oxidativo (*Pseudomonas spp.* e *Neisseria spp.*) dos oxidase-negativos (Enterobacteriaceas).

Este deteta a presença da enzima citocromo oxidase, a qual catalisa a reação de oxidação do citocromo C pelo oxigénio molecular e intervém na cadeia respiratória da bactéria. Na presença de oxigénio na atmosfera e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina, para formar um composto colorido violeta, o indofenol. O ácido ascórbico, incorporado no reagente, age enquanto agente redutor para limitar a auto-oxidação e melhorar a estabilidade do reagente.

O procedimento consiste em distribuir 1 a 2 gotas de reagente num disco impregnado de 6mm e espalhar, de seguida, a colónia sobre o disco. O aparecimento (em 10 a 30 segundos) de uma coloração violeta indica um teste positivo, enquanto reações tardias e ausência de cor indicam um teste negativo.

➤ Teste com Optoquina

O teste permite diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de outros estreptococos α -hemolíticos. A optoquina é uma substancia que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição na cultura em placa.

Uma colónia bem isolada é semeada numa placa de gelose de sangue, com estrias apertadas de forma a gerar colónias confluentes. O disco de optoquina é colocado no centro da área semeada e incubado a 37°C durante 24 horas, em atmosfera enriquecida com CO₂. Mede-se o diâmetro do halo de inibição à volta do disco. Um halo superior ou igual a 15mm indica a eventual presença de *S. pneumoniae*.

3.2.5. Vitek[®]2 Compact 15

No laboratório é utilizado o sistema automático VITEK[®]2 Compact 15 (bioMérieux) para a identificação de microrganismos de interesse e estudo da suscetibilidade a agentes antimicrobianos.

O aparelho possui uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas, uma zona de incubação e leitura automática de cartas (por turbidimetria e colorimetria) e um *software* e base de dados que analisa e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho. O reconhecimento das cartas de identificação e de antibiograma é feito através de uma unidade de leitura de códigos de barras. O *software* inclui o chamado AES (*Advanced Expert System*), o qual cruza a informação da identificação e do antibiograma. Esta informação permite a avaliação dos valores de CMI e a identificação de alguns fenótipos de acordo com os resultados obtidos. Esta avaliação indica se o resultado do antibiograma é consistente com a bactéria identificada.



Figura 5: VITEK[®] 2 Compact 15

Os microrganismos são identificados e em seguida são feitos os seus antibiogramas por este sistema. O procedimento é executado de acordo com as indicações do fornecedor e consiste em fazer suspensões padronizadas das colónias (colónias puras + solução salina de VITEK[®]) segundo Mac Farland.

3.2.5.1. Identificação de microrganismos

As cartas de identificação utilizadas possuem poços que contêm substratos bioquímicos desidratados. Não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina deste modo o risco de omissão ou erro durante a manipulação. No laboratório foram utilizadas as seguintes cartas de identificação bacteriana:

GN – Identificação de bactérias de Gram negativo;

GP – Identificação de bactérias de Gram positivo.

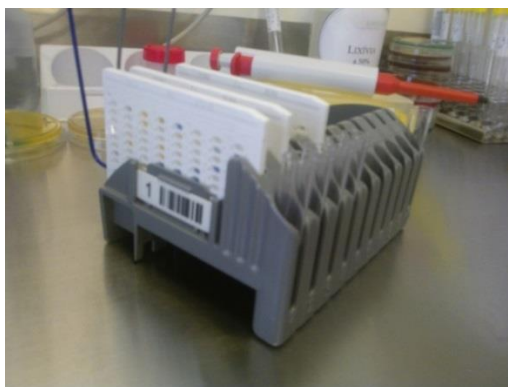


Figura 6 - Cartas de VITEK no respetivo suporte de manuseamento.

3.2.5.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos

O TSA baseia-se na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro* na presença de diferentes fármacos. Deve realizar-se 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 testes de suscetibilidade estão principalmente indicados quando o microrganismo pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados.

O TSA nas cartas do VITEK[®]2 Compact 15 consiste numa combinação de fármacos para determinados microrganismos em que o resultado é dado como sensível, resistente ou intermédio ao antibiótico. Neste laboratório, utilizam-se as seguintes cartas de TSA:

AST-N244 – Carta para determinação da sensibilidade de bacilos Gram-negativos com significado clínico. Contém os seguintes antibióticos:

- | | |
|---------------------------------|---|
| - Amoxicilina/Ácido Clavulânico | - Ertapenem |
| - Ampicilina | - ESBL (β -lactamases de largo espectro) |
| - Cefalotina | - Fosfomicina |
| - Cefditoren | - Gentamicina |
| - Cefepime | - Imipenem |
| - Cefotaxima | - Ácido nalidíxico |
| - Cefoxitina | - Nitrofurantoína |
| - Ceftazidima | - Tobramicina |
| - Cefuroxima | - Trimetoprim/Sulfametoxazol |

- Ciprofloxacina

AST-P586 – Carta para a determinação da sensibilidade de Gram positivos, nomeadamente *Enterococcus spp.* e *S. agalactiae*. Contém os seguintes antibióticos:

Ampicilina	Moxifloxacina
Ampicilina/Sulbactam	Nitrofurantoína
Benzilpenicilina	Quinopristina/Dalfopristina
Cefuroxima	Estreptomicina alta conc.
Clidamicina	Teicoplanina
Eritromicina	Tetraciclina
Gentamicina alta conc.	Tigeciclina
Imipenem	Trimetoprim/Sulfametoxazol
Levofloxacina	Vacomina
Linezolid	

AST-P619 – Carta para a determinação da sensibilidade de Gram positivos, nomeadamente *Staphylococcus spp.* que contém os seguintes antibióticos:

Benzilpenicilina	Linezolid
Cefotixina	Moxifloxacina
Clindamicina	Mupirocina
Daptomicina	Nitrofurantoína
Eritromicina	Oxacilina
Fosfomicina	Rifampicina
Ácido fusídico	Teicoplanina
Gentamicina	Tetraciclina
Vancomicina	Tigeciclina
Levofloxacina	Trimetoprim/Sulfametoxazol

AST-N222 – Carta para a determinação da sensibilidade de *Pseudomonas spp.*, que contém os seguintes antibióticos:

Amicacina	Minociclina
Aztreozam	Pefloxacina

Cefepima	Piperacilina
Ceftazidima	Piperacilina/Tazobactam
Ciprofloxacina	Rifampicina
Colistina	Ticarcilina
Gentamicina	Ticarcilina/Ácido Clavulânico
Imipenem	Tobramicina
Meropenem	Trimetoprim/Sulfametoxazol

Para cada microrganismo isolado é testado um painel alargado de antibióticos disponíveis nas cartas do aparelho automático, mas o relatório final entregue ao clínico inclui apenas alguns antibióticos, que são selecionados de acordo com as regras estabelecidas pelo laboratório. Por exemplo, antibióticos intermédios no Vitek® são reportados como resistentes. Também se consideram casos específicos em que a administração de determinados antibióticos é desaconselhada, como os antibióticos do grupo das quinolonas em grávidas e crianças, pois afetam a cartilagem de crescimento, interferindo no desenvolvimento ósseo.

3.3. Trato urinário

As infeções do trato urinário são muito comuns, especialmente em mulheres. Calcula-se que 10 a 20% das mulheres terão uma infeção urinária durante a vida e um número significativo apresenta infeções recorrentes.

A infeção urinária aguda é normalmente adquirida por via ascendente, causada por bactérias da flora intestinal saprófita através de contaminação fecal. As vias hematogénica (secundária a uma septicémia), iatrogénica (flora comensal) ou exógena (introduzida por cateter ou sonda vesical) são menos comuns. Os sintomas incluem dor, frequência e urgência em urinar em pequenas quantidades. É ainda de referir a bacteriúria assintomática, que geralmente só requer terapêutica em situações especiais, nomeadamente grávidas, mulheres que realizaram cirurgia genito-urinária e transplantados de rim.

Os agentes etiológicos predominantes nas infeções do trato urinário são do grupo *Enterobacteriaceae*, com destaque para a *Escherichia coli*.

3.3.1. Urina

3.3.1.1. Colheita

A urina é um fluido biológico habitualmente estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que usualmente a colonizam, podendo induzir a erros na interpretação da urocultura. A colheita da amostra é um passo muito importante para o sucesso do diagnóstico, uma vez que se não houver uma boa colheita, facilmente esta se contamina e torna-se necessária a sua repetição. Para o diagnóstico de infeção do trato urinário são válidas várias amostras, nomeadamente jato médio, punção de cateter urinário (algália), saco coletor (crianças sem controlo dos esfíncteres), punção supra-púbica, drenagem de nefrostomia e punção renal. Deve ser colhida a primeira urina da manhã. As urinas são refrigeradas a 4°C e processadas até 24 horas após a colheita. Chegam ao laboratório para análise urinas colhidas por “jato médio”, saco coletor e, punção de cateter urinário.

Na colheita por “**jato médio**”, o utente é alertado previamente para o seguinte procedimento:

- Lavar as mãos com água e sabão;
- Usando uma compressa esterilizada embebida em água e sabão neutro (disponibilizada pelo laboratório) lavar, na mulher, a vulva, sempre da frente para trás e, no homem, puxar o prepúcio e lavar a glândula;
- Remover o sabão com uma compressa esterilizada embebida em água e em seguida secar com compressa esterilizada;
- Com as mãos, afastar os grandes lábios ou prepúcio mantendo-os nessa posição durante o processo, e com a outra mão segurar no recipiente esterilizado próprio para a recolha de urina;
- Rejeitar as primeiras gotas e colher o jato médio para o recipiente, desperdiçando a restante urina;

No caso das crianças sem controlo dos esfíncteres (**saco coletor**), o procedimento consiste em:

- Lavar as mãos com água e sabão;

- Colocar o bebê numa superfície plana e retirar a fralda (este laboratório possui um muda-fraldas para o efeito);
- Lavar os genitais externos com água e sabão neutro, com auxílio de uma compressa esterilizada.
- Colar o saco coletor em torno do meato urinário;
- Mudar o saco de 30 em 30 min caso a criança ainda não tenha urinado.

Em indivíduos **algaliados** a colheita não é efetuada no laboratório. Esta deve ser feita por aspiração no local referenciado para o efeito, ou por punção da algália. Não é aceitável uma colheita de urina realizada a partir do saco coletor da algália. O procedimento consiste em:

- Clampar a algália durante 10 minutos, imediatamente abaixo da derivação;
- Desinfetar as mãos e colocar luvas esterilizadas;
- Desinfetar o local a puncionar com álcool a 70%, uma extensão de 5-10 cm e deixar secar;
- Puncionar (com um ângulo de 45°) a parte oposta ao lúmen do balão, utilizando um tubo esterilizado com ácido bórico adaptado a uma agulha subcutânea e aspirar a urina;
- Retirar a pinça de clampagem e desinfetar o local de punção com álcool a 70% após a colheita;
- Homogeneizar a urina invertendo o tubo várias vezes.

3.3.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Para o exame a fresco do sedimento urinário: Efetua-se após centrifugação de 10 ml de urina a 1500-2000 rpm, durante 5 minutos. São pesquisados e contabilizados (média/campo) no sedimento: células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, elementos leveduriformes e parasitas. A presença de muitos leucócitos bem como de eritrócitos faz suspeitar uma infecção. A observação de numerosas células epiteliais escamosas, de lactobacilos ou flora mista sugere uma má colheita.

Para o exame após coloração utiliza-se a Coloração de Gram.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são a Gelose CLED ou Gelose CPS. Pode também semear-se a urina no meio CAN2, caso se tenha verificado a presença de leveduras no exame microscópico do sedimento. Semeia-se diretamente a partir da urina com uma ansa calibrada de 10 µl, segundo o procedimento seguinte:

- Emergir a ansa verticalmente na urina previamente homogeneizada e descarregar a urina na placa através de um raio vertical seguido de estrias perpendiculares apertadas em toda a superfície da placa.
- Incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.

Interpretação de resultados

Após incubação, observam-se as placas de CLED ou CPS e faz-se a contagem do número colónias. O cálculo da concentração bacteriana é efetuado tendo em conta a densidade das colónias presentes na placa:

Nº de UFC/ml $< 10^4$ → Contaminação provável;

Nº de UFC/ml entre 10^4 e 10^5 → A urina deve ser avaliada segundo critérios clínicos;

Nº de UFC/ml $> 10^5$ → Provável infeção urinária.

Considera-se contaminação a presença de 2 ou mais colónias diferentes num Nº de UFC/ml $< 10^4$. No caso de haver uma colónia predominante com um Nº de UFC/ml $> 10^5$, esta deverá ser investigada tendo em conta a história clínica do utente, presença de sintomatologia, gravidez, etc.

Além da densidade das colónias, avalia-se a cor, o cheiro e a textura da colónia. A colónia de interesse é repicada para um meio cromogénico (CPS). Se necessário, recorre-se a testes de identificação complementares e Gram. Depois é feita, no sistema automático Vitek[®], a identificação do microrganismo (se necessário) e antibiograma.

3.4. Trato genital

A flora normal do trato genital inclui vários microrganismos, dependendo da região. Na vagina e uretra encontram-se Enterobacteriaceas, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, entre outros. Na vagina encontram-se ainda *Lactobacillus spp.* O colo do útero é normalmente estéril, podendo estar contaminado com flora vaginal em pequena quantidade.

Na mulher, os agentes comuns de infeções incluem *Neisseria gonorrhoeae* associada a cervicites, assim como *Mycoplasma sp.* e *Chlamydia trachomatis*; *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis* estão associadas a vulvo-vaginites que apresentam quadros de leucorreias esbranquiçadas e esverdeadas, respetivamente, acompanhadas de queimaduras vaginais; *Gardnerella vaginalis* é o agente causador de vaginose bacteriana, e as manifestações clínicas passam por leucorreias acinzentadas e mucosas, com odor característico.

Em grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gravidez é feita a pesquisa de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B de Lancefield (*Streptococcus agalactiae*) de modo a prevenir a contaminação materno-fetal durante o parto, uma vez que este microrganismo é responsável por meningites e pneumonias no recém-nascido.

Nos homens, os agentes comuns de infeções são *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, que causam doenças como uretrite e epididimite; bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp.* são responsáveis por prostatites e orquites.

As pesquisas de *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis* não são realizadas no laboratório.

3.4.1. Exsudado vaginal

3.4.1.1. Colheita

Durante o estágio tive a oportunidade de realizar este procedimento que é sempre efetuado por profissionais qualificados para o efeito.

Durante a colheita, deve questionar-se a utente sobre a presença de comichão, ardor, cor do corrimento, etc. A utente não deverá ter feito qualquer tratamento local nos três dias

que antecederam a colheita e no próprio dia não deverá ter efetuado a sua higiene íntima. O procedimento consiste em:

- Na posição ginecológica, introduzir um espéculo (sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril) no endocolo vaginal;
- Colher o exsudado das paredes vaginais com recurso a uma zaragatoa seca em movimentos rotativos;
- Repetir o procedimento, uma vez que a primeira zaragatoa é destinada ao exame cultural e a segunda ao exame microscópico corado e teste de KOH a 10%;
- Inserir a 3ª zaragatoa no caso de haver pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em utentes grávidas entre as 35 e 37 semanas de gestação.

A lâmina para o exame corado é feita logo após a colheita, seguida do teste de KOH a 10% para avaliação do cheiro. O produto biológico deve ser conservado a 37°C durante 30 minutos até ao processamento laboratorial.

3.4.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

O exame macroscópico poderá orientar no diagnóstico:

- Pús amarelo: suspeita de *N. gonorrhoeae*;
- Corrimento amarelo/verde líquido: suspeita de *Trichomonas vaginalis*;
- Pús espesso branco – suspeita de fungos;
- Corrimento espesso amarelo e inodoro – suspeita de Enterobactérias

A amostra deverá ficar na estufa a 37°C durante 30 minutos após a colheita. É então efetuado o exame a fresco para pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e elementos leveduriformes, contagem de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos. É ainda feita a observação e semi-quantificação de Bacilos de Doderlein (*Lactobacillus spp.*).

A coloração de Gram é utilizada para semi-quantificar Bacilos de Doderlein, pesquisar outras bactérias e “clue cells” (células epiteliais recobertas de bactérias com Gram variável), que poderão ser sugestivas de vaginose bacteriana por *Gardnerella vaginalis*.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são a Gelose Chocolate Polyvitex (PVX), Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro (COS) e Gelose chromID™ Candida (CAN2). A zaragatoa é descarregada em todos os meios e a sementeira feita por quatro quadrantes com recurso a uma ansa, por forma a obter colónias isoladas.

As placas de PVX e COS são incubadas a 37°C, durante 24 horas numa atmosfera enriquecida em CO₂. A gelose CAN2 é incubada 24 horas, a 37°C, em aerobiose e outras 24 horas à temperatura ambiente, em aerobiose. É observada às 24 e às 48 horas.

Para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* nas grávidas utiliza-se o Caldo Granada™ bifásico (Granada™ – T). A zaragatoa é diretamente semeada no caldo previamente hidratado com 3 mL de água destilada e o meio é encubado a 37°C, durante 24 horas. Após a primeira leitura, a incubação é prolongada 24 horas suplementares em caso de ausência de viragem do meio.

Interpretação de resultados

Após exame direto e observação dos meios de cultura, faz-se a identificação e o respetivo antibiograma de colónias suspeitas no Sistema automático VITEK® 2 Compact 15.

Colónias pequenas e transparentes no PVX que não tenham crescido na gelose COS podem indicar a presença de *Neisseria Gonorrhoeae*, pelo que as placas devem ser cuidadosamente interpretadas. A coloração Gram revela diplococos de Gram negativo e o teste da oxidase é positivo.

Na gelose COS, a presença de colónias pequenas com uma zona clara à volta é sugestiva de β-hemólise. Deve completar-se a identificação com a pesquisa de catalase e o kit SLIDEX Strepto Plus.

Na gelose CAN2, verifica-se a presença de colónias azul pálido a azul escuro, que são características de *Candida albicans*. Colónias brancas são reportadas como *Candida spp.*

Na pesquisa orientada de *Streptococcus agalactiae* nas grávidas, se houver viragem do meio (coloração alaranjada), o resultado é dado como positivo.

3.4.2. Exsudado uretral

3.4.2.1. Colheita

A colheita ideal deve ser feita antes da primeira micção ou uma hora após micção. O utente não deverá ter efetuado qualquer tratamento local nos três dias que antecederam a colheita e, no próprio dia, não deverá ter efetuado a sua higiene íntima. O procedimento consiste em:

- Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze esterilizada;
- Introduzir uma zaragatoa com um movimento de rotação cerca de 2 cm dentro da uretra (destinada a exame cultural);
- Repetir o procedimento com uma segunda zaragatoa (destinada a exame direto).

3.4.2.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

A amostra deverá ficar a 37°C durante 30 minutos após a colheita. É então efetuado o exame **a fresco** para pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e elementos leveduriformes, contagem de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos.

Exame após coloração: Coloração de Gram

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são a Gelose Chocolate Polyvitex (PVX), Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro (COS) e Gelose chromID™ Candida (CAN2). A zaragatoa deve ser descarregada em todos os meios e a sementeira feita por quatro quadrantes com recurso a uma ansa.

As placas de PVX e COS são incubadas a 37°C, durante 24 horas, numa atmosfera rica em CO₂. A gelose CAN2 é incubada 24 horas, a 37°C, em aerobiose e outras 24 horas à temperatura ambiente, em aerobiose. É observada às 24 e 48 horas.

Interpretação de resultados

Após exame direto e observação dos meios de cultura, faz-se a identificação e o respetivo antibiograma de colónias suspeitas no Sistema automático VITEK® 2 Compact 15.

Colónias pequenas que cresçam na gelose PVX que não tenham crescido na gelose COS podem indicar a presença de *Neisseria Gonorrhoeae*, pelo que as placas devem ser cuidadosamente interpretadas. A coloração Gram revela diplococos de Gram negativo e o teste da oxidase é positivo.

Na gelose COS, deve verificar-se a presença de hemólises características e identificar o microrganismo isolado por testes complementares.

Na gelose CAN2, verifica-se a presença de colónias azul pálido a azul escuro, que são características de *Candida albicans*. Colónias brancas são reportadas como *Candida spp.*

3.5. Trato respiratório superior

As infeções do aparelho respiratório superior são muito frequentes, maioritariamente de etiologia viral.

A existência de uma flora normal da naso e orofaringe previne a colonização do trato respiratório por microrganismos patogénicos. No entanto, a flora normal poderá tornar-se patogénica, em situações de baixa imunológica ou lesão. Fazem parte desta flora vários microrganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis* e *gonorrhoeae*, *Klebsiella spp.* e outras Enterobacteriaceas, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, leveduras, entre outros.

3.5.1. Exsudado nasal

Utilizado essencialmente para fins epidemiológicos, na deteção de portadores de *Staphylococcus aureus*. No entanto, reportam-se ao médico outros microrganismos potencialmente patogénicos encontrados.

3.5.1.1. Colheita

A colheita consiste em inserir uma zaragatoa em cada narina até se encontrar resistência. Colher o produto em movimentos rotativos suaves contra a mucosa nasal. Repetir o procedimento com uma segunda zaragatoa.

3.5.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Coloração Gram para pesquisa de células epiteliais, leucócitos e bactérias.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são a Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) e Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro (COS) Descarrega-se a zaragatoa em todos os meios e faz-se a sementeira por quatro quadrantes com recurso a uma ansa. Os meios são incubados a 37°C, durante 24 horas, numa atmosfera enriquecida em CO₂.

Interpretação de resultados

Para a deteção de portadores de *S. aureus*, caso se verifique a presença de halo de β-hemólise na gelose de sangue (COS), procede-se à identificação da colónia suspeita, através de testes complementares: se Catalase positiva → PASTOREX™ STAPH-PLUS.

Colónias que cresçam na gelose PVX que não tenham crescido na gelose COS podem indicar a presença de *Haemophilus influenza*, pelo que as placas devem ser cuidadosamente interpretadas.

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

3.5.2. Exsudado faríngeo

Neste produto biológico faz-se essencialmente a pesquisa de *Streptococcus* do grupo A, C e G.

3.5.2.1. Colheita

Pedir ao utente que abra a boca, afastar a língua com recurso a uma espátula de madeira e colher o produto ao nível das amígdalas e porção posterior da faringe utilizando uma zaragatoa seca. Durante o procedimento deve evitar-se o contacto com outras regiões da cavidade oral, a fim de minimizar a contaminação.

3.5.2.2. Procedimento laboratorial

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são o Caldo Coração – cérebro (BHI–T) para enriquecimento e a Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS). O caldo é incubado a 37°C, em aerobiose, durante 24 horas. A gelose de sangue deve ser incubada a 37°C em atmosfera enriquecida com CO₂, durante 24 horas.

Interpretação de resultados

No caso de se observarem colónias pequenas, transparentes a opacas e uma β-hemólise deve confirmar-se a morfologia pela coloração de Gram (cocos Gram-positivos em cadeia) e se é Catalase-negativa. Neste caso procede-se à pesquisa dos antígenos dos grupos de Lancefield para a classificação de *Streptococcus spp.* e ao antibiograma em sistema automático Vitek®.

3.6. Trato respiratório inferior

Nos indivíduos com infeções do trato respiratório inferior, um sintoma comum é a tosse produtiva. As infeções ocorrem mais frequentemente em doentes entre os 50 e os 60 anos e com doenças concomitantes crónicas. Os agentes mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella pneumophila*. O exame microbiológico da expetoração torna-se uma ferramenta essencial para o diagnóstico da infeção.

3.6.1. Expetoração

3.6.1.1. Colheita

O trato respiratório inferior é normalmente estéril. No entanto, o diagnóstico de infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade. O procedimento para uma boa colheita consiste em:

- Se possível, colher a primeira expetoração da manhã;
- Lavar a boca e gargarejar só com água antes da colheita;
- Colher a expetoração por tosse profunda (o laboratório deverá desprezar amostras de saliva ou rinorreia posterior);
- Colocar a amostra em recipiente estéril, seco, de boca larga e tampa de rosca;
- A expetoração poderá ser induzida, através de nebulização com soro fisiológico.

3.6.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Exame após coloração: Coloração de Gram e Kinyoun-Gabett.

É selecionada uma porção purulenta da amostra e efetuado um esfregaço por estiramento entre duas lâminas, coradas de seguida pelos métodos referidos.

A coloração de **Gram** é efetuada para avaliar a qualidade da amostra. Na objetiva de 10x quantificam-se (média por campo) células epiteliais, leucócitos, células leveduriformes e bactérias. O critério de aceitação da amostra é efetuado segundo a classificação de Murray e Washington, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da qualidade da expetoração segundo Murray e Washington.

	Células epiteliais (10x)	Leucócitos (10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Fonte: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf>

As amostras pertencentes aos grupos 4 e 5 são aceites e o diagnóstico prossegue. As amostras que se enquadrem nos grupos 1, 2 e 3 são rejeitadas e é pedida nova amostra.

A coloração de Kinyoun-Gabett é utilizada para a pesquisa de *M. tuberculosis*.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são a Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) e Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro (COS). O procedimento consiste em seleccionar uma porção purulenta da amostra com uma ansa, descarregar no meio de cultura e fazer a sementeira por quatro quadrantes.

Interpretação de resultados

Valorizam-se na gelose de sangue as hemólises características, seguindo-se a sua identificação através de testes complementares.

No PVX verificar a presença de colónias que não cresceram na gelose de sangue. As colónias de *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* têm um aspecto transparente. Segue-se a identificação através de testes complementares.

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

3.7. Trato gastrointestinal

As infeções do aparelho gastrointestinal têm uma elevada incidência na população em geral, com grande morbidade em alguns grupos etários, como as crianças e idosos. O sintoma mais comum destas infeções é a diarreia, isto é, produção de fezes líquidas de forma frequente e sem controlo. Os microrganismos patogénicos mais frequentemente ligados à infeção gastrointestinal são a *Salmonella spp.*, a *Shigella spp.*, o *Campilobacter spp.* e a *Escherichia coli* enteropatogénica. No laboratório faz-se o despiste por rotina de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* nas fezes.

3.7.1. Coprocultura

3.7.1.1. Colheita

A colheita de fezes consiste em 3 amostras de dias diferentes (devidamente identificados) com 1 a 2 gramas, enviadas ao laboratório em recipiente próprio, estéril e

seco. É importante não encher os frascos e evitar contaminações com urina e papel higiênico. Em recém-nascidos e em adultos debilitados a colheita deve ser feita com auxílio de uma zaragatoa rectal inserida até cerca de 2,5 cm acima do esfíncter anal, quando não é possível a colheita normal. O produto deve ser acondicionado a 4°C até ao processamento.

3.7.1.2. Procedimento laboratorial

Antes da cultura, efetua-se um exame macroscópico às fezes para avaliar a consistência e a presença de muco, pús ou sangue nas fezes.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são o Caldo Selenito F (SELENITO F-T) e a Gelose SS (SS). O procedimento consiste em:

- Semear as fezes diretamente na gelose SS e, simultaneamente, semear as fezes no Caldo Selenito F e agitar com a própria zaragatoa, até desfazer o produto.
- Incubar o Caldo Selenito F e gelose SS na estufa a 37°C, durante 24 horas;

Após o período de incubação, repicar o produto do Caldo Selenito para Gelose SS e incubar mediante as mesmas condições.

Interpretação de resultados

Observar o crescimento na gelose SS. Proceder ao isolamento e posterior identificação e antibiograma (Vitek) de colónias incolores/amarelas pálidas, com ou sem centro negro (possível *Salmonella*), ou colónias incolores/rosas pálidas ou alaranjadas, sem centro negro (possível *Shigella*).

3.8. Olho

As infeções oculares incluem infeções das estruturas externas do olho (blefarites, conjuntivites e queratites), estruturas internas do olho (endoftalmites) e infeções do sistema lacrimal (canaculites, dacriocistites, dacrioadenites). A nível do saco conjuntival

existe uma flora saprófita constituída principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium spp.* e *Propionibacterium acnes*.

Neste laboratório pesquisam-se essencialmente agentes causadores de conjuntivites bacterianas, o tipo mais frequente de infeção ocular, que pode ocorrer por inoculação direta ou exógena, ou por disseminação hematogénica a partir de um foco infeccioso. Os principais agentes de conjuntivite da comunidade são *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis*. No recém-nascido, os agentes infecciosos mais frequentes são *Chlamydia trachomatis* (não pesquisada no laboratório), *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* e Bacilos de Gram negativo.

3.8.1. Exsudado ocular

3.8.1.1. Colheita

Utilizar uma zaragatoa seca ou com soro fisiológico e passá-la ao longo da conjuntiva tarsal inferior. Repetir o procedimento com uma segunda zaragatoa, e fazer o esfregaço na altura da colheita.

3.8.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Coloração de Gram.

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são gelose de sangue (COS), gelose de chocolate (PVX) e caldo de enriquecimento (BHI). A gelose de sangue e de chocolate são ambas incubadas durante 24 horas, a 37°C, em atmosfera rica em CO₂ e o caldo de enriquecimento durante o mesmo período, a 37°C. Após as 24 horas, o produto do caldo BHI é semeado em gelose de sangue e de chocolate, mediante as mesmas condições.

Interpretação de resultados

Verificar o crescimento microbiano na gelose de chocolate. Caso se verifique o crescimento de colónias que não se encontrem na gelose de sangue, suspeitar de *Haemophilus influenzae*. Isolar a colónia e proceder à identificação e antibiograma.

Na gelose de sangue, anotar a eventual presença de hemólises características, como α -hemólise (possível *Streptococcus pneumoniae*) e β -hemólise (possível *Streptococcus pyogenes*). A identificação do microrganismo isolado através de testes complementares deve ser seguida de antibiograma no Vitek.

3.9. Ouvido

A infecção auricular ocorre ao nível do ouvido externo ou do ouvido médio. As infecções do ouvido médio são normalmente causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, e o diagnóstico é feito a partir de timpanocentese, que consiste na aspiração de líquidos do ouvido médio. Este procedimento não é realizado neste laboratório. Fazem-se normalmente diagnósticos de infecção do ouvido externo, que são tipicamente causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*.

3.9.1. Exsudado auricular

3.9.1.1. Colheita

Faz-se a inserção da zaragatoa no ouvido externo e, com um movimento suave de rotação, colhe-se o produto. O procedimento é repetido com outra zaragatoa.

3.9.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Coloração de Gram

Exame cultural

Os meios de cultura utilizados são gelose de sangue (COS), gelose de chocolate (PVX) e caldo de enriquecimento BHI. A gelose de sangue e de chocolate são ambas incubadas durante 24 horas, a 37°C, em atmosfera rica em CO₂ e o caldo de enriquecimento durante o mesmo período, a 37°C. Após as 24 horas, o produto do caldo BHI é semeado em gelose de sangue e de chocolate, incubados mediante as condições destinadas a estes meios.

Interpretação de resultados

Verificar o crescimento microbiano na gelose de chocolate. Caso se verifique o crescimento de colónias que não se encontrem na gelose de sangue, com aspeto transparente, suspeitar de *Haemophilus influenzae* ou *Moraxella catarrhalis*. Isolar a colónia e proceder à identificação e antibiograma.

Na gelose de sangue, anotar a eventual presença de hemólises características, como α -hemólise (possível *Streptococcus pneumoniae*) e β -hemólise (possível *Streptococcus pyogenes*). A identificação do microrganismo isolado através de testes complementares deve ser seguida de antibiograma no Vitek.

3.10. Exsudados purulentos

No laboratório por vezes é requisitada a análise de pus proveniente de feridas superficiais ou de queimaduras infectadas. Os microrganismos mais comuns neste tipo de infeção são o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus spp*, Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp* e microrganismos anaeróbios.

3.10.1. Amostra

3.10.1.1. Colheita

Com uma zaragatoa esterilizada esfregar toda a base da lesão.

3.10.1.2. Procedimento laboratorial

Exame direto

Coloração Gram

Exame cultural

Utiliza-se a Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS) e gelose de chocolate (PVX), ambas incubadas a 37°C, em atmosfera enriquecida em CO₂, durante 24 horas. O Caldo Coração – cérebro (BHI) para enriquecimento é incubado a 37°C, em aerobiose, durante 24 horas e depois repicado para PVX e COS.

Após incubação observar o crescimento bacteriano e completar a identificação do ou dos microrganismos isolados com testes complementares. No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

4. Valência de Hematologia

4.1. Introdução

A Hematologia de rotina é uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos. Dentro de um laboratório, esta inclui algumas das análises mais pedidas: hemograma, contagem de plaquetas e velocidade de sedimentação. Os resultados obtidos revestem-se de extrema importância, especialmente em conjugação com os resultados provenientes das restantes áreas.

No laboratório Dr. Aires Raposo & Dr.^a Teresinha Raposo Lda. o setor de hematologia encontra-se no 1º andar e está equipado com aparelhos automáticos (hemogramas, contagem de plaquetas e reticulócitos, velocidade de sedimentação, hemoglobinas glicosiladas) e aparelhos com metodologia semi-automática para determinações na área da coagulação. São ainda realizadas técnicas manuais, sobretudo na área da imunohematologia.

No período da manhã fazem-se os hemogramas, a velocidade de sedimentação e as Hemoglobinas glicosiladas, em amostras de sangue total com EDTA. No caso de haver pedidos de eletroforese de Hemoglobinas, estas são mantidas a 4°C e posteriormente enviadas a um laboratório de referência subcontratado para o efeito. As provas de coagulação são efetuadas em amostras de sangue total com citrato, no mesmo período.

Assim que todos os Hemogramas são efetuados, fazem-se os esfregaços das amostras nas quais se detectou anomalia e as colorações são efetuadas no período da tarde, assim como o respetivo exame microscópico, técnicas manuais de imunohematologia e validação de resultados.

Este capítulo descreve a minha experiência na área da hematologia e faz referência aos parâmetros hematológicos analisados, respetivos aparelhos automáticos e semi-automáticos e técnicas realizadas.

4.2. Hemograma

O hemograma é o exame complementar mais solicitado na prática clínica, fazendo parte de todas as revisões de saúde. Além de fundamental na triagem de saúde, é co-adjuvante

indispensável no diagnóstico e no controle evolutivo das doenças infecciosas, das doenças crônicas em geral, das emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas, e no acompanhamento de quimioterapia e radioterapia.

Um hemograma completo inclui vários parâmetros:

- Contagem de glóbulos vermelhos (ou eritrócitos), com os índices eritrocitários;
- Contagem de glóbulos brancos;
- Contagem de plaquetas;
- Morfologia celular.

4.2.1. Cell-Dyn Sapphire®

Para a determinação do hemograma neste laboratório, o manuseamento do técnico resume-se a colocar as amostras de sangue total em EDTA nas *racks* do aparelho automático, realizar a sua manutenção (substituir reagentes e peças, solucionar os alarmes do aparelho) e avaliar os resultados obtidos.

O contador hematológico utilizado é o Cell-Dyn Sapphire da *Abbott Diagnosis* (Figura 7), que utiliza como princípios de análise a tecnologia laser, impedância elétrica e dispersão de luz de marcadores fluorescentes.



Figura 7 - Cell dyn Sapphire® da *Abbott Diagnosis*.

A introdução das amostras pode ser efetuada manualmente em sistema aberto (*open tube*) ou automaticamente, através uma plataforma transportadora (*rack*). Quando

colocadas as amostras nas *racks* do aparelho, o mesmo agita, identifica a amostra através da leitura do código de barras, aspira e dilui a amostra de sangue.

Tabela 2 - Principais parâmetros analisados e respetivo método.

Parâmetro	Método
Leucócitos	Dispersão ótica (contagem principal); M.A.P.P.S. TM (contagem diferencial) Impedância (contagem secundária) Deteção de marcadores (CD3, CD4, CD8) por fluorescência
Eritrócitos	Impedância (RBCi) Dispersão ótica (RBCo)
Hemoglobina	Cianometahemoglobina modificada (espectrofotometria)
Plaquetas	Impedância (PLTi) Dispersão ótica (PLTo) Deteção de marcadores (CD61) por fluorescência

4.2.2. Eritrograma

O estudo da série eritrocitária inclui a contagem do número total de glóbulos vermelhos (GV), a determinação da hemoglobina (Hb), do hematócrito (Ht) e dos índices eritrocitários ou globulares, que permitem descrever características qualitativas médias e incluem o Volume Globular Médio (VGM), a Hemoglobina Globular Média (HGM) e a Concentração Média da Hemoglobina Globular (CHGM). A avaliação de todos estes parâmetros permite a deteção de situações de anemia ou poliglobulias.

Para a determinação do total de GV, a técnica do aparelho automático baseia-se no princípio da impedância elétrica, mas também pode ser utilizado um processo de deteção ótica. O número total de GV deve situar-se entre 4,5 e $5,5 \times 10^{12}/L$ no homem e 4,0 e $5,0 \times 10^{12}/L$ na mulher.

➤ Concentração de hemoglobina

O doseamento da hemoglobina (g/dL) é útil na deteção de anemias, avaliação da gravidade da anemia e monitorização do seu tratamento. A anemia é definida como a

diminuição da concentração de hemoglobina no sangue e os valores típicos são menos que 13g/dL no homem adulto e menos que 12 g/dL em mulheres adultas.

No contador hematológico, a amostra é diluída com um reagente que converte a hemoglobina em cianometahemoglobina. A leitura colorimétrica é efetuada por um detetor, sendo a concentração da hemoglobina diretamente proporcional à absorvância da amostra.

➤ **Volume globular médio**

O VGM corresponde ao tamanho médio do glóbulo vermelho e calcula-se diretamente a partir do histograma de distribuição de volume dos glóbulos vermelhos. Quando o VGM está aumentado (>96 fL), a anemia é classificada como macrocítica e quando está diminuído (<80 fL), fala-se em microcitose.

Após a determinação do total de glóbulos vermelhos, hemoglobina e volume globular médio, o contador hematológico utiliza estes parâmetros para a calcular os restantes índices eritrocitários. Os cálculos de Wintrobe foram introduzidos de forma a ajudar na caracterização morfológica da anemia, que pode ser confirmada posteriormente através da visualização do esfregaço de sangue periférico.

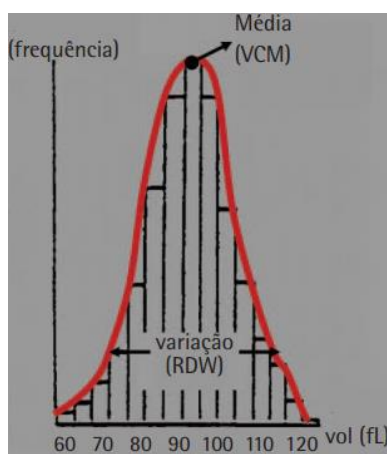


Figura 8 - Histograma de dispersão de volume dos eritrócitos.

Fonte: <https://pt.scribd.com/doc/223935543/Hemograma-Como-Fazer-e-Interpretar>

➤ **Dispersão eritrocitária**

O índice de anisocitose, denominado **RDW** (largura de distribuição dos GV), é calculado pelo equipamento a partir do histograma dos glóbulos vermelhos. É equivalente a um coeficiente de variação, em percentagem, obtido a 50% da altura do pico, usando a largura de distribuição dos glóbulos vermelhos.

$$\text{RDW (\%)} = 100 \times (\text{SD do histograma dos GV} / \text{VGM})$$

O RDW tem aplicação na classificação de anemias sendo, em geral, alto (>15%) em anemias carenciais (ferro, vitamina B12 e ácido fólico).

➤ **Hematócrito**

O Hematócrito é o volume ocupado pelos glóbulos vermelhos num dado volume de sangue, expresso sob a seguinte fórmula:

$$\text{Ht (L/L)} = (\text{GV} \times \text{VGM}) / 10$$

➤ **Hemoglobina globular média**

A HGM avalia a quantidade de hemoglobina presente no glóbulo vermelho, expresso em picogramas, que se obtém pela seguinte fórmula:

$$\text{HGM} = (\text{Hb} / \text{GV}) \times 10$$

➤ **Concentração de hemoglobina globular média**

O CHGM estima a concentração média de Hb presente nos GV, expresso em percentagem, calculado pela seguinte expressão:

$$\text{CHGM} = (\text{Hb} / \text{Ht}) \times 100$$

CHGM traduz conceitos de normocromia e hipocromia, referindo-se ao conteúdo dos eritrócitos em hemoglobina. A CHGM só raramente está aumentada, por exemplo em situações em que há um certo grau de desidratação do eritrócito, como na esferocitose hereditária.

4.2.3. Leucograma

O estudo dos leucócitos baseia-se nos seguintes parâmetros: contagem, características morfológicas, proporções relativas, maturação e modificações na inflamação. A contagem normal de leucócitos varia entre 4,3 e 10,8 x 10⁹/L. Deste valor, 45 a 75% são neutrófilos, 16 a 45% linfócitos, 4 a 10% monócitos, 0 a 7% eosinófilos e 0 a 1% basófilos.

O aumento do número de leucócitos ($> 10,8 \times 10^9/L$) designa-se por leucocitose e resulta, na maioria dos casos, do aumento do número de neutrófilos (neutrofilia). As principais causas de leucocitose são: infecção/inflamação, traumatismo e leucemia/linfoma. Há algumas situações que são acompanhadas pelo aumento de um tipo específico de leucócito, pelo que a realização de um hemograma pode ter particular interesse no seu diagnóstico. Por exemplo, as infecções bacterianas acompanham-se frequentemente de neutrofilia, as infecções víricas de linfocitose e as infecções parasitárias e doenças alérgicas de eosinofilia.

A diminuição do número de leucócitos para níveis inferiores a $4,3 \times 10^9/L$ designa-se por leucopenia e resulta geralmente de uma diminuição do número de neutrófilos (neutropenia). As principais causas de leucopenia são o uso de fármacos que afetam a produção de leucócitos, as terapêuticas imunossupressoras e as síndromes de imunodeficiência. Sobretudo em situações neoplásicas (linfomas e leucemias), para além da contagem dos leucócitos, é fundamental o estudo morfológico e imunológico das células.

A contagem diferencial de glóbulos brancos no analisador inicia-se no canal quando o volume fixo de sangue é diluído com o reagente *Sheath* que mantém a integridade celular dos glóbulos brancos e torna os glóbulos vermelhos “invisíveis” ao detetor, uma vez que a pressão osmótica dos GV é superior à pressão osmótica do reagente, havendo difusão da hemoglobina para fora e de água para dentro do glóbulo, o que faz com que os GV fiquem com o mesmo índice de refração do reagente. A amostra diluída sofre focagem hidrodinâmica, que obriga as células a formarem uma simples fila enquanto passam pela região de sensores, de forma a serem analisadas uma a uma.

Com referência à tecnologia MAPSSTM (*Multi Angle Polarized Scatter Separation*), são efetuadas quatro medidas simultâneas de dispersão de luz em cada leucócito, para a classificação diferencial dos WBC:

- O ângulo 0° determina principalmente o tamanho da célula;
- A dispersão da luz a 10° indica a estrutura ou a complexidade da célula (diferencia os mono dos polinucleares);
- A dispersão da luz a 90° permite a medição da granularidade interna e lobularidade (detetor polarizado);

- A dispersão de luz despolarizada a 90° permite separar os eosinófilos dos neutrófilos e restantes células, baseado unicamente nas características dos grânulos que transformam a luz ortogonal polarizada em despolarizada.

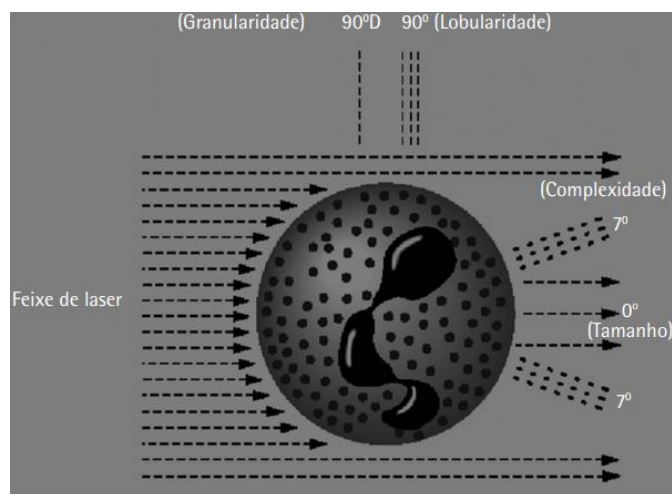


Figura 9- Detalhe do sistema de detecção MAPSS™ da Abbott.

Fonte: <https://pt.scribd.com/doc/223935543/Hemograma-Como-Fazer-e-Interpretar>

A informação das quatro medidas é interpretada através das alterações na luz dispersa pelas células, enquanto passam pelo detetor, dando a contagem diferencial para classificar a subpopulação dos WBC.

4.2.4. Plaquetas

A variação normal da contagem das plaquetas é de $150-400 \times 10^9/L$. O aumento do número de plaquetas designa-se por trombocitose e pode ocorrer, por exemplo, em associação com doenças mieloproliferativas (linfomas e leucemias). A diminuição do número de plaquetas designa-se por trombocitopenia e constitui a anormalidade plaquetária mais comum. Esta condição pode ter diversas etiologias, como hiperesplenismo, deficiência da medula óssea; pode ainda ser induzida por drogas ou pós-transfusional.

A contagem de plaquetas no Cell-dyn dá-se no canal RBC/PLT. A técnica baseia-se no princípio da impedância elétrica. No canal, a suspensão de células (consideradas más condutoras) é mergulhada numa solução de condutividade elétrica (dilúente *sheath*). As células são forçadas a passar, uma a uma, por um orifício de tamanho conhecido. Esse orifício é ladeado por dois elétrodos, de forma a criar um campo elétrico. As alterações

na corrente existente entre os elétrodos, que ocorrem aquando da passagem das células resistentes, são detetadas e registadas sob a forma de impulsos. A quantidade gerada é indicativa do número de células que passam pela abertura e a amplitude é proporcional ao volume da célula que o gerou, permitindo assim diferenciar pelo tamanho, no canal RBC/PLT, os eritrócitos das plaquetas. De facto, se o impulso gerado está acima do limiar inferior da PLT, é contado como tal; e se o impulso gerado está acima do limiar inferior dos RBC, é contado como um RBC.

Além da impedância, é possível fazer a deteção por dispersão ótica. O contador automático Cell-dyn permite ainda detetar a presença do marcador monoclonal CD61, específico das plaquetas.

4.2.5. Reticulócitos

A determinação deste parâmetro é importante na avaliação da atividade da linhagem eritropoiética da medula, diagnosticando se uma anemia é regenerativa (reticulócitos aumentados) ou arregenerativa (reticulócitos normais ou diminuídos), na monitorização de doentes renais em tratamentos com eritropoietina e na avaliação da regeneração sanguínea após uma perda considerável de sangue.

A contagem de reticulócitos é também efetuada recorrendo à citometria de fluxo fluorescente, apenas quando solicitada pelo clínico. Neste caso a determinação é feita em sistema aberto (*open tube*) e com reagente próprio, que apenas é utilizado no momento da determinação do parâmetro. O reagente dos reticulócitos é mantido a 4°C e, na altura da sua utilização, é colocado à temperatura ambiente e introduzido no aparelho.

4.3. Estudo morfológico do sangue periférico

Na rotina deste laboratório os resultados considerados aprovados pelos contadores eletrónicos são normalmente emitidos sem interferência humana, com interface dos resultados para o sistema de processamento de dados.

Para os hemogramas reprovados (ex: parâmetros fora dos valores de referência e outros alarmes emitidos pelo aparelho) e solicitações médicas específicas (pesquisa de linfócitos atípicos, esferócitos e outros), o hemograma poderá ser repetido e/ou é efetuado um esfregaço para observação microscópica.

A análise microscópica baseia-se na observação de sangue periférico tendo em atenção as três linhagens. Na linhagem eritrocítica é possível observar as alterações morfológicas: tamanho, forma, cor, inclusões e alterações do estado de maturação (Tabela 3). Na leucocítica observam-se as alterações morfológicas (tamanho das células, aspeto da cromatina, forma do núcleo, presença ou não de nucléolos, relação núcleo/ citoplasma, existência ou não de grânulos, basófilia do citoplasma), contagem diferencial de leucócitos e as alterações do estado de maturação. E na plaquetária para além das alterações morfológicas, observam-se as alterações numéricas e agregados plaquetários.

Tabela 3 - Interpretação de alterações nos eritrócitos.

Alteração	Caraterísticas	Principais causas
Tamanho		
Microcitose	Diminuição do tamanho	Anemias por deficiência de ferro e talassemias.
Macrocitose	Aumento do tamanho	Anemias megaloblásticas por defeito de vitamina B12 e/ou ácido fólico.
Forma		
Esferócitos	Em forma de esfera	Esferocitose hereditária e anemias hemolíticas auto-imunes.
Eliptócitos	Eritrócitos alargados	Eliptocitose congénita.
Dacriócitos	Forma de lágrima	Anemia megaloblástica; talassemia minor e mielofibrose.
Equinócitos	Cobertos de pequenas espículas	Hepatopatias; síndrome hemolítica urémica e défice de piruvatocinase.
Acantócitos	Cobertos de espículas de diferentes comprimentos	Abetalipoproteinemia; hepatopatias; e após esplenectomia.
Queratócitos	Eritrócitos com pares de Espículas (geralmente duas)	Anemia hemolítica microangiopática e coagulação

Esquizócitos	Fragmentos de eritrócitos	intravascular disseminada. Anemias hemolíticas microangiopática e mecânica.
Em alvo	Coloração aumentada no meio da área de palidez central	Icterícia obstrutiva; talassemias; doença hepática e hemoglobinopatias.
Estomatócitos	Apresentam uma fenda	Hepatopatia alcoólica.
Inclusões		
Pontuado basófilo	Pequenas estruturas azuis escuras por toda a área hemoglobinizada do eritrócito	Intoxicação por chumbo; β -talassemia menor; anemias megaloblásticas; e hemoglobinas instáveis.
Corpos de Howell-Jolly	Uma pequena inclusão azul escura, de DNA, por eritrócito	Anemias hemolíticas graves e após esplenectomia.
Corpúsculos de Pappenheimer	Pequenas inclusões granulares escuras de hemossiderina	Pós esplenectomia; anemia hemolítica grave; e anemias sideroblásticas.
<i>Rouleaux</i>	Eritrócitos que aderem uns aos outros, dando o aspeto de pilhas de moedas espalhadas	Gravidez; condições inflamatórias; e discrasias de células plasmáticas, como o mieloma múltiplo.
Eritroblastos	Precusores dos eritrócitos	Eritropoiese hiperplásica ou infiltração da medula óssea.

4.3.1. Técnica de execução do esfregaço

Na técnica para a execução do esfregaço utiliza-se lâmina e lamela. Deve limpar-se sempre a lâmina antes de realizar o esfregaço, para evitar a formação de vacúolos de gordura. Depois de bem limpa, coloca-se uma gota de sangue próxima de uma das extremidades da lâmina, procedendo-se à sua extensão com lamela, numa inclinação de 45°. Retrocede-se um pouco a lamela, para que haja contacto com a gota de sangue e faz-se o estiramento ao longo da lamela, num movimento rápido, firme e delicado. Isto permite que o esfregaço seja liso e homogéneo, com bordos bem definidos e uma espessura a diminuir gradualmente da cabeça para a cauda. Deixa-se o esfregaço secar

completamente antes de ser corado, para que a morfologia dos eritrócitos não se altere. Identifica-se e procede-se à sua coloração.

4.3.2. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Os esfregaços são corados manualmente através da coloração de May-Grünwald-Giemsa, uma coloração panótica que combina as vantagens na utilização de vários corantes, corando elementos acidófilos, granulações azurófilas e granulações de neutrófilos.

Inicialmente, a fixação do esfregaço é efetuada pelo metanol presente na solução de May-Grünwald (solução metanólica de eosinato de azul de metileno). Após este passo, o tampão de fosfatos dissocia o corante de May-Grünwald: o eosinato de azul de metileno, ao pH conferido pelo tampão, dissocia-se em eosina e azul de metileno, seguindo-se a ação individual dos corantes. Segue-se a ação da solução de Giemsa diluída, na qual o eosinato de azul de metileno e o eosinato de azul de metileno presentes são dissociados pelo tampão de fosfatos e os três corantes (eosina, azul de metileno e azul de metileno) exercem a sua ação.

A eosina (corante ácido) vai corar os componentes citoplasmáticos básicos da célula (eosinófilos ou acidófilos) de rosa alaranjado. O Azul de metileno (corante básico) vai corar o núcleo e componentes citoplasmáticos ácidos (basófilos) de azul arroxeado. O Azul de metileno é responsável por corar granulações (azurófilas) de vermelho-púrpura. A combinação da eosina e azul de metileno cora as granulações (neutrófilas) de rosa.

4.4. Velocidade de sedimentação

A velocidade de hemo-sedimentação (VS) é um exame de rotina pouco específico, mas económico e de fácil execução, que tanto reflete o estado geral de saúde como avalia um possível processo inflamatório e/ou infeccioso, ou serve de bom prognóstico à terapêutica. Mantém-se assim um exame de utilidade indiscutível e dos mais requisitados na rotina laboratorial.

A VS exhibe alterações fisiológicas relacionadas com a idade, sexo, período menstrual, gravidez. O aumento patológico está associado a situações de infeção, inflamação, anemia, leucemias, entre outros. A diminuição patológica poderá estar associada a situações de poliglobulia, alterações da forma dos eritrócitos, entre outros.

4.4.1. Alifax Test 1 BCL

A VS consiste em avaliar a sedimentação dos eritrócitos que se encontram em suspensão no plasma. Neste laboratório é usado um método automatizado para a medição da VS, o Alifax Test 1 BCL (Figura 10).



Figura 10 - Alifax Test 1 BCL.

Trata-se um analisador automático fechado que determina o valor de VS no tubo primário de EDTA tripotássico, por fotometria capilar de fluxo. O sangue é centrifugado num capilar e a leitura é feita por fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950 nm. Os impulsos elétricos captados por um detetor de fotodíodos estão diretamente relacionados com a concentração de eritrócitos no capilar. O número de impulsos medidos por metade do tempo é usado para delinear a curva de sedimentação para cada amostra, e os valores são convertidos para valores comparados ao método de Westergreen. Os valores de referência situam-se entre os 0 e os 20 mm/h.

4.5. Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})

Este parâmetro encontra-se incluído neste capítulo pois a sua determinação é efetuada no setor de Hematologia, uma vez que o tipo de amostra (sangue total em K₃EDTA) é o mesmo.

O doseamento da hemoglobina glicosilada (ou glicada) é um parâmetro útil em doentes diabéticos, pois permite obter uma retrospectiva a longo prazo dos níveis de glucose no

sangue. A HbA_{1c} surge por adição não enzimática de resíduos de glicose a grupos de aminoácidos da hemoglobina A (HbA). Esta hemoglobina é formada por 2 subunidades α e 2 subunidades β , e por esta razão as moléculas de glicose podem ligar-se em diferentes locais da hemoglobina, produzindo distintas formas de hemoglobinas glicadas. As diferentes frações resultantes do processo de glicosilação da Hb A são designadas por HbA_{1a}, HbA_{1b} e HbA_{1c}. Como a HbA_{1c} representa cerca de 80%, a sua avaliação reflete com fidelidade o grau de glicosilação da hemoglobina. Além disso, a HbA_{1c} é a única irreversivelmente glicada, e portanto suficientemente estável para ser utilizada na monitorização dos níveis glicémicos.

A glicosilação da hemoglobina ocorre durante os 120 dias de vida dos eritrócitos e depende da concentração de glicose no sangue. A glicémia dos últimos 30 dias antes do doseamento contribui com 50% da hemoglobina glicada doseada, e as glicémias dos últimos meses (2 a 4), com 25%. A determinação final corresponde, portanto, à média ponderada dos níveis das glicémias das 6 a 8 últimas semanas antes da determinação. Este doseamento serve para a monitorização a longo prazo de doentes diabéticos, uma vez que não é afetado pelas variações diárias de glicose, nem pelo exercício ou ingestão recente de alimentos.

4.5.1. ADAMS A1c HA-8160

O equipamento utilizado (exclusivamente) para a determinação da hemoglobina glicosilada é o ADAMS A1c HA-8160 (Figura 8), pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).



Figura 11 - ADAMS A1c HA-8160

A metodologia utiliza uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. A leitura das frações obtidas é realizada a 415 nm e 500 nm. Assim, nestes comprimentos de onda podemos obter as seguintes frações: HbA1c, HbA1, HbF, HbA2 e hemoglobinas variantes. O aparelho dilui, hemolisa e remove a base de Schiff (resultado da reação responsável pela formação da hemoglobina glicosilada) automaticamente. Esta remoção é realizada com tetrapolifosfato (pH 6,0) durante 2 minutos, a 48°C. Após 4,2 min obtém-se o cromatograma. Os valores normais variam entre 4 e 6%.

4.6. Técnicas manuais em imuno-hematologia

4.6.1. Grupo sanguíneo

A determinação do grupo sanguíneo baseia-se na identificação dos componentes antigénicos presentes na superfície dos eritrócitos e é um parâmetro de elevada importância, já que está diretamente relacionado com a terapêutica transfusional e a prevenção de acidentes hemolíticos graves secundários a ela.

4.6.1.1. Tipagem ABO e Rh

Os antígenos ABO são expressos ao nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel importante como antígenos de histocompatibilidade.

Existem 4 grupos sanguíneos: A, B, AB e O. Os epítomos antigénicos são determinados por hidratos de carbono ligados a polipéptidos ou lípidos, formado respetivamente glicoproteínas ou glicolípidos. A cada antígeno corresponde uma isoaglutinina (Anti-A ou Anti-B). Os indivíduos do tipo A têm antígenos A nos eritrócitos e aglutininas naturais no soro contra eritrócitos tipo B; os do tipo B têm nos eritrócitos antígeno B e no soro anticorpos naturais tipo aglutininas contra eritrócitos do tipo A; o soro dos indivíduos do grupo AB não contém anticorpos, e o soro dos indivíduos O tem anticorpos tipo aglutininas anti-A e também aglutininas anti-B.

A Tipagem Rhesus (Rh) é bastante complexa, e por tal os indivíduos são classificados apenas como Rh positivo ou Rh negativo, dependendo da presença ou ausência do antígeno D à superfície do eritrócito. Quando um indivíduo não possui este antígeno, o seu sistema imunitário é facilmente estimulado, produzindo anticorpos na presença de

eritrócitos com o antígeno D. Em situações de transfusão podem ocorrer reações hemolíticas graves, ou no caso de uma gravidez, à doença hemolítica do recém-nascido.

Os antígenos utilizados para a grupagem sanguínea ABO e Rh são anticorpos monoclonais IgM: Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D. O método usado é a aglutinação direta e consiste em:

- Numa placa de vidro, colocar 1 gota dos reagentes em cada poço;
- Juntar uma pequena gota de sangue anticoagulado com EDTA a cada reagente;
- Com uma vareta, misturar o reagente e o sangue uniformemente numa área de cerca de 20mm de diâmetro;
- Rodar durante alguns segundos;
- Observar macroscopicamente a aglutinação. Se os antígenos estiverem presentes, a reação ocorre imediatamente.

Neste laboratório o procedimento é realizado por 2 técnicos, para que haja uma dupla confirmação dos resultados obtidos, evitando assim erros na leitura da presença ou ausência de aglutinação.

Tabela 4 - Aglutinação dos anticorpos consoante o grupo sanguíneo.

Grupo Sanguíneo	Anticorpos			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
A+	+	-	+	+
A-	+	-	+	-
B+	-	+	+	+
B-	-	+	+	-
AB+	+	+	+	+
AB-	+	+	+	-
O+	-	-	-	+
O-	-	-	-	-

(+) aglutinou; (-) não aglutinou

4.7. Estudo da coagulação

O sangue contém um grande número de proteínas plasmáticas, entre elas estão os fatores da coagulação e os seus inibidores, que estão implicados numa sequência de interações muito controlada, que resulta na formação de trombina e, posteriormente, de fibrina. O sistema de coagulação está dividido em 2 vias: a via extrínseca, na qual se forma um complexo entre o fator VII, o cálcio e o fator tecidual; e a via intrínseca, na qual 3 proteínas plasmáticas (fator XII, cininogénio e pre-caliceína) formam um complexo sobre o colagénio do subendotélio vascular.

O Coagulómetro ST4 da STAGO (Figura 12) é o equipamento semiautomático utilizado para o estudo da coagulação, nomeadamente do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). Tem como método a deteção do coágulo por alteração da densidade ótica do meio de reação (método ótico turbidimétrico). Os testes da coagulação são executados em plasma com citrato trissódico, numa razão de 1:9 (uma parte de citrato para 9 de sangue).



Figura 12 - Coagulómetro ST4 da STAGO.

4.7.1. Tempo de protrombina (TP)

Este teste explora principalmente a existência de defeitos na via extrínseca da coagulação (protrombina e fatores II, V, VII e X). O tempo de protrombina (TP) é utilizado três situações: (i) monitorização da terapêutica com anticoagulantes; (ii) triagem de distúrbios do sistema da coagulação; (iii) como prova da função hepática.

4.7.1.1. Fundamento do método

Na presença de íões cálcio, a tromboplastina tecidular ativa a via extrínseca da coagulação. Assim, a adição à amostra de um excesso de tromboplastina e íões cálcio vai desencadear a formação de um coágulo de fibrina. Um plasma com deficiência de um fator de coagulação da via tecidular levará mais tempo que um plasma normal para formar um coágulo. O intervalo de coagulação está também aumentado em plasmas cujos fatores dependentes de vitamina K funcional se encontrem diminuídos por administração de anticoagulantes orais.

4.7.1.2. Procedimento

Consiste em colocar 100 µl de amostra no poço e incubar 2 minutos, a 37°C. Adicionar depois 200 µl de tromboplastina e medir o tempo de coagulação.

4.7.1.3. Interpretação dos resultados

O resultado é expresso em: Rácio Tempo do doente/tempo normal, Taxa de protrombina (% de atividade) e INR. O INR (*International Normalized Ratio*) foi criado de forma a uniformizar os resultados, não havendo influência do reagente ou da técnica. É a razão entre o TP do doente, em segundos, e o tempo padrão. Os valores interpretativos do INR são descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de INR e respetiva interpretação.

INR = 1,0	Indivíduos saudáveis sem tratamento anticoagulante
2 < INR < 3,5	Desejável sob terapêutica anticoagulante
INR > ou = 5	Risco de ocorrência de hemorragias
INR < ou = 1,5	Menor eficácia da profilaxia (risco aumentado de tromboembolismo)

4.7.2. Tempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)

O TTPA é o teste mais utilizado para a exploração dos fatores plasmáticos da via intrínseca da coagulação. Explora todos os fatores da via intrínseca (pré-caliceína, o cininogénio de alto peso molecular e os fatores XII, XI, IX e VIII e o tronco comum da coagulação (factores X, V, II e I). Utiliza-se na deteção de deficiências congénitas e adquiridas destes fatores e na monitorização terapêutica da heparina.

Este teste é recomendado para a monitorização da terapêutica com heparina, mas não é recomendado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, nem é sensível à disfunção plaquetária.

4.7.2.1. Fundamento do método

O reagente fosfolipídico é misturado com o plasma para produzir uma activação uniforme e optimizada da amostra. Após incubação a 37°C, durante um determinado período de tempo, a reacção é iniciada pela adição de iões cálcio, sendo registado o tempo, em segundos, necessário à formação do coágulo de fibrina. Um plasma com deficiência num fator de coagulação da via intrínseca levará mais tempo a formar um coágulo que um plasma normal.

4.7.2.2. Procedimento

Consiste em colocar 100 µl de amostra no poço e adicionar 100 µl de reagente fosfolipídico, incubando 5 minutos a 37°C. Adicionar depois 100 µl de cloreto de cálcio (pré-aquecido), destravar o cronómetro e medir o tempo de coagulação.

4.7.2.3. Expressão do resultado

O resultado pode ser expresso em segundos ou mediante o rácio Tempo do doente/ tempo normal.

5. Valência de Bioquímica

5.1. Introdução

A área da bioquímica clínica é uma área multidisciplinar, que tem por objetivo determinar os parâmetros bioquímicos, permitindo a sua utilização no diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção da doença.

No laboratório Dr. Aires Raposo e Dr.^a Teresinha Raposo Lda. as amostras para análise de parâmetros bioquímicos são previamente triadas no período da manhã, sendo de seguida encaminhadas para o 1º piso, onde são analisadas.

Os parâmetros bioquímicos são maioritariamente efetuados no aparelho *Cobas® 6000 Analyser Series HITACHI Roche® Diagnostics*, em amostras de soro, plasma e urina. Além destas determinações, fazem-se também a eletroforese de proteínas, a análise bioquímica da urina e pesquisa de sangue oculto nas fezes. Este capítulo pretende resumir o trabalho efetuado nesta área.

5.2. Cobas® 6000 e parâmetros analisados

O Cobas® 6000 é um analisador automático utilizado na determinação espectrofotométrica, imunoturbidimétrica e potenciométrica de parâmetros analíticos. O aparelho automático conta com 5 unidades *hardware*: uma unidade de controlo, uma unidade central (core), um módulo ISE e outros dois módulos distintos, o módulo c501® e o módulo e501®.



Figura 13 - Cobas 6000 Analyser Series HITACHI Roche® Diagnostics.

A grande maioria dos parâmetros bioquímicos analisados é medida através da técnica de espectrofotometria/colorimetria, que se baseia na absorção ou emissão de radiação electromagnética por diversas moléculas, quando os seus electrões se movimentam entre níveis energéticos. Os testes colorimétricos baseiam-se na medição das variações de absorção na zona visível (entre 400 e 700 nm). Através do espectrofotómetro é possível medir a absorção ou emissão e estabelecer uma relação com a concentração de uma determinada biomolécula. Esta relação é feita aplicando a lei de *Lambert-Beer*. Na equação que expressa esta lei, é estabelecido um quociente entre a luz incidente e a luz transmitida, sendo que o logaritmo deste quociente traduz a absorvância. O que se verifica é que a absorvância é proporcional à concentração da substância a analisar. A absorção de luz é tanto maior, quanto mais concentrada for a solução por ela atravessada e também quanto maior for a distância percorrida pelo feixe luminoso através das amostras.

Para a determinação do ionograma (módulo ISE) utiliza-se a potenciometria, que está incluída no grupo das técnicas electroquímicas que envolvem a medição de corrente ou voltagem gerada pela atividade de iões. A potenciometria é a medição do potencial entre 2 eléctrodos numa célula electroquímica. Estes 2 eléctrodos estão conectados por uma solução eletrolítica que conduz os iões. O eléctrodo consiste num condutor metálico que está em contacto com a solução e os potenciais eléctricos são gerados pela troca de iões entre o condutor metálico e a solução. É necessário para este tipo de doseamento um eléctrodo de referência onde o potencial gerado por determinado ião é constante e servirá de comparação ao potencial gerado no eléctrodo de trabalho ou seletivo para aquele ião. Aplicando a equação de *Nernst* é assim posteriormente determinada a concentração do ião na amostra em estudo.

Antes das determinações analíticas do aparelho, verifica-se a necessidade de calibração (por exemplo, pela substituição de reagente) e efetua-se o controlo de qualidade interno. O aparelho é programado e as amostras são colocadas em *racks* numeradas e a sua identificação é feita através da leitura do código de barras, pelo próprio dispositivo.

Durante o estágio, aprendi a programar os módulos c501® e ISE, e os parâmetros analisados nestes módulos são descritos em seguida.

5.2.1. Glucose

A glucose é o principal hidrato de carbono presente no sangue periférico. A sua oxidação é a maior fonte de energia celular do organismo. O doseamento da glicose é indispensável ao diagnóstico e monitorização de doenças causadas por produção anómala de insulina e outras hormonas essenciais ao seu metabolismo. Estes distúrbios na produção de insulina podem conduzir a estados de hiperglicémia ou de hipoglicémia. A causa mais frequente de hiperglicémia é a Diabetes Mellitus, originada por um défice da secreção ou da ação da insulina. Outros fatores secundários contribuem também para a existência de níveis altos de glicose, como a pancreatite, disfunção da tiróide, a insuficiência renal e hepatopatias.

A hipoglicémia é observada com menos frequência, mas são várias as patologias que podem originar uma diminuição dos níveis de glicose no sangue: o insulinoma, o hipopituitarismo e a hipoglicémia induzida por insulina. Para além do soro, a glicose poderá ser determinada na urina (glicosúria), procedimento utilizado para o despiste e/ou monitorização da Diabetes Mellitus e para detetar defeitos tubulares renais.

5.2.1.1. Princípio do teste

Para a determinação da glucose, utiliza-se o método enzimático de referência com hexoquinase. A hexoquinase catalisa a fosforilação da glucose em glucose-6-fosfato por ATP. A glucose-6-fosfato desidrogenase oxida a glucose-6-fosfato na presença de NADP em gluconato-6-fosfato. Nenhum outro hidrato de carbono é oxidado. A taxa de formação de NADPH é diretamente proporcional à concentração de glucose, sendo determinada fotometricamente.

5.2.1.2. Diagnóstico da Diabetes

Considera-se atualmente como um dos critérios de diagnóstico da diabetes a obtenção de níveis de glicémia em jejum superiores a 126 mg/dL em mais de uma ocasião. No entanto, como esta isoladamente não é capaz de detetar todos os casos de diabetes e não deteta muitos dos casos de diminuição da tolerância à glucose, são muitas vezes pedidas provas de sobrecarga (Prova de Tolerância Oral à Glucose) em indivíduos com níveis de glucose em jejum entre 110 e 126 mg/dL e em indivíduos com tolerância diminuída sem diagnóstico de diabetes. Considera-se critério diagnóstico de diabetes a presença de

níveis de glicémia superiores a 200 mg/dL numa amostra colhida 2h após a sobrecarga de glucose. No laboratório, sempre que são requisitadas PTGO, opta-se pela realização de colheita de amostra em jejum e duas horas após ingestão de 75g de glucose nos adultos e 100g de glucose nas grávidas, desde que não exista informação clínica em contrário.

No intervalo de tempo entre a ingestão e as restantes colheitas o utente é instruído para não efetuar qualquer esforço de forma a não mascarar uma possível hiperglicémia por consumo de glucose. Nestes casos, a determinação da glucose de um determinado paciente é programada manualmente no aparelho, de forma a fazer distinção entre os tempos de colheita.

5.2.2. Colesterol total

O colesterol é sintetizado principalmente no fígado e na parede intestinal. Cerca de três quartos do colesterol são formados por síntese e um quarto tem origem na alimentação. O seu estudo é de interesse, não só como principal componente das membranas celulares e regulador da sua fluidez, mas também como precursor de muitas moléculas sinalizadoras, incluindo hormonas esteróides – progesterona, testosterona, estrogénios e cortisol. A determinação do colesterol total é utilizada para o despiste do risco aterogénico e no diagnóstico e tratamento de doenças que envolvem níveis elevados de colesterol, bem como de perturbações do metabolismo lipídico e lipoproteico. A hipercolesterolemia é um fator de risco da aterosclerose, existindo uma correlação entre o valor de colesterol e a incidência de doenças cardiovasculares.

5.2.2.1. Princípio do teste

O colesterol total é determinado por um método colorimétrico enzimático. Os ésteres do colesterol são clivados através da ação da colesterol esterase e produzem colesterol livre e ácidos gordos. A colesterol oxidase catalisa a oxidação do colesterol para colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogénio. Em presença da peroxidase, o peróxido de hidrogénio formado afeta o acoplamento oxidativo do fenol e da 4-aminoantipirina, formando um corante vermelho de quinona-imina. A intensidade da cor do corante formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol. É determinado medindo o aumento da absorvância.

5.2.3. Colesterol HDL

As lipoproteínas de alta densidade são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado. No fígado o colesterol é transformado em ácidos biliares, que são excretados para os intestinos através das vias biliares. É clinicamente importante monitorizar o colesterol HDL no soro, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas de HDL e o risco de doença aterosclerótica.

As concentrações elevadas de colesterol HDL protegem contra as cardiopatias coronárias. Concentrações reduzidas de colesterol HDL associadas a níveis altos de triglicéridos aumentam o risco cardiovascular. Actualmente já existem estratégias para aumentar o colesterol HDL. Torna-se assim prioritário dosear o Colesterol HDL em indivíduos nos quais são aplicadas estas estratégias, sejam elas alimentares ou medicamentosas.

5.2.3.1. Princípio do teste

O colesterol HDL é determinado por um método colorimétrico enzimático homogéneo. Na presença de iões magnésio, o sulfato de dextrano forma seletivamente complexos hidrossolúveis com LDL, VLDL e quilomicrons que são resistentes às enzimas utilizadas, modificadas por PEG (partículas reativas magneticamente).

A concentração do colesterol HDL é determinada enzimaticamente pela colesterol esterase e colesterol oxidase acopladas com PEG aos grupos amino.

Sob a influência da colesterol esterase, os ésteres de colesterol são quantitativamente decompostos em colesterol livre e ácidos gordos. Na presença de oxigénio, o colesterol é oxidado pela colesterol oxidase a Δ^4 -colestenona e peróxido de hidrogénio. Na presença da peroxidase, o peróxido de hidrogénio gerado reage com a 4-aminoantipirina e a HSDA [SódioN-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina] para formar um corante púrpura azulado. A intensidade da cor do complexo púrpura formado é directamente proporcional à concentração de colesterol e é medida fotometricamente.

5.2.4. Colesterol LDL

As lipoproteínas de baixa densidade são os principais transportadores de ésteres de colesterol, do fígado para os tecidos periféricos. Têm um papel determinante na formação da aterosclerose, com especial destaque para a esclerose coronária. As LDL derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), e são sintetizadas no fígado. A eliminação do colesterol LDL do plasma ocorre através das células do parênquima hepático, por meio de receptores específicos para LDL. As concentrações elevadas de LDL no sangue e o tempo de permanência, associada a um aumento da taxa de modificação biológica, resultam na destruição da função endotelial dos vasos sanguíneos e numa captação superior do colesterol LDL pelo sistema monócitos/macrófagos e pelas células do músculo liso nas paredes dos vasos. Assim sendo, a maioria do colesterol armazenado nas placas ateroscleróticas deriva das LDL. Entre todos os parâmetros isolados, o colesterol LDL tem um valor preditivo clínico muito importante em relação à aterosclerose coronária. As estratégias terapêuticas actualmente adoptadas têm por objetivo a redução lipídica, e como principal alvo o colesterol LDL, levando a um melhoramento da função endotelial e na prevenção da aterosclerose, reduzindo a sua progressão e evitando a ruptura das placas.

5.2.4.1. Método: Colesterol LDL Directo

5.2.5. Triglicéridos

Os triglicéridos, ou triacilgliceróis, são ésteres de glicerol tri-hidratado com 3 ácidos gordos de cadeia longa. Uma fração é obtida na dieta diária e outra é sintetizada no fígado. A avaliação dos triglicéridos é utilizada no diagnóstico e tratamento de doentes com Diabetes Mellitus, obstrução hepática, alterações do metabolismo dos lípidos e outras doenças endócrinas. No entanto, para o diagnóstico e monitorização de doenças cardiovasculares, deve ser feito em conjunto com o colesterol e lipoproteínas.

5.2.5.1. Princípio do teste

A determinação deste parâmetro é efetuada por um ensaio colorimétrico enzimático, utilizando uma lipoproteína lípase para a hidrólise rápida dos triglicéridos em glicerol, seguida de oxidação para fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. O

peróxido de hidrogénio reage depois com 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a ação catalítica da peroxidase, para formar um corante vermelho (reação de ponto final de Trinder). A intensidade cromática do corante vermelho formado é diretamente proporcional à concentração de triglicéridos, podendo ser formada fotometricamente.

5.2.6. Proteínas totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas sobretudo no fígado, células plasmáticas, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. A proteína mais abundante no plasma sanguíneo é a albumina, que contribui para a pressão osmótica e é responsável pelo transporte de substâncias (hormonas, cálcio, ácidos gordos livres, drogas, bilirrubina, fármacos). Existem também as proteínas da coagulação e as imunoglobulinas, importantes na manutenção da homeostase do organismo, para além de muitas outras existentes em menor quantidade.

No decorrer de uma patologia, tanto a concentração de proteínas totais como a percentagem representada por frações individuais pode apresentar desvios significativos dos valores normais. A hipoproteïnemia pode ser causada por doenças e perturbações como perda de sangue, caquexia aftosa, síndrome nefrótico, queimaduras graves, síndrome de retenção de sal e Kwashiorkor (deficiência protéica aguda). Pode observar-se hiperproteïnemia em casos de desidratação grave e doenças como mieloma múltiplo. As alterações da percentagem relativa de proteínas plasmáticas podem ser provocadas por uma modificação da percentagem de uma fração proteica plasmática. Muitas vezes, nestes casos, a quantidade de proteínas totais não sofre qualquer tipo de alteração. O rácio A/G é normalmente utilizado como índice de distribuição das frações de albumina e de globulinas. Podem observar-se alterações marcadas deste rácio no caso de cirrose hepática, glomerulonefrite, síndrome nefrótico, hepatite aguda, lúpus eritematoso e ainda em determinadas inflamações agudas e crónicas.

5.2.6.1. Princípio do teste

A determinação das proteínas totais é feita por ensaio colorimétrico. Em solução alcalina, o cobre bivalente reage com as ligações do péptido proteico e forma o complexo de biureto com o característico tom púrpura. O tártaro sódico-potássico impede a precipitação do hidróxido de sódio e o iodeto de sódio impede a auto-redução

do cobre. A intensidade cromática é diretamente proporcional à concentração de proteínas, determinada fotometricamente.

5.2.7. Albumina

A albumina é uma proteína não glicosilada, sintetizada nas células do parênquima hepático. Quantitativamente, é o componente proteico mais importante (>50%) do plasma, LCR e da urina.

Esta proteína desempenha duas funções principais no plasma: manutenção da pressão oncótica e transporte. É a proteína mais importante no transporte de substâncias que apresentam baixa hidrossolubilidade (ácidos gordos livres, bilirrubina, íons metálicos, hormonas e produtos farmacêuticos).

A diminuição dos níveis de albumina no soro é causada pela hiper-hidratação, insuficiência da síntese hepatocelular, alterações da secreção no espaço intravascular, distribuição anormal entre o espaço intra e extravascular, catabolismo e perda de albumina, reações de fase aguda e analbuminemia congénita.

Quando ocorre excreção diminuta, mas anómala, de albumina na urina estamos perante um caso de microalbuminúria. As suas causas podem ser glomerulares (devias a microangiopatia diabética, hipertensão, lesão glomerular menor), tubulares (inibição da reabsorção) ou pós-renais. A albumina é também uma proteína que funciona como marcador de várias formas de proteinúria.

5.2.7.1. Princípio do teste

A albumina é quantificada no soro e urina através de um ensaio imunoturbidimétrico. Os anticorpos anti-albumina reagem com o antigénio na amostra e formam complexos antigénio/anticorpo. Estes, após aglutinação, são determinados por turbidimetria.

5.2.8. Proteína C reativa

A PCR é a proteína clássica de fase aguda das reações inflamatórias. Sintetizada no fígado, é constituída por cinco cadeias polipeptídicas idênticas que formam um anel com cinco membros. A sua determinação é utilizada para detetar processos inflamatórios sistémicos, avaliar o tratamento de infeções bacterianas com antibióticos, monitorizar terapêuticamente doenças reumáticas e avaliar a terapêutica anti-

inflamatória. As medições sensíveis da PCR foram utilizadas e discutidas para a detecção precoce de infecções em pediatria e na avaliação de riscos de doença coronária cardíaca (Proteína C reativa de alta sensibilidade ou ultra sensível). Chegou-se à conclusão de que a medição da alta sensibilidade da PCR pode ser utilizada como marcador para prever o risco de doença cardíaca coronária em pessoas aparentemente saudáveis e como indicador para prognóstico de eventos recorrentes.

5.2.8.1. Princípio do teste

Trata-se de um ensaio imunoturbidimétrico com intensificação da reação por partículas. A PCR humana aglutina-se com partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PCR. O precipitado é determinado turbidimetricamente.

5.2.9. Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas no organismo humano. A sua síntese ocorre no fígado e a excreção é feita ao nível dos rins. A sua determinação é utilizada no diagnóstico e tratamento de diversas perturbações renais e metabólicas, incluindo insuficiência renal, gota, psoríase e na monitorização de doentes sob terapêutica citotóxica.

5.2.9.1. Princípio do teste

Trata-se de um ensaio colorimétrico enzimático. A uricase desdobra o ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogénio. Na presença da peroxidase, a 4-aminofenazona é oxidada pelo peróxido de hidrogénio, formando um corante quinona-diimina. A intensidade da cor da quinona-diimina formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico e é determinada medindo o aumento da absorvância.

5.2.10. Creatinina

A creatinina é um produto do fosfato de creatina no metabolismo muscular, que normalmente é gerado no organismo a uma velocidade razoavelmente constante, dependente da massa muscular.

A sua determinação no soro ou plasma constitui o método mais utilizado na avaliação da função renal, uma vez que é filtrada livremente pelos glomérulos e, em condições normais, não é re-absorvida pelos túbulos em quantidades relevantes. Tem valor de diagnóstico e prognóstico nas seguintes situações: nefropatias (nefrose por produtos

tóxicos como Hg e Ag), insuficiência cardíaca (pode existir uma retenção discreta ou moderada de creatinina, embora não exista verdadeira nefropatia), e nas obstruções urinárias (próstata, bexiga, ureter, cálculos e anúria reflexa) que produzem elevações da creatinina, reversíveis com a reparação da obstrução.

5.2.10.1. Princípio do teste

A determinação da creatinina é feita através de um ensaio colorimétrico cinético baseado no método de Jaffé. Numa solução alcalina, a creatinina forma um complexo amarelo-avermelhado com picrato. A taxa de formação do corante é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

5.2.10.2. Clearance da creatinina

Como só é observado um aumento da creatinina no sangue quando ocorrem lesões graves dos nefrônios, a determinação da creatinina não é adequada para detetar a doença renal numa fase inicial. Um teste consideravelmente mais sensível e que permite obter uma melhor estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) é o teste da clearance da creatinina, que se baseia na concentração de creatinina na urina, no soro ou plasma e na taxa do fluxo urinário. Para este teste é necessária uma amostra de urina obtida em tempo determinado (normalmente 24 horas) e uma amostra de sangue. Os valores de creatinina determinados no sangue e urina são aplicados à equação seguinte:

$$\text{Clearance creatinina (mL/min)} = \frac{[\text{Creatinina Urina}] \times \text{Volume urina (mL)}}{[\text{Creatinina Soro}] \text{ Tempo da colheita (min)}}$$

5.2.11. Bilirrubina total e direta

O doseamento da bilirrubina é um parâmetro fundamental para o estudo da função hepática. A bilirrubina forma-se no sistema reticuloendotelial, durante a degradação dos eritrócitos envelhecidos. A porção heme da hemoglobina e de outras proteínas que contêm heme é removida, metabolizada em bilirrubina e transportada para o fígado sob a forma de complexo com a albumina sérica. No fígado, a bilirrubina é conjugada com ácido glucorónico, para solubilização e subsequente transporte através do canal biliar, e eliminação através do aparelho digestivo.

Bilirrubina apresenta-se sob 3 formas: não conjugada, conjugada e ligada à albumina com diferente solubilidade em meio aquoso. As doenças ou condições que produzem bilirrubina mais rapidamente do que o fígado consegue metabolizar, fazem com que os

níveis de bilirrubina não conjugada (indireta) aumentem na circulação. A imaturidade hepática e várias outras doenças em que o mecanismo de conjugação da bilirrubina está alterado provocam elevações semelhantes da bilirrubina não conjugada em circulação. A obstrução do canal biliar ou as lesões da estrutura hepatocelular causam aumentos dos níveis tanto da bilirrubina conjugada (direta), como da não conjugada (indireta) na circulação.

5.2.11.1. Princípio do teste da Bilirrubina total

A Bilirrubina total é determinada através de um ensaio colorimétrico. Na presença de um agente solubilizante apropriado, liga-se a um ião diazônio em meio ácido. A intensidade da cor do azo-corante vermelho formado é diretamente proporcional à bilirrubina total e pode ser determinada fotometricamente.

5.2.11.2. Princípio do teste da Bilirrubina direta

A bilirrubina conjugada reage diretamente com sal 3,5 diclorofenil diazônio em tampão ácido, formando a azobilirrubina de cor vermelha. A intensidade da cor do azo-corante vermelho formado é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina direta, sendo determinada fotometricamente.

5.2.12. Ionograma

O ionograma é determinado por potenciometria, já descrita anteriormente.

No plasma existem diversos eletrólitos, positivos como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , ou negativos como o Cl^- , HCO_3^- , fosfatos e proteínas. Os seus valores são mantidos em níveis relativamente constantes, e sobretudo a electroneutralidade, pelo que alterações aos valores normais podem indicar situações patológicas. O objetivo do ionograma é quantificar os iões presentes numa amostra biológica, sendo que se determinam os iões Na^+ , K^+ e Cl^- .

O sódio é o principal catião do líquido extracelular, essencial na manutenção da pressão osmótica nos compartimentos extracelulares. A hipernatremia (excesso de Na^+) pode resultar de um fornecimento excessivo de sódio (por exemplo, por ingestão de água do mar), por retenção (hiperaldosteronismo, síndrome de Cushing) mas em geral reflete uma desidratação (por perda de água ao nível gastrointestinal, transpiração, febre,

queimaduras). A hiponatrémia (valor baixo de Na^+) pode ser devida a perdas urinárias (dosagem excessiva de diuréticos) ou digestivas (vômitos, diarreia abundante), entre outras.

O potássio é o principal cátion intracelular, que se mantém no interior da célula pois difunde muito lentamente através da sua membrana, ao mesmo tempo que a bomba de Sódio-potássio o transporta no sentido contrário ao do seu gradiente de concentração. Esta bomba é crítica para a manutenção e ajuste dos gradientes iônicos dos quais dependem a transmissão do impulso nervoso e a contractilidade dos músculos esquelético e cardíaco. A Hiperkaliêmica (excesso de K^+) pode resultar da diminuição da excreção urinária do potássio ou da transferência do potássio celular para o plasma. A causa mais frequente é a insuficiência renal aguda. A Hipocaliemia (valor baixo de K^+) pode resultar de perdas digestivas (vômitos, tumores vilosos) ou urinárias (ingestão de diuréticos, Hiperaldosteronismo, Síndrome de Cushing).

O cloro é o principal ânion extracelular, que juntamente com o sódio representa a maioria dos componentes osmoticamente ativos do plasma. Encontra-se envolvido na manutenção da distribuição de água e pressão osmótica. A hiperclorémia (excesso de Cl^-) surge quando há hipernatrémia. No entanto, o cloro pode estar anormalmente aumentado em situação de sódio normal para compensar perdas do ião bicarbonato (HCO_3^-), no caso de haver perda digestiva de bicarbonatos (diarreias abundantes, aspirações digestivas). A hipoclorémia (valor baixo de Cl^-) pode estar associada a uma baixa de sódio, mas também pode existir independentemente, em situação de acidose metabólica devido ao aumento de outros ânions (ex: alcalose metabólica, cetoacidose diabética).

5.2.13. Cálcio

O cálcio é o elemento mineral mais abundante no organismo, encontrando-se principalmente nos ossos (99%), sob a forma de hidroxiapatite. O restante cálcio está distribuído no fluido extracelular e tecidos, em especial no músculo esquelético. Tem um papel crucial em processos de manutenção da vida, como a coagulação sanguínea, condução neuromuscular na excitabilidade do músculo-esquelético e cardíaco, síntese e regulação glandular e na conservação da integridade e permeabilidade da membrana celular.

O cálcio no soro existe sob três formas diferentes: cálcio ionizado ou livre, que é a forma fisiologicamente ativa, e corresponde aproximadamente a 50% do cálcio total; 5% está complexado com uma variedade de aniões, particularmente fosfato e citrato; o restante (cerca de 45%) está ligado a proteínas, principalmente albumina e globulinas. A distribuição das três formas pode ser alterada por uma mudança de pH dos fluidos extracelulares ou da concentração da proteína. A acidose promove um aumento do cálcio ionizado, enquanto a alcalose acusa o seu declínio. Um aumento das proteínas plasmáticas resulta num aumento do cálcio total que reflete um aumento do cálcio ligado, o inverso acontece com a diminuição das proteínas.

A hormona da paratiroide (PTH), a calcitonina e a vitamina D, controlam os níveis séricos do cálcio no organismo. O aumento do nível de cálcio, hipercalcémia, poderá estar associado a um aumento da mobilização da fração óssea como no caso da osteoporose, ou de neoplasias ósseas. O cálcio também se apresenta alto no hiperparatiroidismo, absorção intestinal aumentada, mieloma múltiplo e em outras doenças neoplásicas.

A hipocalcémia pode ser observada em casos de hipoparatiroidismo, esteatorreia, insuficiência renal, pancreatite, síntese deficiente de vitamina D.

5.2.13.1. Princípio do teste

Os iões de cálcio reagem com 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) em condições alcalinas e formam um complexo. Este complexo reage na segunda etapa com EDTA. A alteração da absorvância é diretamente proporcional à concentração de cálcio e é medida fotometricamente.

5.2.14. Fósforo

O fósforo está presente maioritariamente no tecido ósseo (80-85%) sob a forma de hidroxiapatite. As restantes frações distribuem-se nas membranas celulares sob a forma de fosfolípidos, nos ácidos nucleicos e também sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), que está envolvida na transferência de energia. No plasma está presente como fosfato de cálcio, portanto, o nível de fósforo plasmático está intimamente relacionado com os níveis de cálcio apresentando uma relação de reciprocidade. Um aumento num dos componentes é geralmente acompanhado por decréscimo do outro. A determinação do fósforo no soro e urina está associada à deteção de desordens renais, ósseas e das glândulas paratiróides. Um aumento do fósforo sérico pode ocorrer na hipervitaminose

D, hipoparatiroidismo e insuficiência renal. Níveis reduzidos são observados em casos de raquitismo (deficiência em vitamina D), hiperparatiroidismo e síndrome de Fanconi. Não se devem realizar determinações de fósforo passadas 24h da colheita, exceto se tenha separado previamente o soro dos glóbulos (por exemplo por utilização de tubos de colheita com gel), visto que os eritrócitos contêm níveis elevados de ésteres orgânicos que são hidrolisados a fosfato inorgânico durante o armazenamento do sangue e esse processo ocorre mesmo que se mantenha o soro refrigerado.

5.2.14.1. Princípio do teste

O fosfato inorgânico forma um complexo de fosfomolibdato de amônio, que tem a fórmula $(\text{NH}_4)_3[\text{MoO}_3]_{12}$, com molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico. A concentração de fosfomolibdato formado é diretamente proporcional à concentração de fosfato inorgânico e é medida fotometricamente.

5.2.15. Magnésio

O magnésio desempenha um papel estrutural nos ácidos nucleicos e partículas ribossomais. É necessário como um ativador para várias enzimas e participa na fosforilação oxidativa para a produção de energia. O corpo normalmente contém entre 21 - 28 g de magnésio, dos quais mais de 50% estão complexados com o cálcio e o fosfato no osso. Apenas aproximadamente 1% do magnésio total é encontrado no líquido extracelular, pelo que tende a entrar e sair das células nas mesmas condições que o potássio. Aproximadamente 35% do magnésio no plasma está ligado a proteínas, principalmente à albumina e, portanto, as alterações na concentração de albumina podem afetar o magnésio. A hipomagnesémia tem como consequência a perturbação da função neuromuscular e pode ser causada por diarreia prolongada grave, síndromes de má-absorção, hiperaldosteronismo e terapêutica diurética. A hipermagnesémia foi identificada em casos de insuficiência renal glomerular e coma diabético. Existe indicação para a sua determinação nos seguintes casos: enfarte do miocárdio, arritmia cardíaca refratária, alcoolismo, hipocaliémia, hipocalcémia e hiponatrémia refratárias, terapêutica com diuréticos, intoxicação pela digoxina, terapêutica com aminoglicosídeos e anfotericina B, diarreias severas, alteração dos eletrólitos de causa desconhecida, irritabilidade neuromuscular de causa desconhecida, principalmente na ausência de hipocalcémia, terapêutica com agentes nefro ou citotóxicos, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

5.2.15.1. Princípio do teste

O magnésio é determinado a partir de um método colorimétrico com clorofosfonazo III. O clorofosfonazo III (ZPZ III) liga-se ao magnésio e causa um aumento da absorvância. O EGTA (ácido tetra-acético etilenebis(oxietilenenitrilo)) é utilizado para inibir a ligação do cálcio ao CPZ III. As interferências de absorvância não específicas são reduzidas pela adição de EDTA (ácido etilenediaminetetra-acético), que remove o magnésio do complexo magnésio-CPZ III e possibilita uma medição exata do branco amostra. A diferença de absorvância entre o complexo magnésio-CPZ III e o complexo tratado com EDTA é a absorvância devia apenas ao magnésio.

5.2.16. Ferro

O ferro é essencial para a maioria dos organismos vivos e participa numa variedade de processos vitais, desde os mecanismos oxidativos celulares até ao transporte de oxigénio. O ferro é ingerido com a alimentação sob a forma férrica (Fe^{3+}); chegando ao estômago, por ação do ácido ascórbico, ácido clorídrico e glutatião presentes no suco gástrico, é convertido na forma ferrosa (Fe^{2+}), que é absorvida. Nas células das mucosas, os iões Fe^{2+} ligam-se às moléculas de transporte. Antes de passarem para o plasma, os iões são oxidados pela ceruloplasmina a Fe^{3+} e ligados à transferrina sob esta forma. É na forma do complexo transferrina-ferro que praticamente todo o ferro sérico é transportado no plasma sanguíneo. Cada molécula de transferrina tem a capacidade de transportar um máximo de 2 moléculas de Fe^{3+} . Um dos principais destinos do ferro é a sua incorporação na célula eritróide a nível da medula.

As determinações de ferro são levadas a cabo para o diagnóstico e monitorização de anemias (microcíticas, macrocíticas, normocíticas, hemolíticas), hemoglobinopatias, doenças da medula óssea, lesão tóxica da medula óssea, doenças crónicas renais, hemocromatose. A diminuição de ferro ocorre em associação com deficiência generalizada de ferro, conseqüente de uma dieta pobre em ferro, absorção inadequada ou perda crônica como resultado de hemorragia, perturbação na libertação do ferro pelo sistema reticuloendotelial associado a um processo infeccioso. As elevações de ferro sérico podem estar associadas à destruição aumentada de eritrócitos (anemia hemolítica), formação sanguínea diminuída (envenenamento por chumbo, deficiência de piridoxina), libertação aumentada de ferro do armazenamento (necrose celular hepática

aguda), armazenamento defeituoso de ferro (anemia perniciosa), velocidade aumentada de absorção (hemocromatose e siderose transfusional).

5.2.16.1. Princípio do teste

Para determinação do ferro é utilizado um ensaio colorimétrico. Em condições acídicas, o ferro é libertado da transferrina. O ascorbato reduz os iões de Fe^{3+} libertados a iões Fe^{2+} que, de seguida, reagem com FerroZine e formam um complexo corado. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de ferro, sendo determinada fotometricamente.

5.2.17. Título de antiestreptolisina O (TASO)

A estreptolisina O é uma enzima produzida pelos estreptococos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Estes microrganismos têm a capacidade de causar diferentes infeções: doenças da pele ou amigdalites que podem ser seguidas de glomerulonefrite, endocardite aguda, doença de Sydenham e febre reumática aguda. Estas infeções podem, mais tarde, dar origem a lesões cardíacas ou renais. O diagnóstico precoce, tratamento e monitorização do doente permitem reduzir estes riscos.

5.2.17.1. Princípio do teste

É um teste imunoturbidimétrico. Os anticorpos anti-estreptolisina O aglutinam-se com partículas de látex revestidas com antígenos estreptolisina O. O precipitado é determinado turbidimetricamente.

5.2.18. Fator reumatóide

Os fatores reumatóides são um grupo heterogéneo de autoanticorpos dirigidos contra as determinantes antigénicas da região Fc das moléculas de IgG. São importantes no diagnóstico da artrite reumatóide, mas também podem ser detetados noutras doenças inflamatórias reumáticas e outras doenças não reumáticas. Também são encontrados em pessoas saudáveis acima dos 60 anos.

5.2.18.1. Princípio do teste

A determinação é feita através de um ensaio turbidimétrico. A IgG inativada por calor e ligada a partículas de látex, reage com os anticorpos anti-RF na amostra e forma

complexos antígeno/anticorpo. Estes, após aglutinação, são determinados por turbidimetria.

5.2.19. Aspartato aminotransferase

A enzima aspartato aminotransferase (AST), também conhecida como transaminase glutâmica oxaloacética (GOT), encontra-se amplamente distribuída pelo tecidos, principalmente o hepático, cardíaco, muscular esquelético e renal. Encontram-se níveis séricos elevados em doenças que envolvem estes tecidos. As doenças hepatobiliares, como a cirrose, o carcinoma hepático e a hepatite viral, provocam um aumento dos níveis séricos de AST. A seguir a um enfarte do miocárdio, a AST sérica aumenta, atingindo o seu pico máximo dois dias após a ocorrência. A aparente redução dos níveis séricos desta enzima pode estar relacionada com a diminuição do fosfato piridoxal, o grupo prostético das AST, de onde resulta

5.2.19.1. Princípio do teste

A AST na amostra catalisa a transferência de um grupo amina entre L-aspartato e 2-oxoglutarato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato reage então com NADH na presença de malato desidrogenase (MDH), formando NAD^+ . A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da AST. É determinada medindo a diminuição da absorvância.

5.2.20. Alanina aminotransferase

A alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico pirúvica (GPT) está presente em vários tecidos, mas a sua principal fonte é o fígado, tornando-se um parâmetro de referência para o diagnóstico de doenças hepáticas.

Os aumentos séricos da ALT verificam-se nas hepatites, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma hepático e no abuso crônico de álcool. Apresenta apenas um ligeiro aumento em doentes com enfarte agudo do miocárdio sem complicações. Quando há um comprometimento hepático, tanto a ALT como a AST séricas ficam elevadas, mas a ALT é mais específica do fígado, para além de que o seu aumento persiste durante mais tempo.

5.2.20.1. Princípio do teste

A ALT catalisa a reação dentre L-alanina e 2-oxoglutarato. O piruvato formado é reduzido por NADH numa reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e NAD^+ . A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica de ALT. É determinada medindo a diminuição da absorvância.

5.2.21. Gama glutamiltransferase

Esta enzima é utilizada no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares e como teste de despistagem para o alcoolismo oculto.

5.2.21.1. Princípio do teste

É feito um ensaio colorimétrico enzimático no momento da sua determinação. A Gama-GT transfere o grupo gama-glutamil de L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para glicilglicina. A quantidade de 5-amino-2-nitrobenzoato libertada é proporcional à atividade da Gama-GT na amostra. É determinada medindo o aumento da absorvância fotometricamente.

5.2.22. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina no soro é o conjunto de quatro isoenzimas: fração hepática, fração óssea, fração placentar e fração intestinal. Está presente nos hepatócitos, osteoblastos, leucócitos, rins, baço, placenta, próstata e intestino delgado. A sua presença nos osteoblastos motivou a sua utilização no diagnóstico e monitorização de patologias ósseas, justificando que nas crianças a sua atividade no soro seja superior à dos adultos, uma vez que estas se encontram em período de crescimento, assim como em mulheres pós menopausicas, devido à osteoporose.

Ocorre um aumento da fosfatase alcalina em todas as formas de colestase, em particular na icterícia obstrutiva e doenças que se caracterizam pela formação aumentada de tecido ósseo ou alteração óssea (doença de Paget, hiperparatiroidismo, raquitismo, osteomalacia, fraturas e tumores malignos).

5.2.22.1. Princípio do teste

A sua determinação é feita por ensaio colorimétrico. Em presença de iões magnésio e zinco, o p-nitrofenil fosfato é clivado por fosfatases, formando fosfato e p-nitrofenol. O

p-nitrofenol libertado é diretamente proporcional à atividade catalítica da ALP. É determinada medindo o aumento da absorvância.

5.2.23. Lactato desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase catalisa a oxidação reversível do lactato em piruvato e encontra-se amplamente distribuída a nível dos tecidos, sendo mais abundante no miocárdio, rins, fígado e músculo.

Os níveis elevados de LDH observam-se em doentes com anemia megaloblástica, enfarte do miocárdio, carcinoma disseminado, leucemia e traumatismos. Níveis ligeiramente aumentados encontram-se em casos de anemias hemolíticas, distrofia muscular, enfarte pulmonar, hepatite, síndrome nefrótica e cirrose.

5.2.23.1. Princípio do teste

A LDH catalisa a reação entre piruvato e NADH formando L-lactato e NAD^+ . A taxa inicial de oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH. É determinada medindo a diminuição da absorvância.

5.2.24. Creatina cinase

A creatina cinase é um dímero composto por subunidades derivadas do músculo (M) ou do cérebro (B). Foram identificadas 3 isoenzimas: MM, MB e BB.

A CK sérica normal é predominantemente a isoenzima CK-MM. Encontram-se níveis séricos de CK em doenças músculo esqueléticas, particularmente na distrofia muscular. A fração CK-MB encontra-se principalmente no tecido do miocárdio e é geralmente detetada durante o período de 48 horas que se segue ao aparecimento de um enfarte do miocárdio. A utilização de CK total e da CK-MB no diagnóstico de enfarte do miocárdio é a aplicação mais importante desta enzima. O seu aumento também está relacionado com a isquemia cerebral, doença vascular cerebral aguda e traumatismo craniano.

5.2.24.1. Princípio do teste

Para a determinação da CK utiliza-se um teste UV, que consiste na deteção de variações de absorvância na zona dos ultra-violetas. A reação inicia-se com a conversão do fosfato

de creatina pela CK e culmina com a determinação de NADPH. A taxa de formação de NADPH é diretamente proporcional à atividade catalítica da CK e é determinada medindo o aumento da absorvância.

5.2.25. Amilase

As α -amilases catalizam a degradação hidrolítica dos hidratos de carbono poliméricos, como a amilose, a amilopectina e o glicogénio. Existem 2 tipos de α -amilases: a do tipo pancreático (P) e a do tipo salivar (S). Enquanto o tipo P pode ser atribuído quase exclusivamente ao pâncreas e, por isso, é específica do órgão, a de tipo S tem origem em diversos locais: além de se encontrar na saliva, existem também nas lágrimas, no suor, no leite materno, no líquido amniótico, nos pulmões, nos testículos e no epitélio das trompas de Falópio.

A sua determinação é importante no diagnóstico das doenças pancreáticas, sobretudo no diagnóstico e monitorização terapêutica da pancreatite aguda. Além de ocorrer na pancreatite aguda e na fase inflamatória da pancreatite crónica, também pode encontrar-se o seu aumento em casos de insuficiência renal, inflamação pulmonar, doenças das glândulas salivares, entre outros.

5.2.25.1. Princípio do teste

Para a sua determinação é utilizado um ensaio colorimétrico enzimático. Oligossacarídeos definidos, como o 4,6-etilideno-(G₇)p-nitrofenil-(G₁)- α -D-maltoheptaósido (etilideno-G₇PNP), são separados pela ação catalítica das α -amilases. Os fragmentos G₂PNP, G₃PNP e G₄PNP assim formados são completamente hidrolisados em p-nitrofenol e glicose pela α -glicosidase. A intensidade da cor do p-nitrofenol formado é diretamente proporcional à atividade da α -amilase. É determinada medindo o aumento da absorvância.

5.2.26. Fosfatase ácida

A fosfatase ácida sérica é constituída por 5 isoenzimas produzidas sobretudo pelos eritrócitos, plaquetas, células reticuloendoteliais do baço e fígado e células epiteliais dos rins, ossos e próstata. Num indivíduo do sexo masculino, cerca de metade da fosfatase ácida total é fosfatase ácida prostática, produzida maioritariamente (mas não exclusivamente) pela próstata.

Geralmente, os níveis de fosfatase ácida total e da fosfatase ácida prostática aumentam na presença de carcinoma da próstata progressivo e metastático. Em 80% dos doentes com cancro da próstata metastática este aumento depende da fase da doença. Verifica-se um aumento dos níveis de fosfatase ácida na doença de Gaucher, doença de Niemann-Pick, 1 a 2 dias após a cirurgia da próstata, biópsia, manipulações ou cateterização e na presença de hipertrofia benigna da próstata, prostatite e enfarte prostático.

5.2.26.1. Princípio do teste

Para a determinação da fosfatase ácida é feito um teste colorimétrico. O 1-naftol libertado durante a hidrólise enzimática do 1-naftilfosfato é convertido num corante azóico através de acoplação com o fast red TR (2-amino-5-clorotolueno) diazotado. O tartarato é utilizado como inibidor específico da fosfatase ácida prostática. É possível determinar diretamente a fosfatase ácida prostática durante a medição da fosfatase ácida total (ACP) num canal, e da fosfatase não prostática (NPP) noutra canal. O programa específico do equipamento imprime a diferença entre as duas determinações como fosfatase ácida prostática:

$$\text{Atividade FNP} = \text{Atividade ACP} - \text{Atividade NPP}$$

5.3. Eletroforese das proteínas plasmáticas

A utilização desta técnica permite identificar alterações entre as concentrações das principais proteínas plasmáticas, podendo elucidar acerca de várias situações patológicas: o pico gama monoclonal e policlonal, a ponte cirrótica, entre outros. Por exemplo, a figura 14 mostra um perfil eletroforético de proteínas normal e o de um doente com cirrose hepática (diminuição da albumina, aumento das gamaglobulinas, planalto beta-gama). A razão albumina/globulina também poderá alertar para glomerulonefrites, inflamações ou síndrome nefrótico.

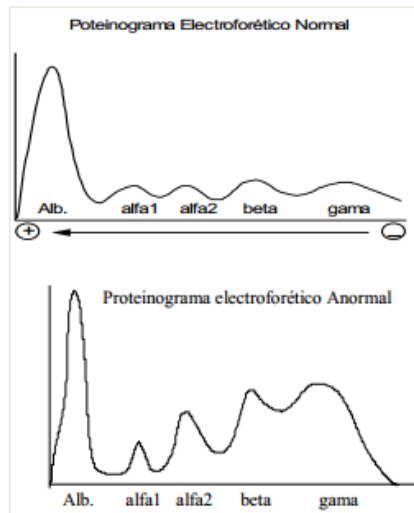


Figura 14- Proteinogramas eletroforéticos: normal e patológico.

5.3.1. Minicap

Para esta determinação o laboratório utiliza o MINICAP (Figura 15), um aparelho automático com leitura de código de barras, que faz a separação das frações das proteínas no soro usando um sistema de dois capilares (eletroforese capilar).



Figura 15- MINICAP da Sebia® electrophoresis.

Fonte: http://www.sebia.com/V3/php/contenu_materiel.php?id_produit=78

A eletroforese capilar é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças nas suas mobilidades eletroforéticas. O uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15-100 μm) permite uma melhor dissipação do calor, possibilitando uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise. A eletroforese capilar permite separar as proteínas séricas totais em 5 frações distintas: Albumina, Alfa 1, Alfa 2, Beta

e Gamaglobulinas. A banda da albumina é relativamente homogénea, no entanto as restantes são compostas por uma mistura de diferentes proteínas.

A determinação dos resultados obtidos requer o conhecimento das variações fisiopatológicas destas proteínas e tem de ser complementada com a determinação da concentração de proteínas totais do soro (efetuada no Cobas 6000).

5.4. Análise bioquímica da urina

5.4.1. Urina tipo II

A colheita de urina tipo II é efetuada pelo próprio utente e corresponde à 1.^a emissão da manhã, por ser a amostra mais concentrada, assegurando a deteção de substâncias químicas ou de elemento figurados que podem não estar presentes numa amostra colhida aleatoriamente. Deve ser recolhida em frasco fornecido pelo laboratório ou adquirido numa farmácia e guardada no frigorífico até à sua entrega no laboratório, no máximo 2 horas após a recolha.

A análise segue 3 passos básicos: avaliação visual da cor e aspeto da amostra de urina, a deteção de substâncias de interesse usando o aparelho Urisys 2400® da Roche e o exame microscópico do sedimento urinário.

O Urisys 2400 (Figura 16) é um sistema automático de análise de urinas, destinado à determinação qualitativa ou semi-quantitativa de analitos da urina, incluindo leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogénios, bilirrubina e eritrócitos, assim como o pH, a densidade específica, a cor e o aspeto. Estes parâmetros são indicativos de alterações renais, urinárias, hepáticas e metabólicas.



Figura 16 - Urisys 2400®

As principais funções deste analisador incluem o reconhecimento das amostras (leitura do código de barras), distribuição automática de tiras-teste, pipetagem automática de amostras e leitura fotométrica, em que os resultados dos testes se baseiam na leitura da intensidade de luz refletida pela tira teste. Os parâmetros analisados e o respetivo princípio do teste estão sumariamente descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros analisados no Urisys 2400® e respetivo princípio do teste.

pH	A zona de teste contém os indicadores vermelho e metilo, fenoftaleína e azul de bromotimol e reage especificamente com os iões H^+ . Os valores de pH em indivíduos saudáveis variam entre 5 e 6.
Leucócitos	O teste revela a presença das esterasas granulocitárias, que decompõem um éster indoxílico em indoxil, que por sua vez vai reagir com um sal de diazónio, produzindo um corante violeta.
Nitritos	O teste é baseado no princípio da prova de Griess. A reação revela a presença de nitritos e, indiretamente, de bactérias produtoras de nitritos na urina, através de uma coloração rosa-vermelha da zona de teste. Uma ligeira coloração rosa já indica bacteriúria significativa
Proteínas	O teste baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. A reação é particularmente sensível à albumina.
Glucose	A determinação da glucose é baseada na reação específica da glucoseoxidase/peroxidase (método GOD/POD).
Corpos cetónicos	O teste baseia-se no princípio da prova Legal.
Urobilinogénio	Um sal de diazónio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogénio, originando um corante azóico vermelho.
Bilirrubina	O teste baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazónio. Uma coloração ligeiramente cor-de-rosa já institui um resultado positivo.
Sangue	A ação, semelhante à peroxidase, da hemoglobina e da mioglobina catalisa especificamente a oxidação do indicador através

do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona do teste, originando uma coloração azul-esverdeada.

Após a passagem pelo sistema automático, todas as urinas são centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Este procedimento permite concentrar as partículas sólidas no fundo do tubo, para que possam ser observadas ao microscópio. No exame microscópico valoriza-se a presença de elementos como: eritrócitos, leucócitos, cristais, células epiteliais, entre outros.

5.4.2. Urina a tempo determinado (urina de 24 horas)

A colheita de urina de 24h constitui uma parte importante do exame e deve ser bem feita. Se o volume de urina colhida for muito reduzido, é necessário repetir a colheita. Antes da colheita, o utente é instruído para o seguinte procedimento:

- O início da colheita deverá dar-se preferencialmente pela manhã, desprezando-se a primeira micção;
- A partir daí, deverá colher a urina de todas as micções que se seguirem durante as 24 horas, se possível diretamente para o recipiente, sem perder qualquer quantidade de urina;
- A última micção deverá ser rigorosamente à mesma hora em que iniciou a recolha no dia anterior. A urina desta última micção deve ser totalmente vertida no recipiente de colheita;
- Se verificar que o frasco de 2 litros fornecido não é suficiente para guardar toda a sua urina de 24 horas, pode colocar o excesso de urina numa garrafa de água de 1,5 litros, limpa e seca.
- Durante o período de colheita da urina de 24 horas, o(s) recipiente(s) deverão ser armazenados no frigorífico.

Uma das principais indicações para a utilização deste tipo de amostra é a avaliação da diurese e função renal. A urina de 24 horas pode ser também utilizada para doseamentos de hormonas, metabolitos ou outras substâncias que são excretados na urina.

5.4.3. Pesquisa de drogas de abuso

Neste laboratório utilizam-se testes rápidos para detetar a presença de drogas de abuso (canabinóides, opiáceos, cocaína e MDMA) na urina. Os testes baseiam-se num imunoensaio cromatográfico baseado no princípio de vínculos competitivos. Durante o teste, a amostra de urina, colocada no poço correspondente, migra por ação capilar. Se a droga não estiver presente na amostra, não ocorrerá a saturação das pontes do anticorpo. As partículas revestidas de anticorpo serão capturadas por conjugado da droga imobilizado e uma linha colorida visível aparecerá na região da linha teste. Se a droga estiver presente na amostra, não se formará uma linha visível, pois ocorrerá uma saturação de todas as pontes de anticorpo anti-droga. Nestes casos o laboratório congela e guarda a amostra durante 3 meses. O teste é inválido se não surgir a linha de controlo.

Para a pesquisa de drogas de abuso, a amostra é obrigatoriamente colhida no laboratório, sempre na presença de um técnico. Tanto o utente como o técnico responsável assinam um documento modelo (cadeia de custódia).

5.5. Pesquisa de sangue oculto nas fezes

Esta análise é bastante requisitada no laboratório. Normalmente surge o pedido em utentes acima dos 40 anos, na suspeita de cancro colo-retal (CCR).

O CCR é uma das causas de morte mais frequentes por cancro. Uma deteção precoce do cancro baseia-se na observação de que o tratamento é mais eficaz quando o cancro é detetado mais cedo. Os pólipos adenomatosos que têm o potencial de se transformarem em cancro tendem a sangrar com frequência. Assim, a deteção de sangue oculto nas fezes representa uma ferramenta não invasiva e bem estabelecida para programas de rastreio do cancro do CCR, apesar de um resultado positivo não estar necessariamente ligado a esta patologia. Úlceras estomacais, fissuras, infeções e inflamações anais podem causar sangue nas fezes. Consequentemente, um resultado positivo indica um distúrbio que, sem apontar automaticamente para o cancro colorretal, deve ser investigado mais aprofundadamente.

5.5.1. Colheita da amostra

A amostra de fezes deverá ser colhida durante os 3 dias consecutivos e anteriores à análise (são 3 amostras por paciente para aumentar a probabilidade de encontrar sangue, caso exista).

As amostras de fezes não devem ser obtidas durante o período menstrual (ou nos 3 dias imediatamente antes ou depois), em casos de sangramento causado por obstipação, hemorróidas ou em caso de administração retal de determinados medicamentos.

5.5.2. Princípio do método

Para a determinação da presença de sangue oculto nas vezes utilizam-se testes rápidos da Biomérieux (bioNexia® FOBplus) com uma metodologia imunocromatográfica, em que se identifica a presença de hemoglobina humana através de reações a anticorpos específicos.

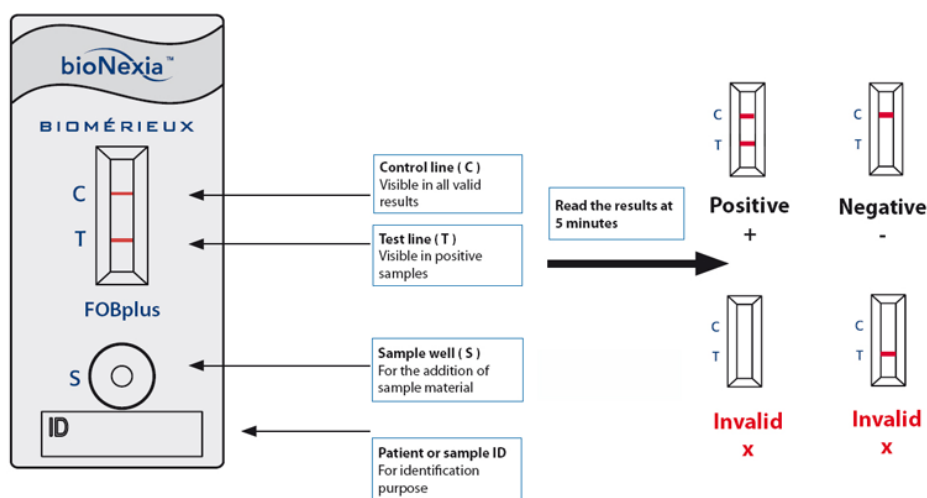


Figura 17 - Esquema ilustrativo do teste rápido bioNexia® FOBplus (Biomérieux)

extraído de <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bionexia-fobplus>

A hemoglobina presente na amostra de fezes reage com um anticorpo monoclonal específico marcado com ouro. O complexo ouro-anticorpo-hemoglobina migra por ação capilar pela membrana e atinge a região da linha de teste que se encontra pré-revestida com anticorpos anti-hemoglobina. O complexo é capturado pelos anticorpos imobilizados na membrana, resultando na formação de linhas vermelhas.

A presença de uma linha vermelha na região de teste indica um resultado positivo. Se a amostra de fezes não contiver hemoglobina, não surgirá nenhuma linha na região da linha de resultado de teste, indicando um resultado negativo.

Também deverá aparecer uma linha vermelha na região da linha de controlo. Esta linha serve de controlo do procedimento e indica se a migração do teste foi corretamente efetuada.

6. Controlo de qualidade

6.1. Controlo de qualidade interno (CQI)

O CQI permite avaliar a precisão, variabilidade e reprodutibilidade dos métodos laboratoriais, detetando erros aleatórios e permitindo a sua correção. Desta forma, o laboratório garante que os resultados obtidos possam ser utilizados com confiança no diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica.

Durante o estágio nas valências de hematologia e bioquímica pode verificar que o controlo interno é efetuado diariamente para todos os parâmetros, antes do processamento das amostras. Para análises quantitativas (ex: hemograma) existem três níveis de controlo (normal, alto e baixo) que são efetuados alternadamente, um por dia. Para as análises qualitativas alternam-se os controlos positivo e negativo.

A aceitação dos controlos é baseada nas respetivas bulas e interpretação dos gráficos de Levey-Jennings, tendo em conta as regras de Westgard. Os limites de aceitação são de $\pm 3SD$. Quando algum resultado se encontra fora dos limites de aceitação, procede-se à ação corretiva, como por exemplo uma calibração. As calibrações são também efetuadas sempre que há mudança de lote de reagente.

O controlo de qualidade interno usado na área da Microbiologia consiste na utilização de duas estirpes padrão, *Staphylococcus aureus* ATCC (*American Type Culture Collection*), e *Escherichia coli* ATCC, para testar as cartas de identificação e de antibiograma do VITEK® 2 Compact 15.

A avaliação da esterilidade dos meios de cultura é feita sempre que se dá a abertura de um novo lote. A placa é avaliada macroscopicamente ao nível da desidratação, cor e transparência do meio, e incubada mediante as respetivas condições ideais, para posterior observação do desenvolvimento bacteriano.

6.2. Avaliação externa da qualidade

A avaliação externa da qualidade, também denominada por avaliação de desempenho ou controlo da qualidade externo, consiste na avaliação do desempenho do laboratório através da análise dos resultados obtidos/emitidos nos exames de material de controlo realizados nas condições habituais de funcionamento.

Na prática, são enviadas amostras para o laboratório, por uma entidade externa. O conteúdo das amostras é conhecido, mas não revelado ao laboratório. As amostras são examinadas exatamente da mesma forma que as amostras dos utentes. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados esperados, e estatisticamente tratados pela entidade responsável.

O laboratório de Análises Clínicas Dr. Aires Raposo & Dr.^a Teresinha Raposo Lda. participa no programa NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

7. Conclusão

A realização do estágio neste laboratório foi uma experiência nova que me possibilitou a aquisição de novos conhecimentos e aplicação prática dos conteúdos teóricos adquiridos ao longo do mestrado em análises clínicas.

O estágio nas áreas de hematologia, microbiologia e bioquímica permitiu a compreensão do fundamento dos métodos utilizados pelos diferentes analisadores, a sua manutenção e correta interpretação dos resultados obtidos. Permitiu ainda que aprendesse a colher sangue e outros produtos biológicos e que aperfeiçoasse técnicas manuais e observação microscópica.

De um modo geral, a realização deste estágio permitiu-me adquirir uma visão global de um laboratório de análises clínicas e da sua aplicabilidade à Clínica.

Penso que os objetivos propostos inicialmente foram cumpridos e sinto que este estágio realçou o meu lado mais habilidoso, competente e humano.

8. Bibliografia

Fonseca AB, Lito LM, Costa MT. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Programa Nacional de Controlo da Infecção, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde; 2004.

Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda. [acesso em 28 mar 2014]. Disponível em <http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/home>

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Review of Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.

Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em Hematologia. 4^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Correia L. Slides da cadeira de Hematologia II, 6^o Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2013.

Manual do Operador: Test 1. Rev. 11, Alifax S.P.A., 2001.

ADAMS HA-8160 Operating Manual. A. Menarini Diagnostics Division, Arkray Inc., 2002.

Roche Diagnostics GmbH. *Cobas 6000 User's Manual*. Mannheim, Alemanha: Roche Diagnostics, 2005.

Silva MJ, Slides da cadeira de Bioquímica clínica II, 6^o Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2013.

Otta VT. Bioquímica Clínica para o laboratório: Princípios e interpretações. 4^aed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.