

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATORIO DE ESTÁGIO**  
**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

*Sónia Raquel Mota Faria*

**LISBOA, 2010**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
*Labamaro*

**Orientação:** Magda Maria Viana Soares Leitão

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

*Sónia Raquel Mota Faria*

LISBOA, 2010

## **Abstract**

Este relatório de estágio do Mestrado de Análises Clínicas pretende descrever todas as actividades na qual estive envolvida durante o período de estágio em Labamaro.

Na primeira parte, são descritos os métodos usados na execução de análises nas várias secções do laboratório (hematologia, bioquímica, imunologia e microbiologia) e a respectiva interpretação de resultados.

Na segunda parte, apresenta-se uma breve descrição das actividades desenvolvidas na introdução da secção de biologia molecular. Assim, são descritos os fundamentos básicos da técnica de PCR, do equipamento utilizado, da técnica de pesquisa do virus Influenza A H1N1 2009, a qual já está em funcionamento, e da técnica de pesquisa de HLA-B27 que vai entrar em processo de validação.

This report for the Clinical Biology Master pretends to describe all the activities on which I was involved during my practice in Labamaro.

The first part, has a description of all the methods used in the lab tests on all the laboratory sections (haemathology, biochemistry, immunology and microbiology) and the results evaluation involved in this testing.

In the second part of this report, there's a brief description of the Molecular Biology section. As so, the basic fundamentals of PCR are described in here, together with the fundamentals of the instrument used, the laboratory diagnosis of the Influenza H1N1 virus, which is already in use, and the laboratory diagnostics of HLA-B27 that will be entering soon in validation testing.

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>ÍNDICE .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1ª PARTE – RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....</b>                        | <b>8</b>  |
| <b>HEMATOLOGIA .....</b>  | <b>9</b>  |
| A. INTRODUÇÃO .....   | 9         |
| B. HEMOGRAMA, PLAQUETAS E RETICULÓCITOS .....                       | 10        |
| B1. Contador Hematológico: Sysmex XT-2000i .....                    | 11        |
| B2. Interpretação de Histogramas .....                              | 16        |
| B3. Algoritmo de interpretação de resultados .....                  | 18        |
| C. CITOLOGIA .....  | 19        |
| C1. Coloração de May-Grunwald-Giemsa .....                          | 19        |
| C2. Colorações para pesquisa de hematozoários em gota espessa ..... | 19        |
| D. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO .....                                 | 20        |
| E. ESTUDO DAS HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSÉMIA .....                  | 21        |
| F. HEMOGLOBINA GLICOSILADA .....                                    | 25        |
| G. IMUNO-HEMATOLOGIA .....  | 27        |
| G1. Grupagem A,B,O .....  | 27        |
| G2. Grupagem Rh .....   | 28        |
| G3. Coombs Directo e Indirecto .....                                | 29        |
| H. ESTUDO DA HEMOSTASE .....  | 30        |
| H1. Sistema vascular (Hemostase primária) .....                     | 30        |
| H2. Sistema de Coagulação .....                                     | 33        |
| <b>BIOQUÍMICA .....</b>   | <b>37</b> |
| A. INTRODUÇÃO .....   | 37        |
| SISTEMA OLYMPUS AU400 .....   | 38        |
| A. CARBOHIDRATOS .....  | 39        |
| A1. Glucose .....   | 39        |
| B. LÍPIDOS .....  | 41        |
| B1. Colesterol .....  | 41        |
| B2. Colesterol HDL e LDL .....                                      | 42        |
| B3. Triglicéridos .....   | 44        |
| C. ELECTRÓLITOS .....   | 45        |
| C1. Sódio, Potássio, Cloretos e Magnésio .....                      | 45        |
| C2. Cálcio .....  | 50        |
| C3. Fósforo .....   | 51        |
| ENZIMAS .....   | 52        |
| C4. Enzimas Hepáticas .....   | 52        |
| C5. Enzimas musculares .....  | 55        |
| C6. Enzimas pancreáticas .....                                      | 57        |
| D. FUNÇÃO RENAL .....   | 58        |
| D1. Creatinina .....  | 58        |
| D2. Ureia .....   | 59        |
| D3. Ácido úrico .....   | 60        |
| D4. Microalbuminúria .....  | 61        |
| E. METABOLISMO DO FERRO, HEMOGLOBINA E BILIRRUBINAS .....           | 62        |
| E1. Ferro .....   | 62        |
| E2. Transferrina .....  | 63        |
| E3. Capacidade total de fixação de ferro (CTFF) .....               | 63        |
| E4. Saturação da Transferrina .....                                 | 64        |
| E5. Bilirrubinas .....  | 65        |
| F. PROTEÍNAS .....  | 66        |
| F1. Proteínas totais .....  | 66        |

*Relatório de Estágio*  
*Mestrado de Análises Clínicas*

|     |  |            |
|-----|--|------------|
| F2. | <i>Proteinúria</i> .....   | 66         |
| F3. | <i>C3 e C4</i> .....   | 67         |
| F4. | <i>Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM)</i> .....                                | 68         |
| F5. | <i>Proteína C reactiva (PCR)</i> .....                                       | 70         |
| G.  | TESTES IMUNOLÓGICOS.....   | 71         |
| G1. | <i>Titulo de Estreptolisina A (TASO)</i> .....                               | 71         |
| G2. | <i>Factor Reumatóide</i> .....   | 72         |
|     | ELECTROFORESES .....   | 73         |
| A.  | ELECTROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS .....                                     | 73         |
| B.  | ELECTROFORESE DE LIPOPROTEÍNAS .....   | 78         |
|     | URIANÁLISE.....  | 81         |
| A.  | ANÁLISE DE URINA TIPO II.....  | 81         |
| B.  | CONTAGEM DE ADDIS .....  | 86         |
| C.  | PESQUISA DE DROGAS DE ABUSO.....   | 87         |
|     | EXAME DE FEZES .....   | 89         |
| A.  | SANGUE OCULTO.....   | 89         |
|     | ANÁLISE DE ESPERMA .....   | 90         |
| A.  | ESPERMOGRAMA.....  | 90         |
|     | <b>IMUNOLOGIA .....</b>  | <b>93</b>  |
| A.  | INTRODUÇÃO .....   | 93         |
|     | SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE IMUNOLOGIA .....                                     | 94         |
| A.  | SISTEMAS AUTOMÁTICOS .....   | 94         |
| A1. | <i>Sistema Bayer Advia Centaur</i> .....                                     | 94         |
| A2. | <i>Sistema DPC Immulite 2000</i> .....                                       | 95         |
| A3. | <i>Sistema Sorin para micro-Elisa</i> .....                                  | 96         |
| B.  | ÁREAS DE ESTUDO.....   | 97         |
| B1. | <i>Endocrinologia</i> .....  | 97         |
| B2. | <i>Alergologia</i> .....   | 98         |
| B3. | <i>Marcadores de anemia</i> .....  | 99         |
| B4. | <i>Marcadores Tumorais</i> .....   | 100        |
| B5. | <i>Serologia Infecciosa</i> .....  | 101        |
| B6. | <i>Monitorização Terapêutica</i> .....                                       | 103        |
|     | TÉCNICAS MANUAIS DE IMUNOLOGIA .....   | 104        |
| A.  | DIG (DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA GRAVIDEZ) .....                              | 104        |
| B.  | REACÇÃO DE WAALER-ROSE.....  | 104        |
| C.  | ANTIGÉNIOS FEBRIS .....  | 105        |
| D.  | REACÇÃO DE PAUL-BUNNEL.....  | 106        |
| E.  | REACÇÕES DE DETECÇÃO DE TREPONEMA PALLIDUM.....                              | 106        |
| E1. | <i>Teste RPR (Rapid Plasma Reagin)</i> .....                                 | 106        |
| E2. | <i>Teste TPHA</i> .....  | 106        |
| F.  | IMUNOFLUORESCÊNCIA.....  | 107        |
| F1. | <i>Identificação de Chlamydia trachomatis em colheitas urogenitais</i> ..... | 107        |
|     | AUTOIMUNIDADE.....   | 108        |
| G.  | ANTICORPOS ANTI-NUCLEARES (ANA).....   | 109        |
| G1. | <i>Metodologia para pesquisa de anticorpos anti-nucleares</i> .....          | 109        |
| G2. | <i>Pesquisa de anticorpos anti-dsDNA por IFI</i> .....                       | 111        |
| H.  | DOENÇAS ENDÓCRINAS.....  | 113        |
| H1. | <i>Anticorpos anti-tiróideos</i> .....                                       | 113        |
|     | <b>MICROBIOLOGIA .....</b>   | <b>114</b> |
| A.  | INTRODUÇÃO .....   | 114        |
|     | SISTEMAS AUTOMÁTICOS UTILIZADOS .....  | 115        |
| A.  | SISTEMA VITEK 2 COMPACT .....  | 115        |
|     | MEIOS DE CULTURA .....   | 117        |
|     | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS.....                                      | 122        |
| A.  | URINA .....  | 122        |
| B.  | HEMOCULTURAS .....   | 124        |
| C.  | APARELHO RESPIRATÓRIO SUPERIOR .....   | 126        |
| D.  | APARELHO RESPIRATÓRIO INFERIOR .....   | 128        |

|    |  |            |
|----|--|------------|
| E. | EXSUDADO OCULAR .....  | 131        |
| F. | EXSUDADO AURICULAR .....   | 134        |
| G. | EXAME BACTERIOLÓGICO DAS FEZES .....   | 136        |
| H. | APARELHO REPRODUTOR.....   | 139        |
| I. | EXSUDADOS PURULENTOS .....   | 142        |
| J. | EXAME MICOLÓGICO .....   | 143        |
|    | IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....   | 144        |
| A. | BACTÉRIAS: COCOS GRAM POSITIVOS .....  | 144        |
| B. | BACTÉRIAS: BACIOS GRAM NEGATIVOS - ENTEROBACTERIACEAE.....   | 146        |
|    | B1. <i>Enterobacteriaceae</i> .....  | 146        |
|    | B2. <i>Bacios Gram Negativos Não Fermentadores</i> .....   | 149        |
| C. | BACTÉRIAS: COCOBACIOS GRAM NEGATIVOS .....   | 151        |
|    | C1. <i>Género Haemophilus</i> .....  | 151        |
|    | C2. <i>Géneros Neisseria e Branhamella</i> .....   | 152        |
| D. | FUNGOS.....  | 153        |
|    | ANTIBIOGRAMA – TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....   | 154        |
| A. | MÉTODOS USADOS PARA EXECUÇÃO DE ATB’S .....  | 154        |
|    | A1. <i>Método das microdiluições</i> .....   | 154        |
|    | A2. <i>Método de Kirby-Bauer</i> .....   | 157        |
|    | <b>CONTROLO DE QUALIDADE.....</b>  | <b>160</b> |
|    | A. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO.....  | 160        |
|    | B. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....   | 160        |
|    | <b>2ª PARTE – INTRODUÇÃO DA PATOLOGIA MOLECULAR: APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PESQUISA DO VIRUS INFLUENZA H1N1 E ANTIGÉNIO HLA-B27.....</b> | <b>161</b> |
|    | <b>INTRODUÇÃO DA PATOLOGIA MOLECULAR EM LABAMARO .....</b>   | <b>162</b> |
|    | <b>PATOLOGIA MOLECULAR: INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>163</b> |
|    | A. ESPAÇO LABORATORIAL.....  | 163        |
|    | EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....  | 164        |
|    | A1. <i>Requisitos para obtenção de amostras extraídas para PCR</i> .....   | 164        |
|    | A2. <i>Quantidade de produto obtido</i> .....  | 164        |
|    | A3. <i>Métodos de extracção</i> .....  | 164        |
|    | A4. <i>Métodos de purificação</i> .....  | 165        |
|    | B. PCR E RT-PCR: PRINCÍPIO DO MÉTODO.....  | 166        |
|    | B1. <i>O ciclo de PCR</i> .....  | 166        |
|    | B2. <i>RT-PCR</i> .....  | 166        |
|    | B3. <i>PCR em Tempo Real</i> .....   | 167        |
|    | C. ROCHE LIGHTCYCLER 2.0.....  | 168        |
|    | D. PCR EM TEMPO REAL: MÉTODOS DE ANÁLISE.....  | 170        |
|    | <b>PESQUISA DE H1N1 2009.....</b>  | <b>171</b> |
|    | A. INTRODUÇÃO .....  | 171        |
|    | A1. <i>Virologia do Vírus Influenza</i> .....  | 171        |
|    | A2. <i>Epidemiologia</i> .....   | 172        |
|    | A3. <i>Manifestações clínicas e sintomatologia</i> .....   | 173        |
|    | A4. <i>Diagnóstico laboratorial</i> .....  | 173        |
|    | B. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 174        |
|    | B1. <i>Colheita</i> .....  | 174        |
|    | B2. <i>Extracção e purificação</i> .....   | 174        |
|    | B3. <i>qPCR one-step para Detecção de H1N1</i> .....   | 175        |
|    | C. ANÁLISE DE RESULTADOS.....  | 176        |
|    | D. CONCLUSÃO.....  | 176        |
|    | <b>HLA B27.....</b>  | <b>177</b> |
|    | A. CARACTERIZAÇÃO DO ANTIGÉNIO HLA-B27 E FISIOPATOLOGIA DAS ESPONDILOARTRITES.....   | 177        |
|    | A1. <i>Classificação das espondiloartrites</i> .....   | 177        |
|    | A2. <i>Genes do MHC e características moleculares do HLA-B27</i> .....   | 177        |
|    | A3. <i>Poder patogénico do HLA-B27: hipótese explicativas</i> .....  | 178        |

*Relatório de Estágio*  
*Mestrado de Análises Clínicas*

|                           |  |            |
|---------------------------|--|------------|
| B.                        | DETECÇÃO DE HLA-B27: AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....  | 181        |
| B1.                       | <i>Comparação de métodos: avaliação da técnica de PCR vs citometria de fluxo</i> ..... | 181        |
| B2.                       | <i>Comparação de métodos: PCR-SSP vs RT-PCR</i> .....                                  | 181        |
| C.                        | ESTUDO DA ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA PARA PESQUISA DE HLA-B27 PARA REAL TIME PCR.....        | 183        |
| C1.                       | <i>Extracção</i> .....   | 183        |
| C2.                       | <i>Amplificação</i> .....  | 183        |
| D.                        | CONCLUSÃO.....   | 183        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b> |  | <b>184</b> |

**1ª Parte – Relatório de Estágio**

## **Hematologia**

### **A. Introdução**

A esta secção do laboratório chegam vários tipos de tubos com amostras biológicas para proceder à respectiva análise. Dentro destes temos o tubo de EDTA tripotássico para contagens hematológicas, Citrato para hemostase e o tubo de Heparina Lítio para algumas técnicas especiais.

Na triagem de amostras de hematologia, os tubos de citratados destinados às provas de hemostase são centrifugados a 2000 rpm durante 10' e posteriormente, conjuntamente com os restantes tubos destinados à hematologia, são distribuídos pelos vários sistemas automáticos. Os tubos destinados a algumas provas manuais de hematologia são guardados no frigorífico até à respectiva utilização.

A equipa de colaboradores da secção de hematologia de Labamaro é constituída pelos seguintes elementos: uma Técnica Superior de Análises e u Análises Clínicas.

A Técnica de Análises Clínicas (TAC) tem como função a triagem dos tubos contendo amostras e a sua distribuição para os sistemas automáticos. É também responsável pelas listas de trabalho e verificação dos produtos em falta. Esta TAC faz também as colorações, as técnicas manuais e o funcionamento geral dos sistemas automáticos: Sysmex XT-2000I (hemogramas), Alifax (velocidade de sedimentação), Sysmex CA-560 (hemostase) e Arkray HA-5160 (hemoglobinas glicosiladas). As electroforeses de hemoglobinas são realizadas na secção de Bioquímica pela TAC de Bioquímica.

A Técnica Superior de Análises tem como função a organização, coordenação da secção, tomar nota das ocorrências durante o trabalho e auxilia a TAC quando necessário. No início do trabalho procede à avaliação dos resultados do controle de qualidade interno e, caso haja algum problema de carácter técnico contacta com os fornecedores para a sua resolução. Após a saída dos resultados a Técnica Superior procede à validação técnica e, no caso dos hemogramas, selecciona as lâminas a corar, e observa a morfologia de sangue periférico e confirma o resultado obtido no aparelho. Na sua ausência de Técnica Superior, a observação microscópica das lâminas é feita pelos Especialistas em Análises Clínicas do laboratório. Em caso de dúvida na observação ao microscópio a última palavra cabe a um dos especialistas.

Aos especialistas em Análises Clínicas cabe a validação biopatológica de processos e contacto com os clínicos prescritores e doentes quando aplicável. O controle de qualidade externo, depois da obtenção dos resultados na secção, é avaliado pelo Director Técnico.

## ***B. Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos***

A Hematologia de rotina é uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos. Dentro de um laboratório, esta inclui algumas das análises mais pedidas: ***Hemograma, Plaquetas e Velocidade de Sedimentação***. Os resultados obtidos revestem-se de uma importância razoável especialmente em conjugação com os resultados provenientes das restantes áreas.

Estas análises são realizadas através de métodos automáticos:

- Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos – Sysmex XT-2000i
- Velocidade de Sedimentação – Alifax

Estes aparelhos permitem uma rápida e precisa obtenção de resultados, suplantando os métodos manuais.



***Figura 1*** – Sysmex XT-2000i

## B1. Contador Hematológico: Sysmex XT-2000i

### **Princípio do aparelho**

Neste aparelho, tal como já foi dito anteriormente, são executados os seguintes pedidos: Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos. Para isso, utiliza-se amostras de sangue total colhido em tubos de EDTA K3.

Para um doente com estes três pedidos (Hemograma, Plaquetas e reticulócitos), a amostra dentro do aparelho será dividida em 5 partes para executar 5 diluições diferentes e seguir para os respectivos canais diferenciados:

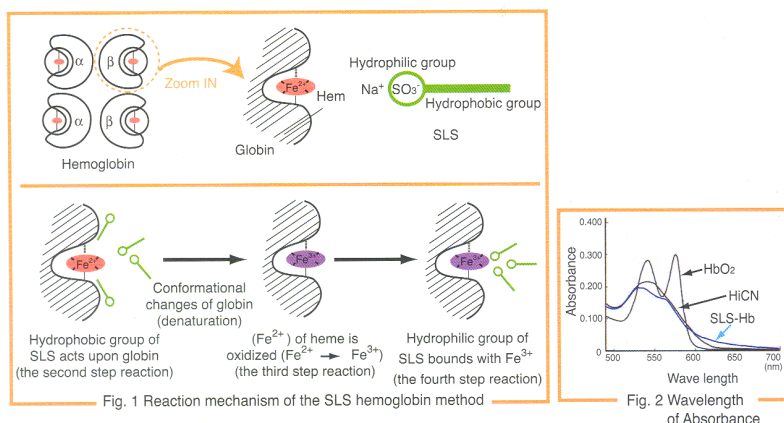
- Canal **HGB** – diluição 1:375
- Canal **RBC/PLT** – diluição 1:500
- Canal **4DIFF** – diluição 1:52
- Canal **WBC/BASO** – diluição 1:50
- Canal **RET/PLT-O** – diluição 1:255

### **Canal HGB – Metodologia SLS-Hb**

Esta metodologia permite-nos fazer a determinação da hemoglobina. O método SLS-Hb, tal como o nome indica, usa o surfactante Laurilsulfato de Sódio (SLS), evitando o uso de cianeto. A reacção ocorre pela seguinte ordem, após aspiração e diluição:

- 1- Hemólise dos eritrócitos;
- 2- Alteração da conformação da molécula de globulina;
- 3- Oxidação do ferro;
- 4- Formação do complexo SLS-Hb.

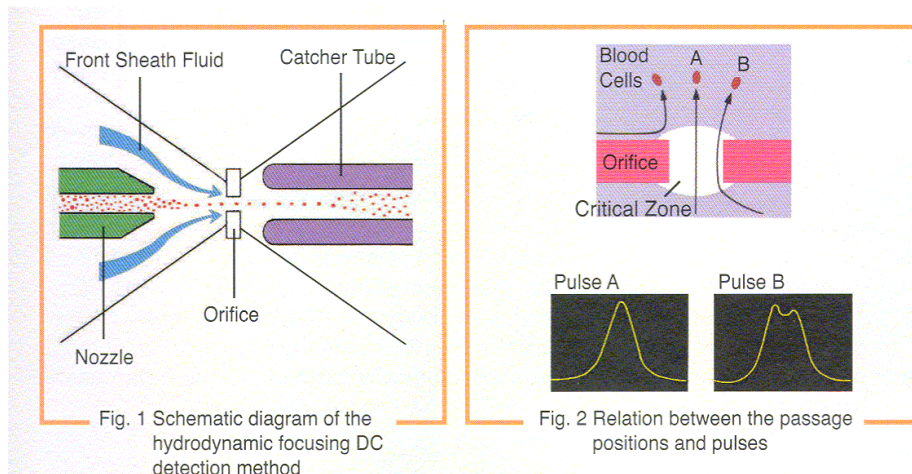
A quantificação é feita pela leitura da absorvância do pico a 535nm e do pico adjacente a 560nm.



**Figura 2** – 1. Mecanismo de Reacção do método SLS-Hemoglobina  
2. Gráfico comprimento de onda versus absorvância

### **Canal RBC/PLT – Método de detecção por Focagem Hidrodinâmica**

O XT-2000i conta e detecta o tamanho do eritrócitos e plaquetas usando o método da focagem hidrodinâmica (HDF). O objectivo da HDF é reduzir a perda e variação de pulsos devido à passagem não axial na zona de detecção e recirculação de células, os quais podem causar falsas contagens celulares.



**Figura 3 – Método da Focagem Hidrodinâmica**

1. Diagrama esquemático do método
2. Relação entre as posições de passagem e os pulsos obtidos

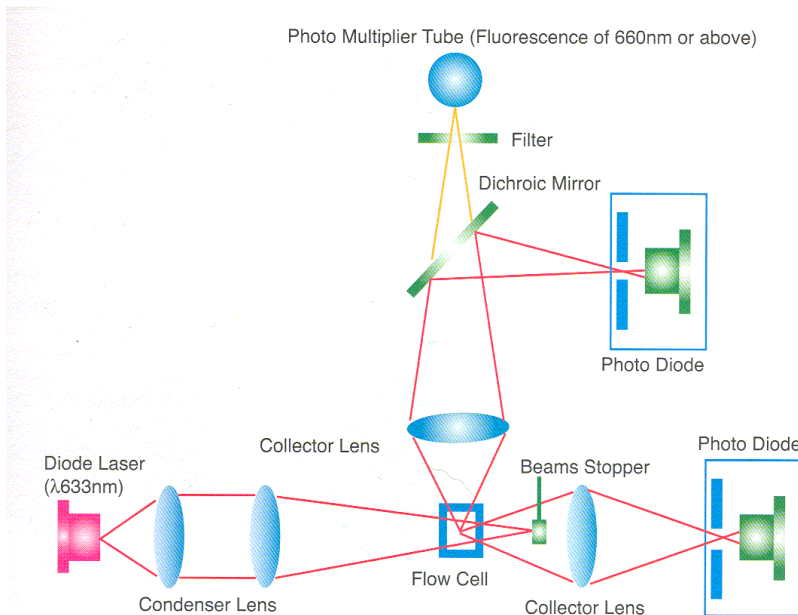
Neste método, as partículas, sob uma ligeira pressão, são injectadas a partir da abertura formando uma coluna de partículas. Esta coluna é rodeada pelo diluente, obrigando a um alinhamento partícula a partícula e, servindo, assim, de guia para a passagem das mesmas pelo orifício e subsequentemente pelo tubo de captura.

Neste canal obtém-se a contagem de eritrócitos, plaquetas, o volume globular médio e o volume plaquetário médio.

### **Canais 4DIFF, WBC/BASO e RET/PLT-O – Citometria de fluxo por laser semiconductor**

O laser semiconductor ilumina o espécimen e separa as células de acordo com os seus sinais:

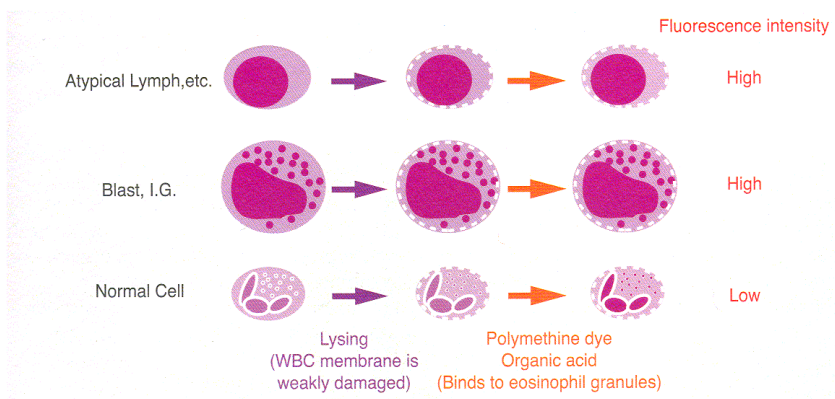
- *forward scatter* – esta intensidade luminosa indica-nos o volume celular;
- *side scatter* – dá-nos a informação do conteúdo celular, como o núcleo e grânulos;
- *side fluorescence* – indica a quantidade de DNA e RNA celulares.



**Figura 4** – Unidade óptica do Sysmex XT-2000i

### 1. Canal 4DIFF

O papel do surfactante, usado como primeiro reagente, consiste na lise e colapso dos eritrócitos e plaquetas, e na abertura de poros nas membranas dos glóbulos brancos. A seguir, o corante de Polimetina migra para dentro dos leucócitos danificados e liga-se aos ácidos nucleicos e orgânitos citoplasmáticos. Quando expostos à luz do laser a 633nm, a intensidade de fluorescência é proporcional ao conteúdo de ácido nucleico. Posteriormente, um ácido orgânico liga-se especificamente aos grânulos dos eosinófilos, permitindo a sua diferenciação dos neutrófilos através de um sinal superior de side scatter. Posteriormente, o aparelho diferencia os leucócitos em 4 tipos: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos.



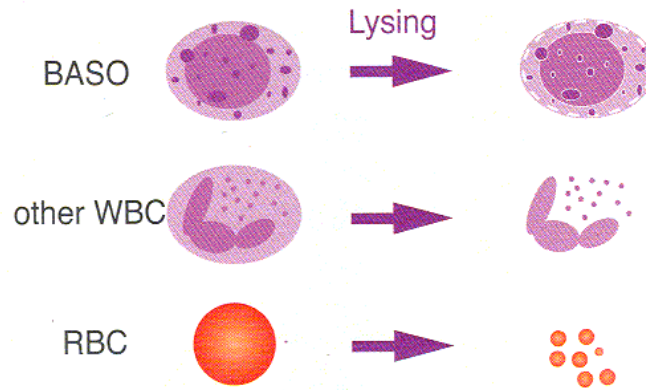
**Figura 5** – Mecanismo de acção no canal DIFF

### 2. Canal WBC/BASO

Neste canal, o Sysmex XT-2000i usa os sinais forward e side scatter. Um reagente ácido provoca uma lise fazendo diminuir os eritrócitos e plaquetas e reduz os leucócitos a simples núcleos, com excepção dos basófilos, permitindo a contagem do número total de Leucócitos e a contagem de Basófilos.

A redução de tamanho dos eritrócitos e plaquetas e a passagem dos leucócitos (com excepção dos basófilos) a simples núcleos é feita, novamente por um surfactante. As diferenças volumétricas resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas a partir das

informações providas dos feixes forward scatter e side scatter. Os dois feixes fazem também a diferenciação entre as células de tamanho menor anucleadas e as células nucleadas. O somatório das informações obtidas vai resultar na Contagem do número total de Leucócitos e a Contagem do número de Basófilos.



**Figura 6** – Mecanismo de acção no canal WBC/BASO

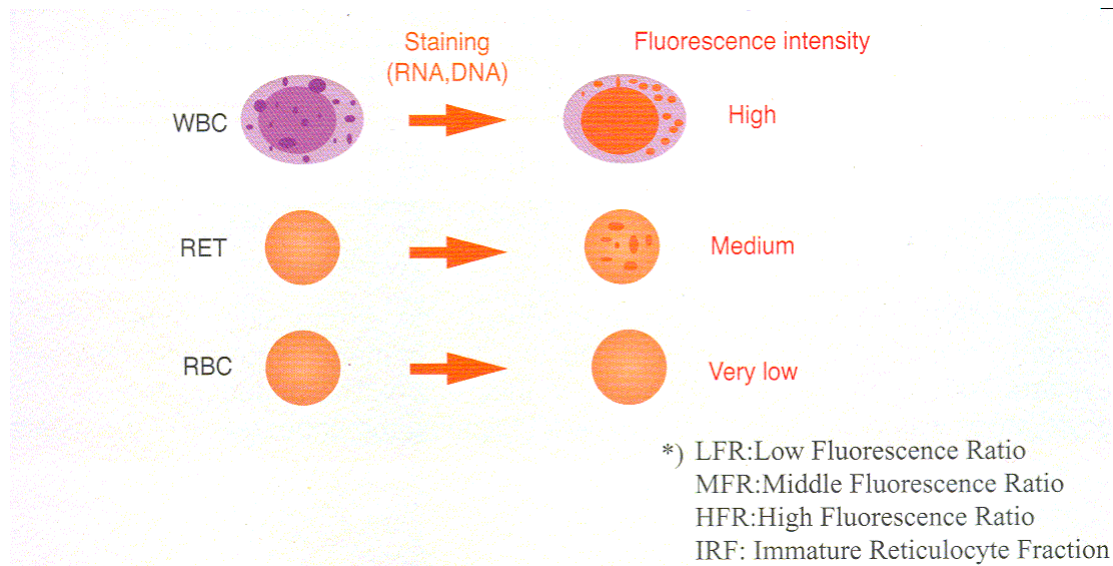
### 3. Canal RET/PLT-O

Neste canal, os ácidos nucleicos dos leucócitos e eritrócitos nucleados são corados, sendo contados através dos feixes forward scatter e side scatter. As células nucleadas são divididas em 3 graus, de acordo com a sua fluorescência:

- *LFR* – ratio de fluorescência baixo (low fluorescence ratio) – eritrócitos
- *MFR* – ratio de fluorescência médio (middle fluorescence ratio) – reticulócitos
- *HFR* – ratio de fluorescência alto (high fluorescence ratio) – leucócitos

O somatório da contagem MFR e HFR é apresentado como o ratio de reticulócitos imaturos (IRF). A contagem óptica de plaquetas também é aqui determinada, permitindo corrigir a contagem quando na presença de plaquetas gigantes e/ou eritrócitos macrocíticos.

O corante usado neste canal (RET-search II) contém 2 corantes. Estes penetram nas membranas celulares corando o RNA dos reticulócitos e o RNA/DNA das células nucleadas. Os reticulócitos são separados dos eritrócitos através da diferença de conteúdo em RNA e, separados das restantes células nucleadas, através das diferenças em conteúdo de DNA/RNA. Uma vez que, as células nucleadas, tais como os leucócitos e eritroblastos e eritrócitos com inclusões de Howell-Jolly, têm uma elevada intensidade de fluorescência, os reticulócitos, de intensidade de fluorescência mais baixa, são detectados facilmente permitindo uma contagem fiável dos mesmos.



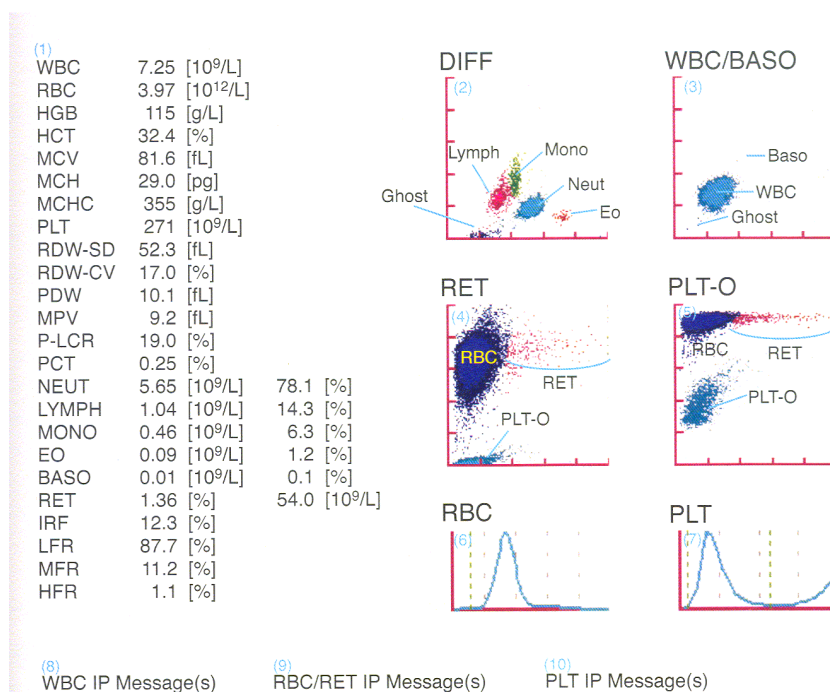
**Figura 7** – Mecanismo de acção no canal RET

## B2. Interpretação de Histogramas

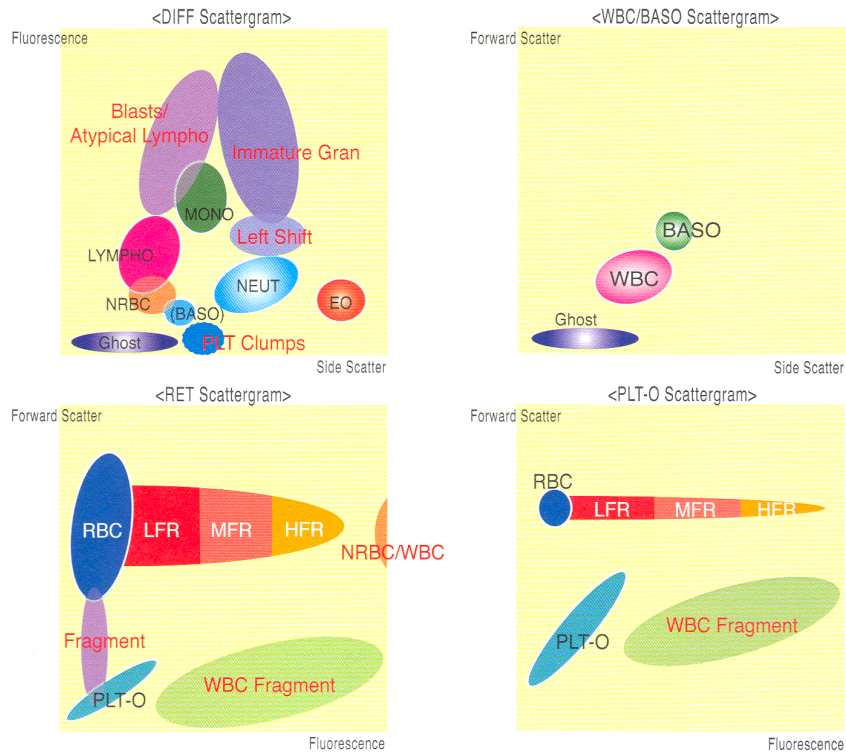
O resultado de um pedido de hemograma, plaquetas e reticulócitos é composto por:

- Eritrograma
- Leucograma
- Plaquetas
- Reticulócitos

Na linha inferior temos os alarmes (flags), os quais nos permitem chamar a atenção para resultados fora dos valores de referência ou com alterações nos histogramas que evidenciam possíveis alterações morfológicas. A continuação do estudo do hemograma é feita, geralmente, através da observação de esfregaço de sangue periférico e, por interacção com resultados obtidos de outras secções (ex. Bioquímica).

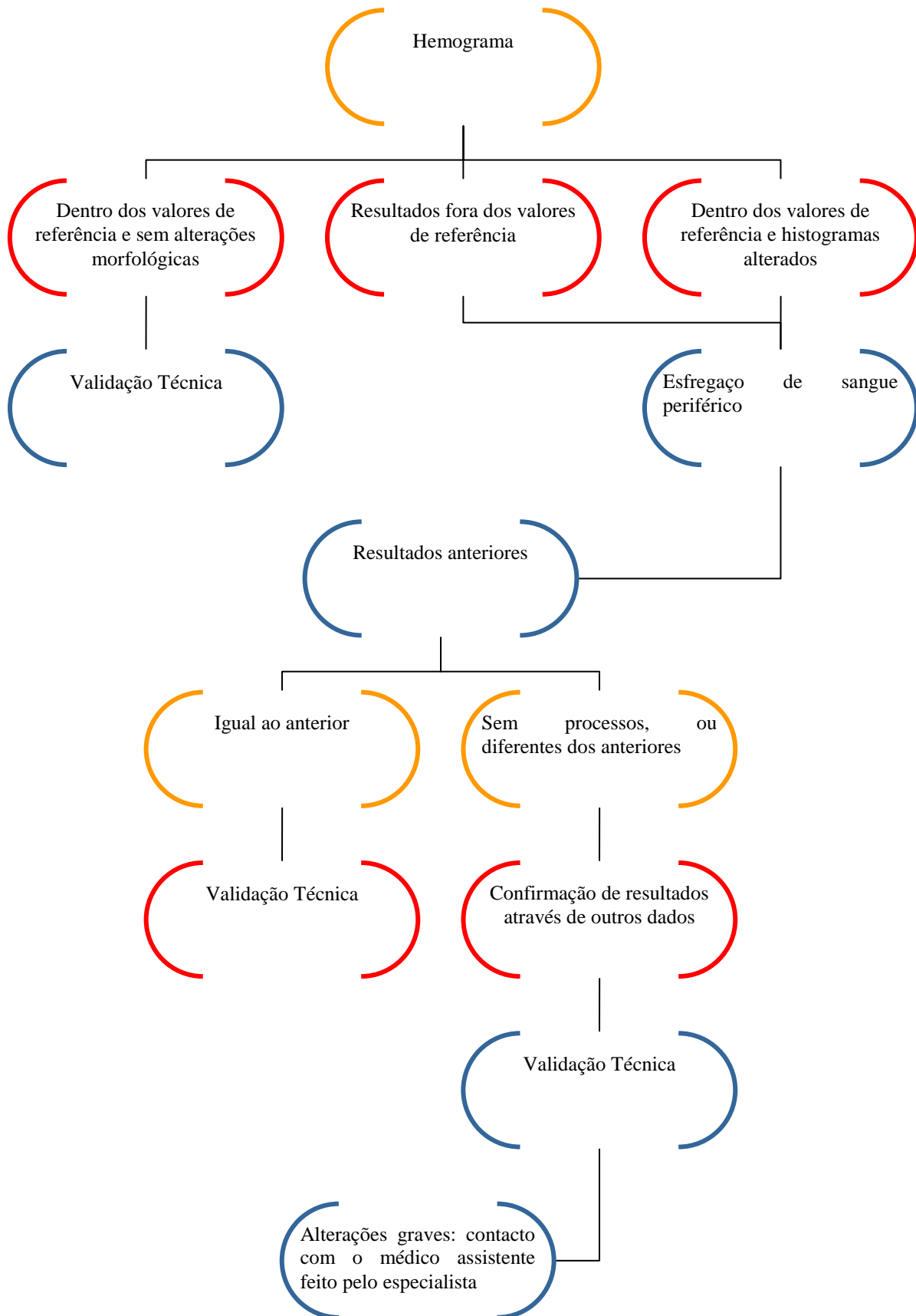


**Figura 8** – Histograma obtido



**Figura 9** – Diagrama esquemático do histograma da figura 8

### B3. Algoritmo de interpretação de resultados



## **C. Citologia**

### **C1. Coloração de May-Grunwald-Giemsa**

#### ***i*      Introdução**

Esta coloração é utilizada para corar os esfregaços de sangue periférico. As lâminas são coradas para observação em 3 situações:

- a pedido do clínico
- confirmação de resultados do hemograma
- pesquisa de hematozoários (para uma contagem de parasitemia e definição da espécie do parasita)

#### ***ii*     Método**

Os esfregaços de sangue periférico podem ser preparados, no momento da colheita, a partir de sangue total sem anticoagulante ou a partir de sangue com anticoagulante (EDTAK3).

A coloração May-Grünwald-Giemsa é uma coloração o tipo Romanowsky. Os dois componentes principais são o Azur B (Trimetiltionina) e Eosina Y (Tetrabromofluoresceína).

O Azur B liga-se a moléculas aniónicas, enquanto a Eosina Y liga-se aos sítios catiónicos proteicos. Assim, os ácidos nucleicos e proteínas têm afinidade para o corante básico – Azur B-, enquanto que o grupo de moléculas da hemoglobina tem afinidade para os corante ácidos sendo corados pela Eosina. Relativamente às granulações leucocitárias temos: as neutrofílicas levemente coradas pelo Azur, as basofílicas coradas fortemente pelo Azur, e as eosinofílicas coradas pela Eosina.

### **C2. Colorações para pesquisa de hematozoários em gota espessa**

#### ***i*      Introdução**

A coloração de gota espessa para pesquisa de Hematozoários é feita com Reagente Giemsa. Assim sendo, podemos observar os eritrócitos num tom esbatido permitindo uma melhor diferenciação dos parasitas.

O resultado é dado como Positivo/Negativo, e no caso do resultado ser positivo teremos:

- identificação
- parasitemia (%) - vista num esfregaço de sangue periférico e feita no caso de se tratar de *Plasmodium falciparum*

## ***D. Velocidade de Sedimentação***

### ***i Introdução***

A velocidade de sedimentação é considerada um teste não específico. No entanto, é um importante indicador indirecto da resposta inflamatória aguda, aumentando na presença de infecções e processos inflamatórios crónicos e agudos.

No laboratório, usamos um método automatizado para medição da velocidade de sedimentação: **Alifax Test 1**.

### ***ii Alifax Test 1***



***Figura 10 – Alifax Test 1***

O Alifax Test 1 é um analisador automático fechado, que determina o valor de VS no tubo primário de EDTA tripotássico. Através de uma agulha de aspiração, o sangue é aspirado do tubo. Posteriormente passa para um capilar, o qual é centrifugado a 20g, a uma temperatura constante de 37°C. A leitura é feita usando fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950 nm. Os impulsos eléctricos captados usando um detector de fotodíodos, são directamente relacionados com a concentração de eritrócitos presentes no capilar. O número de impulsos medidos por metade do tempo é usado para delinear a curva de sedimentação para cada amostra. Estes valores são depois convertidos para valores comparados ao método de Westergreen.

## ***E. Estudo das Hemoglobinopatias e Talassémia***

### ***Electroforese de Hemoglobinas em meio alcalino***

#### ***i Introdução***

A electroforese em agarose em pH alcalino (8,4-8,6) é um método simples e pratico para a identificação de hemoglobinas normais e variantes. A identificação qualitativa e determinação quantitativa dos diferentes tipos de hemoglobina permitem a detecção de anomalias com maior relevância clínica.

#### ***ii Método***

Nesta técnica, a preparação da amostra é um dos factores que mais influencia a qualidade do padrão electroforético das hemoglobinas. A solução usada para a análise – o hemolisado - é uma solução aquosa contendo hemoglobina extraída de células previamente lisadas. Este método implica vários passos:

- Lavagem dos glóbulos vermelhos para retirar proteínas do soro que afectam a qualidade das bandas;
- Lise dos glóbulos vermelhos para extracção da hemoglobina contida nos glóbulos vermelhos;
- Preparação da amostra;
- Migração electroforética a pH alcalino com separação das hemoglobinas e anidrase carbónica.

#### ***iii Interpretação de resultados***

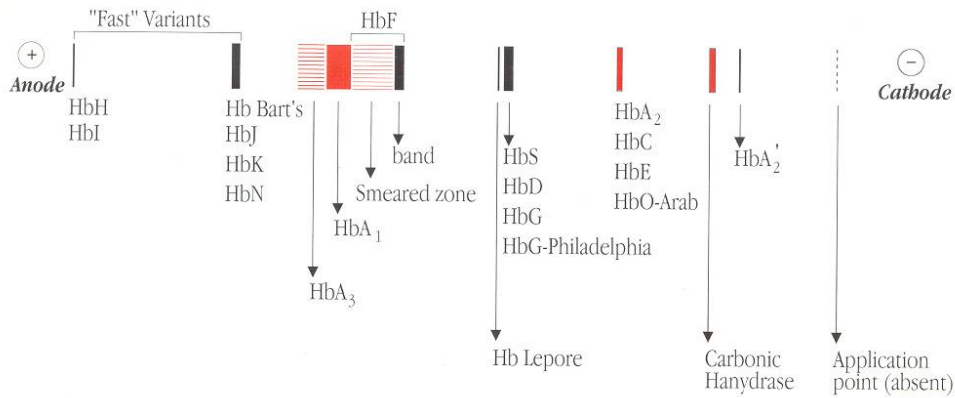
O padrão electroforético de um adulto normal inclui apenas os seguintes tipos de hemoglobinas normais: HbA<sub>1</sub>, HbF e HbA<sub>2</sub> cuja concentração se deve encontrar nos limites de normalidade:

|                  |          |
|------------------|----------|
| HbA <sub>1</sub> | 95-98%   |
| HbF              | 1.5-3.5% |
| HbA <sub>2</sub> | <2%      |

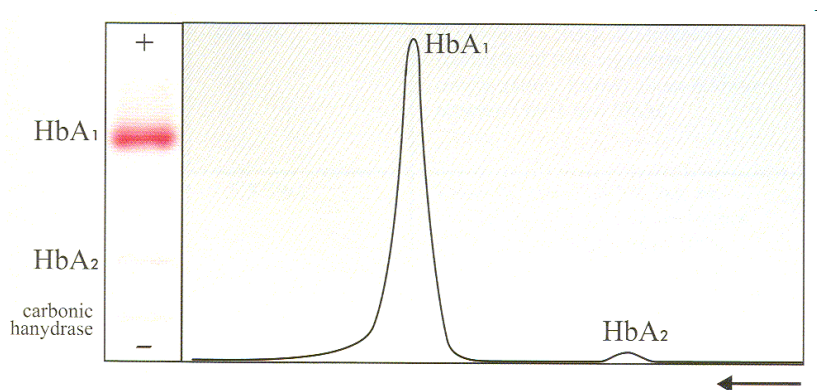
A detecção de bandas electroforéticas anormais indica a presença de hemoglobinas variantes na amostra.

A hemoglobina é uma proteína carregada negativamente em pH alcalino migrando na direcção do ânodo (+) quando sujeita a electroforese. As variantes estruturais, com carga superficial diferente, separar-se-ão migrando de forma diferente da HbA.

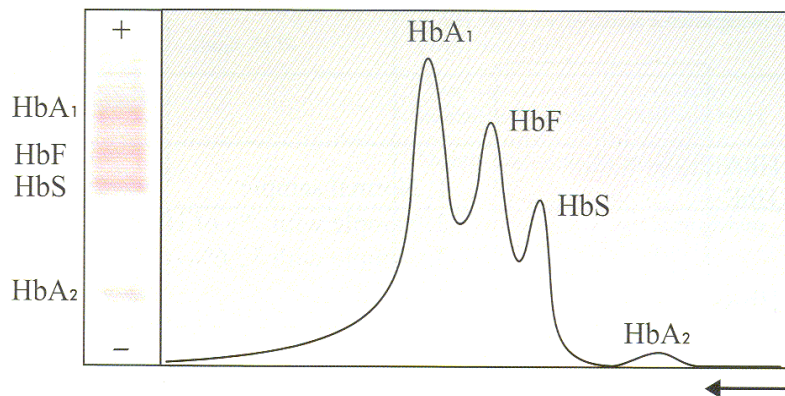
A partir deste método podemos obter uma separação satisfatória das hemoglobinas C, S, F, A e J. No entanto, temos de tomar em consideração o facto das hemoglobinas S, D e G migrarem em conjunto, assim como, as hemoglobinas A<sub>2</sub>, C, E e O<sup>Arab</sup>. A diferenciação entre elas deve ser feita usando electroforese ácida em gel de Agarose.



**Figura 11** – Mobilidade eletroforética relativa de Hemoglobinas normais e variantes em gel de agarose



**Figura 12** – Gráfico de uma Eletroforese de hemoglobinas normal



**Figura 13** – Gráfico de uma Eletroforese de hemoglobinas patológica com hemoglobinas F elevada e com presença de hemoglobina S.

## **Doseamento da Hemoglobina A<sub>2</sub>**

### ***i*      Introdução**

A quantificação de Hemoglobina A<sub>2</sub> é um meio diagnóstico de exclusão de Talassémia. Um aumento da HbA<sub>2</sub> num dado doente é um indicador característico de uma β-talassémia heterozigótica. A HbF conjuntamente com a HbA<sub>2</sub> permite classificar o tipo de talassémia.

### ***ii*     Método**

Para este doseamento podemos utilizar uma electroforese de hemoglobinas ou através de HPLC (ver capítulo referente à Hemoglobina Glicosilada).

### ***iii*    Interpretação de resultados**

Os resultados da Hemoglobina A<sub>2</sub> e Hemoglobina F devem de ser observados em conjunto, e juntamente com outros dados podem ser usados na classificação e diagnóstico de Talassémia e Hemoglobinopatias. Os doentes já diagnosticados com talassémia, usam este doseamento para controlo da doença.

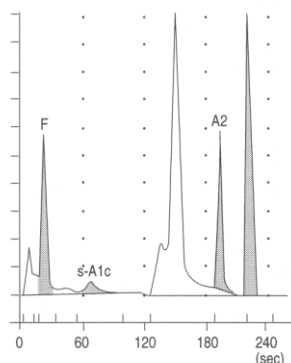
Quando observamos um resultado com uma percentagem superior a 3,8% de A<sub>2</sub>, podemos considerar que estamos perante uma β-Talassémia. Em doentes com MCV inferior a 76 fl ou MCH inferior ou igual a 26 pg, e com valores borderline de HbA<sub>2</sub> ou até mesmo baixos, deve ser verificada a existência de uma anemia ferropénica, a qual pode mascarar uma eventual talassémia.

```
***** HA-8160 VX.XX *****
2001-03-15 19:04      PORT No.0001
MEAS No. 0001
```

```
HbA1c 4.6 %    HbF 6.2 %
HbA1 8.9 %    HbA2 5.9 %
```

|               | Sec | Area  | %    |
|---------------|-----|-------|------|
| P1            | 10  | 1131  | 3.0  |
| P2            | 15  | 510   | 1.3  |
| P3 F          | 24  | 3541  | 6.2  |
| P4 L-A1c      | 44  | 596   | 1.6  |
| P5 s-A1c      | 69  | 1736  | 4.6  |
| P6 A0         | 150 | 34011 | 59.6 |
| P7 A2         | 194 | 3398  | 5.9  |
| P8 S/C Window | 223 | 12187 | 21.3 |
| Total         |     | 57110 |      |

```
Column No.01
GAIN1 "0.27"                      GAIN2 "0.30"
```



**Figura 14** - Exemplos de gráficos obtidos no aparelho Arkray HÁ-8160.

Gráfico de uma amostra patológica com elevação de hemoglobina F e A<sub>2</sub>, e com alarme de presença de possível hemoglobina S ou C (*S/C window*).

***Prova da falciformação***

***i      Introdução***

A prova de falciformação baseia-se na transformação de glóbulos vermelhos em drepanócitos na presença de um abaixamento da concentração de oxigénio no meio. O grau e a rapidez do aparecimento destas formas vai depender da concentração da hemoglobina S. Como redutor da tensão de Oxigénio temos o metabissulfito, o qual é usado para acelerar a reacção.

***ii      Interpretação de resultados***



***Figura 15*** – Fotografia de observação microscópica de um teste de falciformação positivo.

Todos os glóbulos vermelhos com hemoglobina S tornam-se falciformes, considerando o resultado Positivo. No entanto, não é possível distinguir os vários tipos de drepanocitose e suas variantes.

## **F. Hemoglobina Glicosilada**

### ***i*      Introdução**

O doseamento da Hemoglobina Glicosilada é incluído nesta parte do relatório, uma vez que o mesmo é realizado na secção de Hematologia e não na Bioquímica. Isto deve-se ao facto de a amostra ser a mesma das técnicas hematológicas (EDTA K3), e o aparelho de HPLC utilizado servir também para o doseamento da Hemoglobina A<sub>2</sub>.

Este doseamento é realizado como um parâmetro útil na monitorização a longo prazo de doentes diabéticos. Tal facto deve-se à não variação da HbA<sub>1c</sub> com a alteração do nível de glucose no sangue. De igual modo, devido ao mecanismo de formação, esta permite-nos obter uma retrospectiva a longo prazo dos níveis de glucose no sangue.

A formação de Hemoglobina Glicosilada é irreversível, e o nível no sangue depende do tempo de vida do eritrócito (média de 120 dias) e da concentração de glucose no sangue.

A hemoglobina glicosilada é formada por condensação da glucose com a porção N-terminal da valina de cada cadeia  $\beta$  da hemoglobina A, resultando numa base de Schiff instável. Posteriormente, sofre um rearranjo de Amadori formando a HbA<sub>1c</sub>.

### ***ii*      Método – HA8160**



Figura 17 – Sistema Arkray HÁ-8160

Para a realização deste doseamento é usada a Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Este tipo de cromatografia usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. A leitura das fracções obtidas é realizada a 415 nm e 500 nm. Assim, nestes comprimentos de onda podemos obter as seguintes fracções: HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1</sub>, HbF, HbA<sub>2</sub> (no modo talassémia) e hemoglobinas variantes. A quantificação da Hemoglobina glicosilada é feita em separado das seguintes, as quais são eluidas separadamente (HbA<sub>1c</sub> Lábil, Carbamilada e Acetilada). Este aparelho é capaz de diluir, hemolisar e remover a base de Schiff automaticamente. Esta remoção é realizada com tetrapolifosfato (pH 6,0) durante 2 minutos a 48°C. Após 4,2 min obtemos o cromatograma.

### ***iii*      Interpretação de resultados**

Na figura podemos observar a presença de 3 picos:

- F – HbF
- s-A1c – HbA<sub>1c</sub>
- A2 – HbA<sub>2</sub>

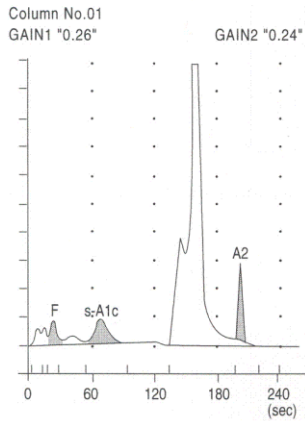
Caso tenhamos uma hemoglobina variante teremos a observação “S/C Window”. Caso necessário, esta indicação pode ser-nos útil e permite-nos avançar para uma electroforese de hemoglobinas.

*Relatório de Estágio  
Mestrado de Análises Clínicas*

\*\*\*\*\* HA-8160 VX.XX \*\*\*\*\*  
2001-03-15 18:42 PORT No.0001  
MEAS No. 0001

HbA1c 5.3 % HbF 1.0 %  
HbA1 7.0 % HbA2 2.9 %

|          | Sec | Area  | %    |
|----------|-----|-------|------|
| P1       | 9   | 311   | 0.9  |
| P2       | 16  | 260   | 0.8  |
| P3 F     | 24  | 337   | 1.0  |
| P4 L-A1c | 42  | 413   | 1.3  |
| P5 s-A1c | 68  | 1754  | 5.3  |
| P6 A0    | 156 | 30296 | 88.1 |
| P7 A2    | 199 | 1014  | 2.9  |
| Total    |     | 34385 |      |



**Figura 18** – Gráfico de um cromatograma de hemoglobina glicosilada.

## **G. Imuno-hematologia**

### **G1. Grupagem A,B,O**

#### ***i*      Introdução**

A Grupagem ABO é um dos parâmetros de maior importância dentro da imuno-hematologia., tendo implicações a nível de transfusões e de transplantação. Os antígenos ABO são expressos a nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade.

Existem 4 grupos sanguíneos: A, B, AB e O. Os epítomos antigénicos são determinados por carboidratos ligados a polipéptidos ou lípidos, formando respectivamente glicoproteínas ou glicolípidos. A cada antígeno corresponde uma iso-aglutinina (Anti-A ou Anti-B), a qual está ausente num soro de um sujeito com o respectivo antígeno sobre as hemácias.

Serologicamente, temos 2 subgrupos principais do Antígeno A: A1 e A2. A predominância é de A1 com cerca de 80% e os restantes pertencem ao grupo A2. Existem ainda outros subgrupos A, mas reflectem mutações no gene A.

#### ***ii*      Método**

Os reagentes usados para a grupagem sanguínea são anticorpos monoclonais IgM: Anti-A, Anti-B e Anti-AB. Os clones usados neste método são:

- Anti-A – clone Birma-I
- Anti-B – clone LB-2
- Anti-AB – clones Birma-I, ES4 e ES15

O método usado é a aglutinação directa com um reagente que indica a presença do antígeno correspondente.

Para a determinação do Grupo de Sangue começa-se com a grupagem em placa. Neste caso, coloca-se 2 gotas de sangue na placa, às quais se junta 1 gota de anti-A a uma delas e à outra uma gota de Anti-B. Mistura-se e observa-se a presença ou ausência de aglutinação. O resultado é positivo quando há aglutinação e negativo na sua ausência.

Quando o Anti-A e o Anti-B não geram aglutinação, usa-se o Anti-AB, o qual contém clones diferentes dos usados. Assim sendo, se a aglutinação continua ausente podemos classificar este soro como pertencente ao Grupo O.

Em caso de dúvida, como por exemplo uma aglutinação duvidosa ou discrepância de resultados entre os anti-soros, prossegue-se o estudo através da técnica em tubo.

#### ***iii*      Interpretação de resultados**

Considerando que:

- + - corresponde a aglutinação
- - corresponde a ausência de aglutinação

| <b>Grupo</b> | <b>Anti-A</b> | <b>Anti-B</b> | <b>Anti-AB</b> |
|--------------|---------------|---------------|----------------|
| A            | +             | -             | +              |
| B            | -             | +             | +              |
| AB           | +             | +             | +              |
| O            | -             | -             | -              |

## **G2. Grupagem Rh**

### ***i*      Introdução**

Este sistema é muito complexo e, por essa razão, classifica-se os indivíduos como Rh positivo e Rh negativo, dependendo da presença ou ausência de Antígeno D. Quando um indivíduo não possui antígenos do sistema Rh, o sistema imunitário facilmente estimulado produzindo anticorpos quando na presença glóbulos vermelhos de antígeno positivo. Estas situações podem ocorrer numa gravidez ou transfusão, podendo dar origem à Doença Hemolítica do Recém-nascido ou Reações hemolíticas graves.

Existem ainda indivíduos que têm uma expressão mais fraca do que o habitual do antígeno D, o que pode ser problemático a nível transfusional. A expressão D-fraco indica indivíduos com um número reduzido de antígeno D, enquanto D-parcial indica indivíduos com falta de epítomos D ou alterados.

### ***ii*     Método**

O reagente Anti-D tem os seguintes anticorpos:

- anticorpo IgM (clone TH28)
- anticorpo IgG (clone MS26)

A técnica usada é igual à Grupagem ABO, ou seja, aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo da Grupagem ABO, sendo que a aglutinação corresponde a Rh positivo e a sua ausência é Rh negativo.

A confirmação dos casos Rh negativo faz-se por Técnica em tubo, usando o reagente Anti-D anterior e um outro reagente com clones diferentes:

- anticorpo IgM (Bx61, P3x21223B10)
- anticorpo IgG (P3x290, P3x35)

Se ainda assim não existir aglutinação, adicionamos 1 gota de células do controlo de Coombs. Neste caso, teremos de obter uma aglutinação e classificamo-lo como D-fraco. Se o resultado for negativo, o teste é inválido.

### ***iii*     Interpretação de resultados**

Considerando que:

- + - corresponde a aglutinação
- - corresponde a ausência de aglutinação

|             | <b>Anti-D</b> |
|-------------|---------------|
| Rh Positivo | +             |
| Rh Negativo | -             |

### **G3. Coombs Directo e Indirecto**

#### ***i***      **Introdução**

O teste de Coombs é um dos principais testes serológicos imuno-hematológicos para detectar os anticorpos capazes de se unir ao seu antígeno homólogo eritrocitário sem desencadear a aglutinação das hemácias.

Os anticorpos “fixos” sobre as hemácias são detectados com ajuda de um soro com antiglobulinas humanas. Este reagirá com os anticorpos à superfície das hemácias sensibilizadas provocando a aglutinação entre elas.

O Coombs Directo tem como objectivo detectar os anticorpos incompletos fixos *in vivo* sobre as hemácias do sujeito. O Coombs Indirecto tem como objectivo a pesquisa no soro de anticorpos incompletos, incapazes de se ligarem sobre as hemácias susceptíveis de serem detectados pelo teste de Coombs Directo.

#### ***ii***      **Método**

O reagente Coombs usado tem os anticorpos dos seguintes clones celulares: 18833, 18896, 12011D10.

O reagente usado permite reconhecer anticorpos do tipo IgG e do tipo IgM. Os anticorpos do tipo IgM que cobrem as hemácias fixam o complemento *in vivo* (e *in vitro* se a reacção se processar em presença de complemento). Este reagente detecta a presença de fracções de complemento à superfície da hemácia, pois contêm anti-C3d.

A técnica baseia-se no princípio da hemaglutinação.

#### ***iii***      **Interpretação**

##### **Coombs Directo**

A pesquisa de anticorpos fixos sobre as hemácias *in vivo* pode indicar:

- Nas crianças – anemia hemolítica por imunização feto-maternal;
- Nos adultos – anemias hemolíticas adquiridas.

##### **Coombs Indirecto**

A positividade neste teste pode indicar:

- Imunização feto-maternal devido à presença de antígeno do sistema Rhesus ou outros sistemas;
- Imunização pós-transfusional (politransfusões).

## **H. Estudo da Hemostase**

O estudo da Hemostase é essencial para a detecção de patologias hemorrágicas e trombóticas. A hemostase compreende 3 níveis interrelacionados:

- Sistema vascular;
- Sistema de coagulação;
- Sistema fibrinolítico.

Os termos hemostase primária e secundária são vulgarmente usados, designando 2 fases da hemostase:

*Hemostase primária:* fase que envolve o sistema vascular, incluindo as células endoteliais e plaquetas;

*Hemostase secundária:* fase que envolve os factores de coagulação até à formação de fibrina estável, a qual é reforçada e coberta por agregados plaquetários.



**Figura 20** – Sistema Sysmex CA-560 usado em Labamaro para a Hemostase

### **H1. Sistema vascular (Hemostase primária)**

#### **Introdução**

Neste sistema temos 3 actores principais:

- Vasos sanguíneos
- Plaquetas
- Factor de von Willebrand

Explicando de maneira resumida, pode dizer-se que na presença de uma lesão vascular, as plaquetas interagem com endotélio lesado. Após esta interacção, as plaquetas aderem à sua superfície antes de secretar o seu conteúdo granular. A adesão plaquetária é facilitada pelo factor de von Willebrand plasmático ao ligar-se ao Glicogénio Ib da membrana plaquetária.

Após a adesão dá-se a agregação plaquetária onde intervêm o fibrinogénio e o complexo glicoproteico IIb/IIIa. Simultaneamente, amplificam a produção de trombina, expondo os seus fosfolípidos aniónicos membranares indispensáveis à activação da cascata de coagulação. Os primeiros traços de trombina transformam o fibrinogénio em fibrina, formando agregados plaquetários instáveis que se transformam a posteriori num trombo irreversível ou estável.

**a. Exploração da hemostase primária**

1. *Tempo de hemorragia (Método de Duke)*

**i Princípio**

Na generalidade, os testes de coagulação disponíveis são pouco úteis na exploração da hemostase primária. A única exceção é o Tempo de Hemorragia.

O tempo de hemorragia consiste no tempo que leva entre a perfuração, a nível cutâneo de uma brecha parietal dos pequenos vasos da derme, até ao estancar do sangramento provocado. Este método é o único realizado *in vivo* e que traduz globalmente o estado da hemostase primária. Ou seja, este método verifica a interação entre plaquetas e a parede vascular, via factor de von Willebrand e fibrinogénio.

**ii Método**

Apesar do método de referência ser o Método de Ivy, usamos o método de Duke.

Esta técnica é realizada através de uma incisão na orelha. A incisão deve ser feita horizontal, com 5mm no lobo da orelha, e com um estilete. Deve-se assegurar que a cabeça do paciente se encontra direita e que o mesmo não se movimenta no momento do corte. A gota de sangue é recolhida de 30 em 30 segundos em papel de filtro.

O Tempo de Hemorragia depende muito do técnico que a realiza e tem uma sensibilidade relativa. Deve-se ter em consideração o anti-séptico usado, uma vez que os alcoólicos provocam vasodilatação e alteram os resultados.

**iii Interpretação de resultados**

Os valores normais variam entre os 2 a 4 minutos.

O prolongamento do Tempo de Hemorragia pode ser devido a:

- 1- Trombocitopénia: o tempo pode manter-se normal quando o valor das plaquetas é baixo, mas superior a  $100.000 \text{ mm}^{-3}$ . No entanto, abaixo deste valor há uma correlação entre o aumento do tempo de hemorragia e a diminuição do número de plaquetas.
- 2- Alteração da função plaquetária: pode ser devido a um factor hereditário o adquirido
- 3- Factor de von Willebrand: por ausência ou alteração funcional do mesmo
- 4- Patologias vasculares
- 5- Ocasionalmente, deficiência em factor Vou XII e afibrinogénemia
- 6- Outros factores que advenham de uma má execução.

2. *Plaquetas*

**i Introdução e Interpretação de resultados**

A contagem de plaquetas é um dos métodos usados para o estudo da hemostase primária. Quando temos contagens inferiores a  $100.000 \text{ mm}^{-3}$  considera-se uma Trombocitopénia Moderada e quando  $<50.000 \text{ mm}^{-3}$  a Trombocitopénia é grave.

Resumidamente poderemos considerar algumas das principais etiologias das trombocitopénias:

- produção insuficiente
- destruição aumentada
- distribuição alterada
- por diluição

Em relação às etiologias resultantes em trombocitose temos:

- esplenectomia
- patologia esplénica ou trombose da veia esplénica
- trombocitose reactiva e transitória
- trombocitémia essencial

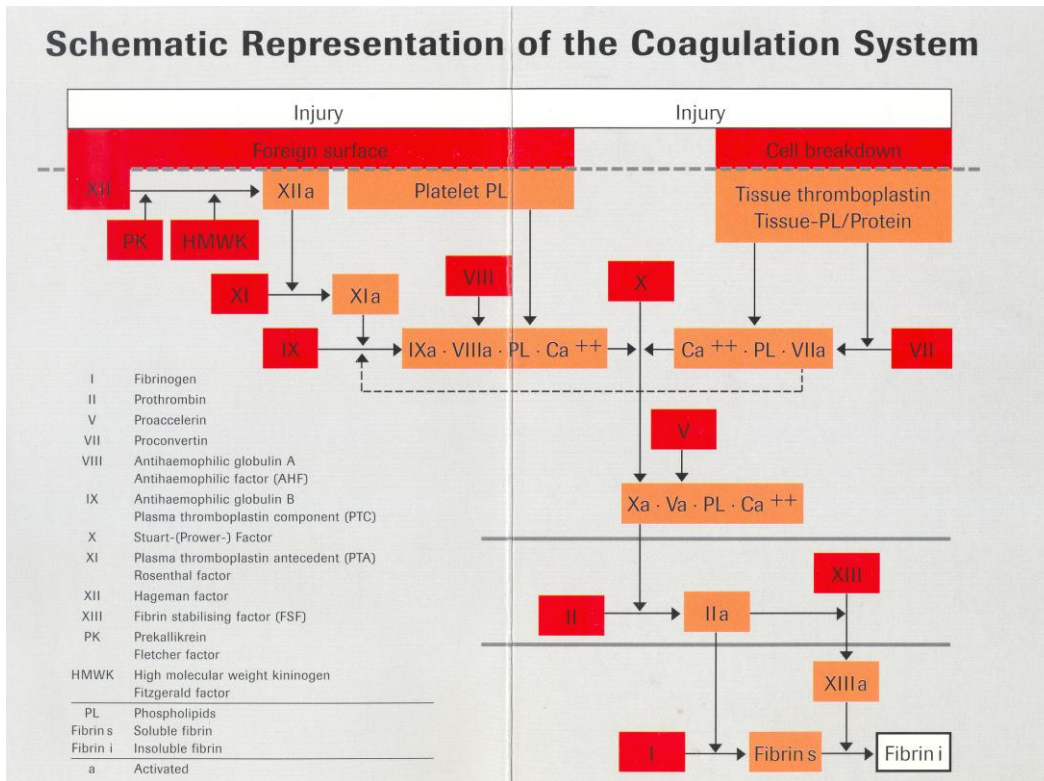
A confirmação de resultados é feita por Esfregaço de Sangue Periférico que nos permite verificar a existência de agregados plaquetários, anisocitose plaquetária, fragmentos de megacariócitos, agranulação plaquetária e outras alterações morfológicas.

Devemos também estar atentos à existência de aglutininas dependentes de EDTA, ou as aglutininas frias que provocam pseudo-trombocitopénias. Esses doentes devem estar registados no laboratório de maneira a realizar contagens imediatamente a seguir à colheita.

## *ii*      **Método**

Descrito no capítulo I deste relatório.

## H2. Sistema de Coagulação



**Figura 22** – Esquema representativo do sistema de coagulação.

A coagulação envolve as plaquetas e os factores de coagulação, os quais após a lesão são activados sequencialmente dando origem àquilo que chamamos a “cascata da coagulação”. A função principal é a selagem das zonas vasculares lesadas, com a formação de um rolhão plaquetário reforçado com fibrina e, finalmente, a retracção do coágulo. Os inibidores da coagulação, por sua vez, constituem um sistema de controlo ligando-se ao excesso de factores prevenindo a formação de trombos.

Os testes *in vitro* permitem distinguir 2 vias da cascata: via intrínseca e via extrínseca. Actualmente considera-se que *in vivo* ambas as vias são activadas e, portanto a cascata deve ser considerada como um todo.

### a. Estudo da activação da coagulação

#### 1. Tempo de Protrombina

Amostra: Plasma Citratado

Sistema: Dade Behring / Sysmex CA-560

#### i Introdução

O tempo de Protrombina é a medida do tempo de recalcificação do plasma citratado em presença de um extracto tecidular.

A medição do Tempo de Protrombina serve como um teste de triagem rápido e sensível para detectar transtornos de coagulação na via extrínseca. Assim sendo, com este método é possível avaliar a funcionalmente e como um todo os factores II, V, VII, X e fibrinogénio.

O TP é adequado para:

- regulação e controlo da terapia anticoagulante oral;
- diagnóstico de deficiências congénitas e adquiridas de factores de coagulação;
- controlo da actividade de síntese hepática no fígado.

## *ii      Método*

No Tempo de Protrombina, o processo de coagulação é desencadeado mediante a incubação do plasma com quantidades óptimas de tromboplastina e cálcio. Posteriormente, faz-se a medição do tempo, em segundos, até à formação do coágulo de fibrina.

O resultado é dado em Tempo (segundos), taxa de protrombina (%) e INR (Razão Normalizada Internacional). Obtemos a taxa através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Protrombina (\%)} = \frac{\text{tempo de reacção da amostra (s)}}{\text{tempo de reacção do plasma normal (s)}} \times 100$$

O tempo de reacção do plasma normal é obtido através da média aritmética do resultado de 20 plasmas normais.

Para obtenção do valor de INR temos:

$$\text{INR} = \left( \frac{\text{tempo de reacção da amostra (s)}}{\text{tempo de reacção do plasma normal (s)}} \right)^{\text{ISI}}$$

O ISI é o índice de sensibilidade internacional e é dado pelo fabricante, podendo diferir de lote para lote.

## *iii      Interpretação de resultados*

Para um paciente normal deveremos ter:

- tempo entre os 9,8s a 12,7s
- uma taxa de 100%
- INR de 1,0

No entanto, para um paciente com controlo da terapia de anticoagulante temos:

| <b>Patologia</b>  | <b>INR</b>               | <b>%</b>             |
|---|--------------------------|----------------------|
| Trombose venosa profunda<br>Embolia pulmonar<br>Doenças arteriais (incluindo<br>enfarte de miocárdio) | 2,0-3,0                  | 36-23                |
| Válvulas cardíacas artificiais<br>Embolias sistémicas<br>recidivantes                                 | 3,0-4,5<br>ou<br>2,5-3,5 | 23-15<br>ou<br>28-19 |

Em termos gerais, e excluindo a terapia de anticoagulantes, o alongamento poderá ter como algumas causas:

- Anomalia congénita: (raro)
- Deficiência em factores: VII, V, X, II ou fibrinogénio
- Desfibrinogénemia congénita
- Anomalia adquirida: (frequente)
- Hepatopatia

- Avitaminose K
- Diminuição grave de fibrinogénio. Exemplo: por diminuição da síntese hepática, coagulação intravascular disseminada, destruição por plasmina
- Desfibrinogénemia adquirida. Ex.: Cirrose

O estudo destas causas poderá ser mais aprofundado, a nível da coagulação, através do doseamento de factores.

## 2. *Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT)*

Amostra: Plasma Citratado

Sistema: Dade Behring / Sysmex CA-560

### *i* **Introdução**

O aPTT explora a via intrínseca da coagulação. Este método consiste no tempo de coagulação de um plasma sem plaquetas recalcificado em presença de fosfolípidos e de uma activador do sistema contacto da coagulação.

A determinação do aPTT é sensível a deficiências em pré-caliceína, quinogénio de alto peso molecular, factores VIII, IX, XI, XII, e também, deficiências em factores II, V, X e fibrinogénio. Para além desta função pode igualmente ser usado como monitorização da terapia com heparina, sendo o aumento do resultado proporcional ao nível de heparina.

### *ii* **Método**

Esta determinação é realizada incubando o plasma com uma quantidade otimizada de fosfolípidos de feijão de soja com um activador superficial (ácido elágico), o qual provoca a activação dos factores do sistema de coagulação intrínseco. O processo de coagulação é desencadeado com a adição de iões cálcio até à formação de fibrina.

O resultado expressa o tempo que demora desde o início do processo até à formação de fibrina.

### *iii* **Interpretação de resultados**

Como já se disse anteriormente, a terapia com heparina faz alongar os resultados e o aPTT é uma forma de monitorizar o doente. No entanto, existem patologias associadas ao aumento do aPTT:

- Com um Tempo de Protrombina normal:
  - Deficits congénitos:
    - Factor VIII: Hemofilia A, Doença de von Willebrand
    - Factor IX: Hemofilia B
    - Factor XI: Doença de Rosenthal
    - Factor XII, Pré-caliceína e Quinogénio de Alto Peso Molecular
    - Alguns anticoagulantes circulantes
- Associado a um Tempo de Protrombina Alongado:
  - Deficits congénitos em factores X, V, II e fibrinogénio
  - Hepatopatia
  - Coagulação Intravascular Disseminada
  - Anticoagulantes Circulantes

3. *Determinação de Fibrinogénio*

Amostra: Plasma citratado

Sistema: Sysmex CA-560

*i* **Introdução**

O fibrinogénio é o precursor da fibrina, a qual é formada por clivagem deste precursor pela Trombina. Estes monómeros de fibrina reúnem-se formando a complexa teia de fibrina do coágulo.

*ii* **Método**

O método usado é o de Clauss, no qual o plasma citratado é coagulado com uma quantidade em excesso de trombina. O tempo de coagulação depende da quantidade de fibrinogénio na amostra, sendo inversamente proporcional.

*iii* **Interpretação de resultados**

Podemos encontrar níveis baixos de fibrinogénio nos casos de Hipofibrinogénemia ou Afibrinogénemia adquiridas ou congénitas. As primeiras podem ser devidas a: coagulação intravascular disseminada, hepatopatias, perda de volume vascular, ou aumento de catabolismo (com choque ou carcinoma)

Quanto aos níveis mais altos, podem ocorrer temporariamente, uma vez que o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, ou com o reflexo de hipercoagulabilidade.

## **Bioquímica**

### **A. Introdução**

A estas duas secções do laboratório chegam vários tipos de amostras para proceder à respectiva análise. Dentro destas temos o tubo de gel de soro, urinas e fezes. Na triagem de produtos, os tubos de gel destinados às provas de bioquímica são centrifugados a 3500 rpm durante 15' e posteriormente distribuídos pelos vários sistemas automáticos. As urinas, fezes e outros produtos são encaminhadas para a secção de urinanálise. Cada doente tem apenas um tubo de gel destinado para a bioquímica, o qual é utilizado para todos os sistemas desta secção. Este é distribuído, em primeiro lugar para o sistema Olympus e depois segue para as electroforeses. A urinas que exigem medição do volume de 24h, são enviadas posteriormente à respectiva medição para execução analítica no sistema Olympus.

As secções de Bioquímica e Urinanálise de Labamaro são constituídas pelos seguintes elementos: uma Técnica Superior de Análises e três Técnica de Análises Clínicas. As três técnicas estão distribuídas pelos 3 sectores: 1 na Bioquímica automática e triagem, 1 nas electroforeses e 1 na urinanálise.

As Técnicas de Análises Clínicas (TAC) têm como responsabilidade a recepção dos seus tubos vindas da triagem, proceder à organização dos mesmos, encaminhá-los para os sistemas automáticos, a manutenção dos seus aparelhos, a execução do controlo de qualidade interno, avaliação externa da qualidade, execução analítica das amostras, após fazer sair as listas de trabalho e verificar os produtos em falta. A TAC do sector da Bioquímica automática trabalha com o aparelho Olympus AU400, a TAC das electroforeses com o Microtec 648PC, e a TAC da urinanálise com o Urisys 2400.

A Técnica Superior de Análises tem como função a organização, coordenação da secção, tomar nota das ocorrências durante o trabalho e auxiliar as técnicas quando necessário. No início do trabalho procede à avaliação dos resultados do controle de qualidade e, caso haja algum problema de carácter técnico tem como responsabilidade o contacto com os representantes do sistema em causa para resolução do mesmo. Após a saída das listas de trabalho finais e a execução analítica, cabe à Técnica Superior a validação técnica dos vários resultados obtidos. A observação ao microscópio de sedimentos urinários e lâminas providas de outras análises também é executada exclusivamente pela técnica superior.

Aos especialistas em Análises Clínicas cabe a validação biopatológica de processos e contacto com os clínicos prescritores e doentes quando aplicável. O controlo de qualidade externo, depois da obtenção dos resultados na secção, é avaliado pelo Director Técnico.

***Sistema Olympus AU400***



***Figura 23 – Sistema Olympus AU400***

O sistema Olympus AU400 é o aparelho utilizado para a realização da maioria das provas da secção de bioquímica. Este aparelho utiliza a tecnologia de espectrofotometria UV e visível, turbidimetria e potenciometria.

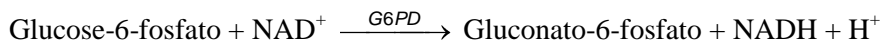
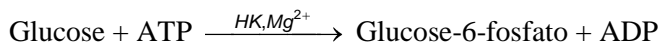
As amostras são processadas a partir das racks introduzidas e são classificadas através das mesmas. Assim, o aparelho distingue entre amostras de doentes (soro e urina), controlos, calibradores e amostras para fazer os brancos dos reagentes. Os tubos têm na sua numeração extensões que permite distinguir vários tipos de amostra para o mesmo doente. Por exemplo: Glucose ao tempo zero – B0, Glucose aos 60 min – B60, Glicosúria ao 60 min – U60.

## A. Carbohidratos

### A1. Glucose

#### 1. Método

Reacções:



O aumento na absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de glucose na amostra.

O doseamento de glucose é feito num conjunto específico de provas

- 1) Doseamento de glucose em jejum;
- 2) Glucose em jejum e pós-prandial:
  - i) Doseamento da glucose ao tempo 0';
  - ii) Doseamento 1 ou 2 horas após a toma de um pequeno-almoço açucarado:
    - (1) 1 Hora – para testar a elevação da glucose no indivíduo
    - (2) 2 Horas – para verificar se o valor de glucose se encontra estabilizado
- 3) Prova de Tolerância Oral à Glucose. Nesta prova o doente toma 75g de glucose após uma recolha de sangue ao tempo 0'. Posteriormente é feita uma colheita às 2 horas.
- 4) Curva de Glicémia. Nesta prova o doente toma habitualmente 100g de glucose após uma recolha de sangue ao tempo 0'. Posteriormente são feitas 4 colheitas: 30', 60', 120' e 180'.

#### 2. Interpretação de resultados

A Glucose é, juntamente com os ácidos gordos e os corpos cetónicos, os mais importantes fornecedores de energia do organismo. A sua concentração é mantida através de um controle preciso de processos fornecedores e utilizadores de glucose.

Alterações no metabolismo da glucose correspondem, na maioria das vezes, a uma hiperglicémia, e com menor frequência, hipoglicémia.

A alteração dos valores da glicemia está associado a algumas patologias:

- Valores baixos (<74 mg/dl)
  - Hipoglicémia
- Valores elevados (> 106 mg/dl)
  - Tolerância diminuída à glucose
  - Diabetes Mellitus 1 e 2
  - Diabetes Gestacional

(a) *Tolerância diminuída à Glucose*

Estes indivíduos têm uma glicémia em jejum superior ou igual a 106 mg/dl e valores inferiores a 126 mg/dl, limite a partir do qual podemos por a hipótese de Diabetes. Quando é realizada uma PTGO, estes doentes podem revelar uma descida de valores mais lenta que o habitual sem nunca chegar aos valores característicos da Diabetes. Estes sujeitos são considerados um grupo de risco para a Diabetes e doenças vasculares.

(b) *Diabetes Mellitus*

Temos 3 critérios de diagnóstico da Diabetes e devem ser confirmados em dias alternados:

1 – Sintomas de Diabetes (poliúria, polidipsia e perda de peso) e concentrações de glucose no soro superior ou igual a 200mg/dl (a qualquer hora do dia).

*Ou*

2 – Glucose em jejum superior ou igual a 126 mg/dl.

*Ou*

3 – Glucose no soro após 2 horas superior ou igual a 200 mg/dl na PTGO.

A Diabetes pode ser classificada em:

(i) *Diabetes Mellitus tipo 1*

Tem como origem a destruição das células dos ilhéus de Langerhans, levando a uma insuficiência em insulina. Tem uma elevada incidência em crianças e adolescentes.

- *Auto-imune*: causada pela perda de células  $\beta$  dos ilhéus. Estes diabéticos são dependentes da insulina para evitar a cetoacidose.
- *Idiopática*: quando não há evidência de processos auto-ímunes.

(ii) *Diabetes Mellitus tipo 2*

Agrupar 90% dos casos de diabetes. Estes doentes têm sintomatologia ligeira e raramente sofrem de cetoacidose. A concentração de insulina pode ser normal, baixa ou aumentada, podendo estar associada a causas variadas como as deficiências de secreção ou a insulino-resistência.

(iii) *Outros tipos específicos*

Podemos ter dentro desta categoria:

- Defeitos genéticos das células  $\beta$ ;
- Defeitos genéticos na ação da insulina;
- Doenças do pâncreas exócrino;
- Endocrinopatias;
- Induzida por medicamentos;
- Infecções;
- Formas incomuns de Diabetes imunologicamente mediadas;
- Outros Síndromes genéticas.

(iv) *Diabetes Gestacional*

Trata-se de uma intolerância a carboidratos com gravidade variável. Só estão incluídas neste grupo grávidas sem evidência de doenças antes da gravidez e cujas provas de glicémia se alteraram posteriormente. A doença regride após o parto. No entanto, estas grávidas têm uma elevada probabilidade de adquirir a doença mais tarde ao longo da vida.

(c) *Hipoglicémia*

Consideramos uma hipoglicémia quando a glucose no sangue está abaixo do limite do valor de referência. Em jejum pode estar relacionada com uma patologia (exemplo: Disfunção hepática, Deficiência hormonal; Insuficiência Renal Crónica, Septicemia e muitas outras). No entanto, na pós-prandial, a hipoglicémia é normal num adulto.

## **B. Lípidos**

Este grupo é muito vasto, pelo que no laboratório trabalha-se com um número restrito de lípidos. Na secção de Bioquímica doseamos os seguintes lípidos:

- Colesterol
- Colesterol HDL
- Triglicéridos

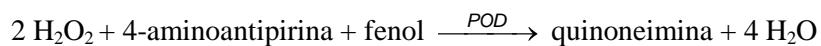
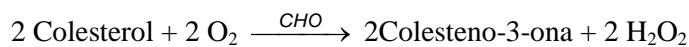
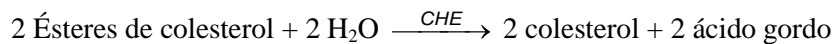
### **B1. Colesterol**

#### *1. Introdução*

O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um componente essencial das membranas celulares e lipoproteínas. É igualmente, um precursor para a síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares e de vitamina D.

#### *2. Método*

O reagente utiliza um método enzimático para medir o Colesterol no soro e plasma humanos. O corante vermelho de quinoneimina pode ser medido espectrofotometricamente a 540/600 nm como um aumento na absorvância.



#### *3. Interpretação de Resultados*

Os valores de referência estabelecidos são os seguintes:

- *normal* - <200 mg/dl
- *risco moderado* - 200-239 mg/dl
- *risco elevado* - >240 mg/dl

A avaliação destes valores para diagnóstico deve ser feita em conjunto com os doseamentos de lipoproteínas (HDL e LDL).

## B2. Colesterol HDL e LDL

Os lípidos sintetizados no fígado e intestino têm de ser transportados para os vários tecidos para desempenharem as suas funções biológicas. Devido à sua insolubilidade, estes são transportados no plasma em complexos macromoleculares – as *lipoproteínas*. Estas são partículas esféricas com lípidos não-polares (triglicéridos e ésteres do colesterol) no seu interior e lípidos polares (fosfolípidos e colesterol livre) orientados para a superfície. Também contêm uma ou mais proteínas específicas à superfície, designadas por apolipoproteínas.

Existem 6 categorias de lipoproteínas:

1. Quilomicrons
2. VLDL – Very Low Density Lipoproteins – Lipoproteínas de densidade muito baixa
3. IDL – Intermediate Density Lipoproteins – Lipoproteínas de densidade intermédia
4. LDL - Low Density Lipoproteins – Lipoproteínas de densidade baixa
5. HDL – High Density Lipoproteins – Lipoproteínas de alta densidade
6. Lp(a) – Lipoproteína a

Em jejum, a maior parte dos triglicéridos plasmáticos estão presentes no VLDL. As LDL carregam cerca de 70% do colesterol plasmático para os tecidos e as HDL cerca de 20-30% do colesterol plasmático para o fígado.

### ***Colesterol HDL***

Ensaio de cor enzimático para determinação quantitativa do colesterol HDL no soro e plasma humanos.

#### *1. Método*

O colesterol HDL é quantificado através da presença de um sistema cromogénio enzimático.

LDL, VLDL e quilomicrons  $\xrightarrow{\text{anti-lipoproteína-}\beta\text{-humana}}$  Complexos antigénio-anticorpo

Colesterol HDL + H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{CHEeCHO}}$  Colest-4-en-3-ona + Ác. Gordos + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipirina + F-DAOS  $\xrightarrow{\text{POD}}$  (Corante azul)<sup>+</sup> + F<sup>-</sup> + 2 H<sub>2</sub>O

[F-DAOS = N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina]

#### *2. Interpretação de Resultados*

Tomando em consideração os valores de referência temos:

- <40 mg/dl – HDL baixo – factor de risco aterogénico
- ≥60 mg/dl – HDL elevado – factor de risco “negativo”

### ***Colesterol LDL***

#### ***3. Método***

Esta determinação é feita através da fórmula de Friedwald:

$$LDL = \text{Colesterol total} - HDL - \left( \frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right)$$

Corresponde à fração VLDL

Ao utilizar esta fórmula devemos de ter cuidado, uma vez que o valor de triglicéridos não deve de ultrapassar os 400 mg/dl, tornando-se o resultado inválido por este método. O colesterol VLDL corresponde a um quinto da concentração de triglicéridos.

#### ***4. Interpretação de resultados***

Tomando em consideração os valores de referência temos, os seguintes patamares de risco aterogénico:

- Baixo - <100 mg/dl
- Ligeiro – 100-129 mg/dl
- Moderado – 130-159 mg/dl
- Elevado - ≥160 mg/dl

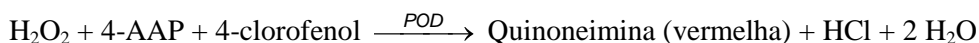
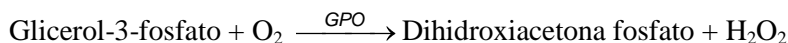
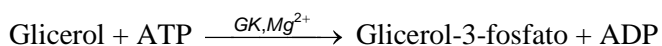
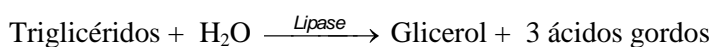
## **B3. Triglicéridos**

### *1. Introdução*

Na alimentação humana, os triglicéridos são os ésteres de glicerol com maior prevalência e constituindo 95% de reservas tecidulares lípidicas. Após a absorção no intestino, os triglicéridos são ressintetizados nas células epiteliais intestinais e combinados com colesterol e apolipoproteína B formam quilomicrons.

### *2. Método*

Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa de triglicéridos no soro e plasma. O aumento da absorvância 520/600 nm é proporcional ao teor de triglicéridos da amostra.



### *3. Interpretação de resultados*

De acordo com os valores de referência temos os seguintes valores de risco aterogénico:

- Baixo - <150mg/dl
- Moderado – 150-199 mg/dl
- Elevado – 200-499 mg/dl
- Muito elevado - >500 mg/dl

## **C. Electrólitos**

### **C1. Sódio, Potássio, Cloretos e Magnésio**

#### *1. Introdução*

Não há quase processos metabólicos que não dependam ou não sejam afectados por electrólitos. Dentro dos electrólitos principais temos:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . A maioria circula sob a forma livre, enquanto alguns como o  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e traços de alguns elementos circulam ligados a proteínas, como a albumina.

#### *2. Método*

##### *i Sódio, Potássio e Cloretos*

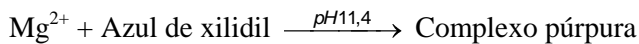
O módulo ISE para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  integra eléctrodos específicos para cada ião de interesse na amostra:

- de membrana éter-coroa para sódio e potássio;
- uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o cloreto.

É desenvolvido um potencial eléctrico de acordo com a Equação de Nernst para um ião específico. Quando comparado com uma referência interna, este potencial eléctrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões da amostra.

##### *ii Magnésio*

O reagente utiliza um método directo no qual os iões de magnésio formam um complexo colorido com azul de xilidil numa solução fortemente básica. A cor produzida é medida bicromaticamente a 520/800 nm e é proporcional à concentração de magnésio na amostra.



#### *3. Interpretação de resultados*

##### *i Ião Sódio*

*Valores de referência:*

Soro – 136-146 mmol/l

Urina – 40-220 mmol/dia

(a) *Sódio Sérico*

Fora destes valores de normalidade podemos ter 2 situações clínicas: *hiponatremia e hipernatremia*.

A *hiponatremia* pode ter duas origens: retenção hídrica ou depleção de sódio. A esta patologia podemos ter as seguintes condições:

- A. Depleção de sódio e água (por défice)
  - Perda de secreções GI com reposição de líquido, mas não de electrólitos
  - Perda da pele com reposição de líquidos, mas não de electrólitos
  - Perda metabólica
  - Perda endócrina
  - Perda iatrogénica de cavidades serosas
- B. Água excessiva (dilucional)
  - Administração excessiva de água
  - Insuficiência cardíaca congénita
  - Cirrose
  - Síndrome Nefrótico
  - Hipoalbuminémia
  - Insuficiência renal água com oligúria
- C. SIADH – Síndrome de secreção inapropriada de hormona antidiurética
- D. Perda Intracelular
- E. Falsa Hiponatremia
  - Triglicéridos altos
  - Proteinémia alta
  - Glicémia alta – grave

A *hipernatremia* tem como principal causa a desidratação, a qual pode ter como causa:

1. Ingestão insuficiente de água
2. Débito renal excessivo de água (ex.: Diabetes insípida)
3. Débito excessivo de água pela pele
4. Débito excessivo do trato GI
5. Sobredosagem de sódio
6. Alimentação com alto teor de sódio.

(b) *Sódio Urinário*

A sua determinação é feita para explorar as causas de hiponatremia: normalmente o rim tenta conservar o sódio, de modo que a sua excreção é baixa (<20 mmol/l, geralmente <10 mmol/l na primeira urina da manhã). Caso o doente tenha hiponatremia e a concentração de sódio esteja elevado na urina, então estamos perante uma perda inadequada pelo rim:

1. Insuficiência Renal Crónica ou aguda
2. Diuréticos
3. Doença de Addison
4. Síndrome de SIADH
5. Síndrome de reajuste osmótico

Por isso, quando temos um sódio urinário baixo, a hiponatremia deve-se a causas extra-renais.

**ii      Potássio**

*Valores de referência:*

Soro – 3.5-5.1 mmol/l

Urina – 25-125 mmol/dia

O ião potássio é o catião mais abundante logo a seguir ao sódio, pelo que a sua determinação é muito importante nalguns tipos de patologias. A alteração da homeostase do potássio traz sérias consequências a vários níveis, como por exemplo, a nível cardíaco.

A *hipocalémia* (valores <3.5 mmol/l) pode ser causada por uma diminuição no aporte de potássio ou a perda de fluidos corporais ricos em potássio. Podemos ter:

I.      Redistribuição de potássio devido a:

1. Resposta à insulina
2. Alcalose
3. Catecolaminas
4. Pseudohipocalémia devido a leucocitose
5. Hipotermia

II.     Défice real em potássio, o qual deve ser estudado em conjunto com os valores de potássio urinário:

1. Se  $K^+$  urinário <25 mmol/dia
  - Perda extra-renal: diarreia, fístula, sudorese excessiva
  - Aporte insuficiente de potássio na dieta
2. Se  $K^+$  urinário >25 mmol/dia
  - Acidose metabólica (Acidose tubular tipo I e II)
  - Necrose tubular aguda
  - Toxicidade medicamentosa por Anfotericina B
  - Hipomagnesiémia
  - Alcalose metabólica, a qual deve ser avaliada em conjunto com os valores de cloretos urinários:
    - ✓  $Cl^-$  >10 mmol/dia – excesso de mineralocorticóides; glucocorticóides em excesso (ex.: Cushing)
    - ✓  $Cl^-$  <10 mmol/dia – diuréticos, vómitos e penicilinas

A *hipercalémia* resulta de três factores isoladamente ou em combinação:

I.      Por redistribuição. A redistribuição pode ser devida a:

- Acidose metabólica
- Desidratação
- Hipoxia tecidual massiva
- Deficiência em insulina
- Rabdomiólise
- Iatrogénica:
  - a. Toxicidade digitálica
  - b. Bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos

II.     Por aumento do potássio na dieta

III.    Por aumento na retenção, a qual pode ser por:

1. Oligúria (TFG <ml/min) com aumento da concentração de potássio:
  - Suplementos de  $K^+$
  - Transfusão sanguínea
  - Hemólise
  - Necrose tecidual
  - Doses elevadas de penicilina
2. Diminuição da excreção sanguínea de  $K^+$  por:
  - Deficiência em mineralocorticóides

- Deficiência primária dos túbulos renais
- Diuréticos poupadores de potássio

O doseamento de potássio é altamente afectado pela hemólise. Amostras levemente hemolisadas conduzem geralmente a grandes alterações nos valores séricos de potássio.

### *iii*     **Cloretos**

*Valores de referência:*

Soro – 98-106 mmol/l

Urina – 110-250 mmol/dia

#### *(a)*     *Cloretos séricos*

O cloreto é o anião extracelular mais abundante. Geralmente, os valores do ião cloreto acompanham o ião sódio. A determinação dos cloretos é, assim, importante como diagnóstico diferencial de desequilíbrios electrolíticos.

Geralmente estamos perante uma *hipoclorémia* quando temos:

- Acidose metabólica (falha renal e cetoacidose diabética)
- Vômitos e secreção gástrica persistente (alcalose metabólica)
- Diuréticos
- SIADH

Em situações de *hiperclorémia* podemos estar perante:

- Desidratação
- Acidose tubular renal
- Insuficiência renal aguda
- Acidose metabólica (diarreia prolongada e perda de bicarbonato)
- Hiperfunção adrenocortical

#### *(b)*     *Cloretos urinários*

(ver Interpretação de resultados de Potássio)

### *iv*     **Magnésio**

*Valores de referência:*

|              |        |               |
|--------------|--------|---------------|
| <b>Soro</b>  | Homem  | 1.8-2.6 mg/dl |
|              | Mulher | 1.9-2.5 mg/dl |
| <b>Urina</b> |        | 73-122 mg/24h |

O magnésio é o quarto catião mais abundante no organismo e o segundo a nível intracelular. Este catião é co-factor de mais de 300 enzimas no organismo e é requerido como substrato enzimático.

A *hipomagnesiémia* deve-se na maioria das vezes a perdas no tracto GI e a nível renal. Resumidamente, a deficiência em magnésio pode ser devia a:

- Problemas gastrointestinais (diarreias, fístulas, síndromes de má-absorção)
- Perdas renais
- Diurese osmótica (Diabetes)
- Hipercalémia
- Álcool
- Acidose metabólica
- Doença renal
- Depleção em fosfato

A *hipermagnesiémia* tem como causa principal a administração de fármacos (ciclosporinas e diuréticos). Resumidamente podemos ter:

- Toma excessiva de medicamentos
- Falha renal
- Hipercalémia familiar
- Ingestão de lítio

## C2. Cálcio

### 1. Introdução

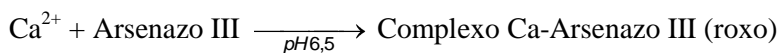
O cálcio existe em 3 estados fisiológicos no plasma:

- Ionizado
- Ligado a proteínas plasmáticas
- Complexado com pequenos iões

O cálcio livre é a fracção biologicamente activa, sendo a sua concentração regulada pela PTH e a 1,25-dihidroxitamina D.

### 2. Método

Neste método, a absorvância do complexo Ca-Arsenazo III é medida bicromaticamente a 660/700 nm. O aumento resultante da absorvância da mistura de reacção é directamente proporcional à concentração de cálcio na amostra.



### 3. Interpretação de resultados

*Valores de referência:*

8.8-10.6 mg/dl

As alterações no metabolismo do cálcio são separadas em hipocalcémia e hipercalcémia.

Entre as causas de *hipocalcémia* podemos ter:

- Hipoalbuminémia – causa mais frequente, uma vez que a 1g/dl de albumina liga-se aproximadamente 0.8 mg/dl de cálcio. Esta condição pode ser devida a insuficiência hepática crónica, síndrome nefrótica, falha cardíaca congestiva e má nutrição.
- Insuficiência renal crónica – também comum devido à hipoproteinémia, hiperfosfatémia, baixa concentração de 1,25(OH)<sub>2</sub>D e/ou resistência à PTH.
- Hipomagnesiémia
- Hipoparatiroidismo
- Pseudohipoparatiroidismo
- Osteomalacia e raquitismo devido a deficiência ou resistência à vitamina D
- Pancreatite aguda

A *hipercalcémia* é muitas vezes encontrada, resultando do aumento do fluxo de cálcio para o fluido extracelular do esqueleto, intestino ou rins. Assim, quando a capacidade renal é excedida, desenvolve-se uma hipercalcémia. As duas causas principais são:

- Hiperparatiroidismo primário – devido a adenoma (80-85% dos casos), carcinoma das paratiroides, neoplasia da pituitária, pâncreas, tiróide e feocromatocitoma.
- Neoplasias com ou sem envolvimento esquelético, neoplasia hematológica coexistente com hiperparatiroidismo

Dentro de outras causas podemos ter ainda:

- Problemas endócrinos
- Excesso vitamínico (A e D)
- Doenças granulomatosas (sarcoidose e Tuberculose)
- Falha renal
- Diuréticos clorotiazídicos
- Acamados
- Aumento das proteínas plasmáticas (hemoconcentração e mieloma múltiplo)

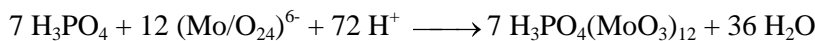
### C3. Fósforo

#### 1. Introdução

O plasma contém fósforo inorgânico e orgânico, mas apenas o inorgânico é medido. O fósforo inorgânico é o componente principal da hidroxiapatite no osso e, por isso, desempenha um importante papel no suporte estrutural do corpo.

A maior parte do fósforo corporal é intracelular, constituindo o anião intracelular mais abundante. O metabolismo do fósforo está intimamente ligado ao cálcio. Fisiologicamente, quando o cálcio sobe no soro, o fósforo desce, sendo este controlo feito a nível renal.

#### 2. Método



A absorvância a 340/380 nm é directamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra.

#### 3. Interpretação de resultados

Valores de referência:

Soro – 2.5-4.5 mg/dl

Urina – 0.4-1.3 g/24h

A *hipofosfatémia* (<2.5 mg/dl) pode ter as seguintes causas:

- Mudança do fósforo do fluido extracelular para o fluido intracelular. Esta é a causa mais comum de hipofosfatémia. Esta mudança pode ser devida à estimulação da secreção de insulina induzida por carboidratos, a qual estimula o transporte de glucose e fosfato para as células sensíveis à insulina, onde, por sua vez, o fosfato é incorporado em açúcares e ATP. A glucose oral ou endovenosa e as injeções de insulina também fazem diminuir a concentração plasmática de fósforo. A alcalose respiratória, conduz a um aumento de pH intracelular e a um aumento da glicólise, levando à entrada de fósforo para a célula.
- Limiar de excreção renal baixo – por hiperparatiróidismo e defeitos tubulares (hipofosfatémia familiar e Síndrome de Fanconi).
- Diminuição da absorção intestinal – esta pode ser devido a perdas aumentadas (vómitos diarreias e antiácidos), absorção diminuída (deficiência em vitamina D).
- Perda de fosfato intracelular por acidose.

Por sua vez, a *hiperfosfatémia* pode ser causada por:

- Insuficiência renal – esta é a causa mais comum e pode ter origem na: diminuição da taxa de filtração glomerular e aumento da reabsorção tubular.
- Aumento do aporte de fosfato na dieta
- Mudança de fósforo do fluido intracelular para o extracelular – a qual pode ser devida a:
  - ✓ Mudança transcelular – acidose láctica, acidose respiratória e cetoacidose diabética
  - ✓ Lise celular – rabdomiólise, hemólise intravascular, leucemias e linfomas.

## Enzimas

### C4. Enzimas Hepáticas

#### Aminotransferases (AST e ALT)

##### 1. Introdução

As aminotransferases constituem um grupo de enzimas que catalizam a interconversão de aminoácidos em 2-oxo-ácidos pela transferência de grupos amino.

##### (a) AST- Aspartato Aminotransferase sérica

A AST (GOT) é uma enzima encontrada em vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, coração, músculo esquelético e eritrócitos.

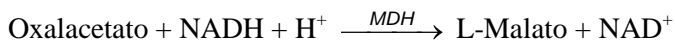
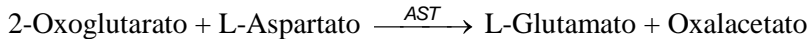
##### (b) ALT – Alanina aminotransferase sérica

A ALT (GPT) é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, porém com quantidades moderadas no rim e pequenas quantidades no coração e musculatura esquelética. E, geral, a maior parte da elevação da ALT deve-se à presença de doença hepática, embora a ocorrência de graus significativos de lesão tecidual nos outros órgãos mencionados também possa afectar os níveis séricos.

##### 2. Método

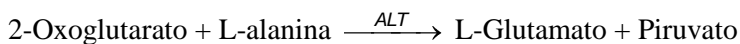
##### i AST

A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à actividade AST na amostra.



##### ii ALT

A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à actividade do ALT na amostra.



##### 3. Interpretação de resultados

Valores de referência:

|               | AST     | ALT     |
|---------------|---------|---------|
| <b>Homem</b>  | <35 U/l | <45 U/l |
| <b>Mulher</b> | <31 U/l | <34 U/l |

As patologias hepáticas são as principais responsáveis pelo aumento das transaminases no soro. Na maioria das vezes a ALT tem maior actividade que a AST, mas há excepções a referir:

- Hepatite alcoólica
- Cirrose hepática
- Cancro hepático

Nas hepatites virais e outras formas de necrose hepática, os valores destas enzimas elevam-se antes dos sinais clínicos e o aparecimento de sintomas. A actividade das enzimas pode ser bastante elevada, chegando a alcançar valores de 100 vezes maiores ou mais que o referido valor de referência.

A persistência da ALT por mais de 6 meses após um episódio de hepatite aguda é usado para diagnosticar uma hepatite crónica.

Na colestase extra-hepática, as concentrações de transaminases é elevada, sendo maiores do que a obstrução crónica. Na cirrose, a concentração varia consoante o estado do processo e, podem atingir um máximo de 45 vezes o limite máximo de referência, e com um ratio AST/ALT superior a 1. Este ratio pode reflectir o grau de fibrose nestes pacientes. No cancro hepático, a elevação de ambas as enzimas é entre duas a cinco vezes, com uma AST mais elevada do que a ALT.

Ligeiras alterações nos valores das enzimas podem ser encontrados concomitantemente com a administração de medicamentos.

A ALT é uma enzima mais específica do fígado, pelo que os seus valores elevados são geralmente observados em doenças hepáticas parenquimatosas.

No caso de uma elevação isolada da AST, podemos estar perante um enfarte do miocárdio, pois esta enzima tem uma concentração elevada no músculo cardíaco. No entanto, também pode aparecer em distrofias musculares e dermatomiosite. No caso de patologias do músculo esquelético estriado, o CK também está aumentado, o que nos permite o destringer de patologias.

## ***Fosfatase Alcalina***

### *1. Introdução*

A fosfatase alcalina é constituída por um grupo de enzimas estreitamente relacionadas e com actividade máxima em pH 10.

A actividade da FA está presente na maioria dos órgãos e está associada a membranas e superfícies celulares localizadas na mucosa do intestino delgado e túbulos contornados proximais do rim, ossos (osteoblastos), fígado e placenta.

### *2. Método*

A taxa de alteração na absorvância decorrente da formação de pNP é medida bicromaticamente a 410/480 nm e é directamente proporcional à actividade da fosfatase alcalina na amostra.



### *3. Interpretação de resultados*

*Valor de referência:* 30-120 U/l (adultos)

O doseamento de FA tem particular interesse na investigação de 2 patologias:

1. Doença hepatobiliar
2. Doença óssea associada a aumento de actividade de osteoblastos

No primeiro caso, esta enzima mostra-se especialmente sensível à obstrução do trato biliar, de carácter intra- ou extra-hepática. O grau de elevação reflecte o grau de obstrução e o nível de tecido biliar afectado. A elevação do resultado tende a ser maior no caso de obstrução extra-hepática (pedras na vesícula ou cancro da cabeça do pâncreas) do que na intra-hepática. Uma elevação de valores semelhante ao anterior podem surgir em cancro hepático avançado ou

metástases hepáticas. Lesões parenquimatosas, como na hepatite infecciosa, reflectem apenas um ligeiro aumento de resultados ou, resultados normais.

No segundo caso, doença óssea, podemos estar perante um tumor metastizante com reacção osteoblástica ou a Doença de Paget.

Esta enzima, também apresenta aumentos de actividade nalgumas situações fisiológicas:

- Crescimento – devido à actividade osteoblástica característica deste período;
- Gravidez – pode haver aumentos nos dois últimos trimestres devido a libertação da sua forma placentária.

### ***Gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT)***

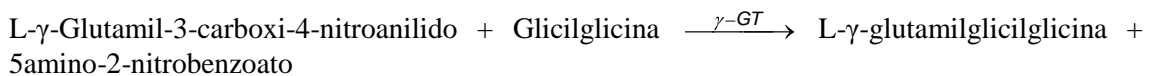
#### *1. Introdução*

A Gama GT pertence a um grupo de peptidases que catalizam a transferência de aminoácidos de um péptido para outro e actuando, assim, como transferases de a.a..

A  $\gamma$ GT existe em todas as células do organismo, excepto os músculos. A enzima existente no soro parece ter essencialmente origem no sistema hepatobiliar.

#### *2. Método*

A  $\gamma$ GT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido para a glicilglicina, produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. A alteração da absorvância a 410/480 nm deve-se à formação de 5-amino-2-benzoato e é directamente proporcional à actividade da GGT na amostra.



#### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

Homens - <55 U/l

Mulheres - <38 U/l

O aumento de actividade de GGT parece ser um marcador sensível de doença hepatobiliar. Tal como a FA, a GGT apresenta valores bastante elevados quando na presença de uma obstrução intra ou pós-hepática. O seu aumento aparece em doentes com hepatite infecciosa, fígado gordo e com a toma de fármacos anticonvulsivos. Em doentes com cirrose alcoólica e na maioria dos doentes que consomem grandes quantidades de álcool, a GGT encontra-se elevada desempenhando um papel importante na detecção do alcoolismo e monitorização.

Ao contrário da FA, a GGT não está aumentada em situações patológicas de carácter ósseo.

No enfarte do miocárdio, esta enzima apresenta-se normal. No entanto, um aumento pode ocorrer ao fim do 4º dia e implica normalmente lesão hepática secundária.

## **C5. Enzimas musculares**

### ***Creatina Quinase (CK)***

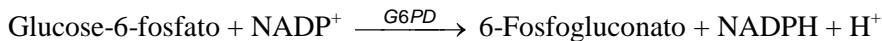
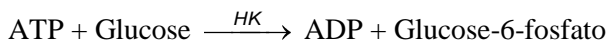
#### *1. Introdução*

O CK é um dímero composto por subunidades M-músculo e/ou B-cérebro que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CKMB e CK-BB. Estes catalisam a fosforilação reversível da creatina por ATP. O magnésio é um ião activador formando complexos com ATP e ADP.

A actividade do CK é maior no músculo estriado e do coração. Nos outros tecidos, como o cérebro, tracto GI e bexiga, tem menor actividade.

#### *2. Método*

A proporção do aumento da absorvância a 340/660 nm, devido à formação de NADPH, é directamente proporcional à actividade de CK na amostra.



#### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

Homens -  $\leq 171$  U/l

Mulheres -  $\leq 145$  U/l

O valor sérico de CK está muito aumentado em todos os tipos de distrofia muscular, como por exemplo:

- Distrofia de Duchenne
- Miosite viral
- Polimiosite
- Doenças musculares semelhantes às anteriores

A actividade do CK aumenta após danos no miocárdio, com aumento significativo das fracções MM e MB. O aumento proporcional da fracção MB depende da dimensão dos danos causados no miocárdio.

Esta enzima é determinada em conjunto com outros parâmetros para diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio, tais como a Troponina I, Troponina T, CK-MB, GOT, LDH e mioglobina.

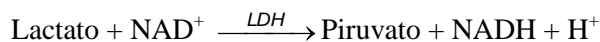
## **LDH (Lactato Desidrogenase)**

### *1. Introdução*

A LDH do soro consiste na actividade de 5 isoenzimas, LDH-1 a LDH-5, diferenciáveis na base da respectiva composição sub-unitária. Visto a concentração de LDH nos tecidos ser 500 vezes superior à existente no plasma, a ocorrência de danos numa pequena porção de tecido pode conduzir a um aumento significativo da sua actividade no soro. Por isso, o papel principal do LDH total reside na detecção de lesões reduzidas no tecido.

### *2. Método*

A LDH catalisa a oxidação do lactato em piruvato juntamente com a redução de NAD<sup>+</sup> em NADH. O aumento de NADH é medido a 340 nm e é directamente proporcional à actividade enzimática na amostra.



### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

Homens - <248 U/l

Mulheres - <247 U/l

Devido à sua distribuição alargada, a elevação de LDH pode ocorrer numa série de condições patológicas:

- Enfarte do miocárdio
- Hemólise
- Hepatopatias
- Rins
- Pulmão
- Músculo

A LDH é relevante no diagnóstico de:

- Enfarte de miocárdio
- Anemia hemolítica
- Disgerminoma ovariano
- Tumor das células germinais testiculares

No caso de enfarte de miocárdio, o LDH está associado a uma elevação de valores de 3 a 4 vezes do total; aumentos semelhantes podem ocorrer na miocardite, disritmias cardíacas e prótese de válvula.

## C6. Enzimas pancreáticas

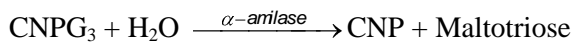
### *α-Amilase*

#### 1. *Introdução*

A α-amilase é uma enzima da classe das hidrolase que catalisa a hidrólise de ligação 1,4-α-glucosídicas em polissacáridos. Esta enzima encontra-se num grande número de tecidos e órgãos. A maior concentração é nas glândulas salivares (tipo-S), e no pâncreas (tipo-P) produzida pelas células acinares.

#### 2. *Método*

A libertação de 2-cloro-4-nitrofenil (CNP) do substrato e o resultante aumento da absorvância a 410 nm é directamente proporcional à actividade da α-amilase na amostra.



#### 3. *Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

Soro/plasma – 22-80 U/l

Urina – 42-321 U/l

A amilase sérica é normalmente baixa, aumentando drasticamente:

1. Pancreatite aguda primária ou pancreatite crónica recidivantes
2. Hiperamilasémia associada a doença do trato biliar: colecistite, litíase, tumor, espasmo do esfíncter de Oddi ou após canulação do trato biliar.
3. Hiperamilasémia associada a doença intra-abdominal aguda não biliar: ulcera gastroduodenal, peritonite, e outros.

A amilase urinária pode ser útil na confirmação de valores séricos, ou quando os valores estão normais. Em geral, a amilasúria aumenta 24 horas após a sérica e, permanece alterada durante 7-10 dias após a normalização dos valores séricos. A amilase sérica é rapidamente eliminada pelos rins, pelo que as doenças que afectam o pâncreas fazem aumentar os níveis urinários da enzima. A amilasúria é sensível para a doença hepática, mas não é específica. Para maior informação deve-se comparar a razão amilasúria/clearance da creatinina. Uma razão superior a 5% indica uma pancreatite e uma inferior aponta para outras causas.

## **D. Função Renal**

### **D1. Creatinina**

#### *1. Introdução*

A creatinina está presente em quase todos os fluidos corporais e é filtrada livremente pelo glomérulo. Posteriormente, não sofre reabsorção pelos túbulos renais e sofre uma pequena, mas significativa, secreção tubular. Este facto concreto faz com que a creatinina seja um analito de eleição para a avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG) e da função renal.

#### *2. Método*

A creatinina forma um composto amarelo-alaranjado com o ácido pícrico num meio alcalino. A taxa de alteração na absorvância é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Creatinina + Ácido pícrico  $\longrightarrow$  Complexo picrato de creatinina

#### *3. Interpretação de resultados*

##### *Valores de referência séricos*

Homens < 50 anos – 0.84-1.25 mg/dl  
Homens >50 anos – 0.81-1.44 mg/dl  
Mulheres – 0.66-1.09 mg/dl

##### *Valores de referência urinários*

Homens – 1100-2000 mg/24h  
Mulheres – 800-1350 mg/24h

Reduções fisiológicas da creatinémia observam-se durante a gravidez, perda de massa muscular e terapêutica com esteróides.

A creatinina no soro varia em função da idade, peso corporal e sexo do indivíduo. Por vezes é baixa em indivíduos com massa muscular relativamente reduzida, doentes caquéticos, amputados e em pessoas de idade avançada. Um nível de creatinina no soro que seria considerado normal não exclui a presença de um quadro de insuficiência renal.

### **Clearance da creatinina**

#### *1. Método*

A Clearance da creatinina é um marcador mais preciso da TFG. Obtém-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Clearance}(ml / \text{min}) = \frac{\text{Creatinúria} \times \text{Volume}(ml)}{\text{Creatinémia} \times 1400(s)}$$

#### *2. Interpretação de resultados*

Valor de referência: 75-125 ml/min

A Clearance da Creatinina é um método mais sensível para a detecção de disfunção renal do que o doseamento da creatinina plasmática.

Esta prova, tem os mesmos interferentes do doseamento plasmático, mas são mais reduzidos ou anulados, uma vez que a recolha é feita em 24 horas.

A depuração da creatinina tem sido considerada uma das provas mais sensíveis disponíveis para indicar a presença de insuficiência renal, devido à rápida queda dos seus valores. Valores abaixo de 10 ml/min indicam a necessidade de diálise. Todavia, muitas condições também produzem uma queda na depuração da creatinina, e se a depuração já estiver diminuída, será difícil interpretar qualquer redução adicional nos valores. Esta última é considerada uma das principais desvantagens, tornando-se difícil avaliar a etiologia envolvida.

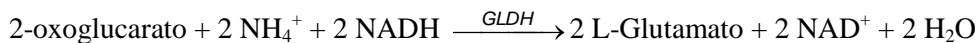
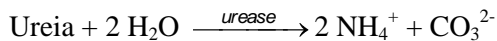
## **D2. Ureia**

### *1. Introdução*

A ureia é o produto metabólico nitrogenado existente em maior quantidade no organismo, proveniente do catabolismo proteico. A biossíntese da ureia a partir da amónia derivada de a.a. é feita exclusivamente a nível hepático no ciclo da ureia.

### *2. Método*

A redução da absorvância de NADH por unidade de tempo é proporcional à concentração de ureia.



### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

Soro/plasma – 17-43 mg/dl

Urina – 15000-34200 mg/24h

Valores aumentados de ureia podem ter 3 tipos de causas:

- *Causas pré-renais* – este tipo de causa está relacionada com deficiência na perfusão renal, uma vez que ocorre a diminuição do fluxo de urina com um aumento da reabsorção tubular passiva deste parâmetro. Também se observa um aumento dos níveis plasmáticos de Ureia quando há ingestão de dietas ricas em proteínas ou, como resultado do aumento do catabolismo proteico devido, por exemplo, a traumatismos.
- *Causas renais* - insuficiência renal aguda ou crónica com diminuição da filtração glomerular. Há um aumento dos níveis plasmáticos de Ureia até estes igualem a quantidade excretada na urina, ou continuam a aumentar quando há uma insuficiência renal completa.
- *Causas pós-renais* - quando há uma obstrução do fluxo de urina que pode acontecer a diferentes níveis (uréter, bexiga ou uretra) e devido a várias causas (ex.: pedras no rim, prostatites, cancro genitourinário).

Contrariamente, os níveis de ureia podem estar diminuídos na hepatopatia grave e, por vezes, no final da gravidez.

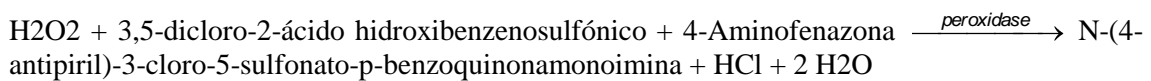
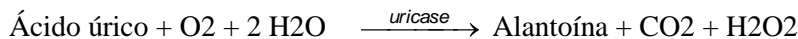
### D3. Ácido úrico

#### 1. Introdução

O ácido úrico é o produto principal do catabolismo de purinas no ser humano, e é formado a partir da xantina sob a acção da xantina-oxidase. A maior parte da formação do ácido úrico ocorre no fígado e é eliminado através dos rins; a reserva de ácido úrico no organismo é determinada pela diferença entre a síntese e a eliminação.

#### 2. Método

A quantidade de corante formado é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.



#### 3. Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Homem – 3.5-7.2 mg/dl
- Mulher – 2.6-6.0 mg/dl
- Urina – 250-750 mg/24h

A hiperuricémia é classificada da seguinte forma:

1. Por diminuição da excreção:
  - a. Primária
  - b. Secundária
2. Por aumento da formação:
  - a. Primária
  - b. Secundária

A Gota, patologia com origem na hiperuricémia, pode ser classificada como primária ou secundária. A Gota primária está associada à hiperuricémia “essencial”, a qual tem uma origem poligénica. A causa não é conhecida mas parece ter a ver com uma combinação de uma superprodução de purinas, diminuição da excreção renal e aumento de ácido úrico na dieta. Raramente a Gota primária é atribuída a deficiências enzimáticas na via de metabolização de purinas.

A gota secundária deve-se a várias causas como resultado de:

- Hiperuricémia por retenção renal (Insuficiência renal aguda ou crónica)
  - ✓ Secreção renal reduzida
  - ✓ Reabsorção renal aumentada
  - ✓ Ácidos orgânicos
  - ✓ Diuréticos tiazídicos
- Formação aumentada
  - ✓ Excesso de purinas na dieta
  - ✓ Turn-over aumentado de ácidos nucleicos (leucemia)
  - ✓ Psoríase
  - ✓ Pré-eclâmpsia

## **D4. Microalbuminúria**

### *1. Método*

Quando uma amostra é misturada com o tampão e solução anti-soro, a albumina humana reage especificamente com anti-soros de albumina anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de albumina na amostra.

### *2. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:*

|                            |               |
|----------------------------|---------------|
| <b>Normal</b>              | <30 mg/24h    |
| <b>Microalbuminúria</b>    | 30-299 mg/24h |
| <b>Albuminúria clínica</b> | ≥300mg/24h    |

A microalbuminúria é definida como um aumento da excreção urinária de albumina acima do valor de referência para sujeitos não diabéticos, mas não detectável noutros testes para a determinação de proteína urinária. A microalbuminúria é agora considerada um importante factor indicador do declino da função renal em sujeitos diabéticos.

Podemos considerar uma microalbuminúria diabética quando há detecção de excreção de albumina em pelo menos 2 de 3 amostras obtidas num prazo de 6 meses.

## **E. Metabolismo do ferro, hemoglobina e bilirrubinas**

### *1. Introdução*

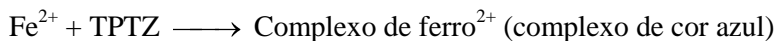
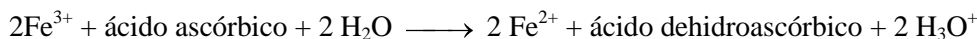
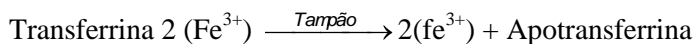
A maior parte do ferro corporal tem origem no ferro consumido no estado férrico, o qual é convertido na forma ferrosa após ingestão e absorvido predominantemente no duodeno e jejuno. O ferro circula no sangue acoplado a uma beta-globulina, denominada *transferrina*. Os precursores eritróides na medula óssea utilizam parte do ferro disponível e, do restante, cerca de 60% é armazenado na medula óssea, fígado e baço sob a forma de *ferritina* e os outros 40% sob a forma de *hemossiderina*.

A bilirrubina é um pigmento amarelo-alaranjado derivado da destruição eritrocitária, conjugado no fígado e excretado na bÍlis e urina. Esta molécula provém da degradação do heme, da mioglobina e citocromos. Sendo insolúvel no plasma, esta proteína é transportada ligada à albumina até aos hepatócitos. AÍ é conjugada com o ácido glucorónico tornando-a hidrossolúvel. A sua libertação posterior no intestino serve para saponificar as gorduras.

## **E1. Ferro**

### *Método*

O aumento na absorvância é directamente proporcional à quantidade de ferro ligado à transferrina registada.



### *1. Interpretação de resultados*

Valores de referência:

Homem – 70-180 µg/dl

Mulher – 60-180 µg/dl

### *Deficiência em ferro*

A deficiência em ferro é uma das patologias mais prevalentes no ser humano. Podemos ter 3 tipos de causas:

1. Ingestão insuficiente de ferro para repor as perdas normais de um individuo.
2. Ferro não disponível para a eritropoiese, apesar de apresentar níveis normais
3. Perda aumentada de ferro corporal (perda sanguínea)

A quantificação isolada de ferro sérico não fornece muita informação clínica, nem muita informação sobre o estado das reservas no organismo. Por essa razão, utiliza-se concomitantemente a determinação de: transferrina, da capacidade total de fixação de ferro e a ferritina.

Na tabela seguinte compara-se os valores típicos de uma anemia ferropénica e de uma anemia crónica:

|                                  | <b>Anemia Ferropénica</b> | <b>Doenças crónicas</b> |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>Ferro</b>                     | ↓                         | ↓                       |
| <b>Transferrina</b>              | ↑                         | ↓                       |
| <b>CTFF</b>                      | ↑                         | ↓                       |
| <b>Saturação da transferrina</b> | <10%                      | >10%                    |
| <b>Ferritina</b>                 | ↓                         | ↑                       |

#### *Excesso de ferro*

Existem algumas patologias características desta sobrecarga:

- Hemossiderose - sobrecarga de ferro sem a lesão tecidual
- Hemocromatose – é uma sobrecarga de ferro associada a lesão de órgãos, com conseqüente degeneração celular e fibrose. Geralmente resulta da absorção excessiva de ferro em indivíduos que sigam uma dieta normal. Pode ainda ser hereditária, resultante dum erro inato da absorção do ferro.
- Anemia Sideroblástica
- Talassémia

## **E2. Transferrina**

### *1. Método*

Quando uma amostra é misturada com tampão e solução anti-soro, a transferrina humana reage especificamente com anticorpos transferrina anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de transferrina na amostra.

### *2. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:* 200-360 mg/dl

A medição dos níveis de transferrina no plasma é útil no diagnóstico diferencial da anemia, pois temos um aumento na anemia ferropénica.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, pelo que diminui nos estados inflamatórios ou de malignidade, confirmando, deste modo, anemias crónicas secundárias a estas patologias. Em condições associadas a um aumento de perda proteica, tal como o síndrome nefrótico, estado de deficiência proteica e na doença hepática crónica, a transferrina também apresenta valores diminuídos. No entanto, nalguns estados fisiológicos, como a gravidez, e na administração de estrogénios, esta proteína tem valores diminuídos.

## **E3. Capacidade total de fixação de ferro (CTFF)**

### *1. Método*

A capacidade total de fixação do ferro é calculada pela seguinte fórmula:

$$CTFF = [Fe\text{ sérico}] + [UIBC]$$

UIBC = capacidade de fixação do ferro não saturada

*O doseamento do UIBC é feito da seguinte forma:*

O  $\text{Fe}^{2+}$  do primeiro reagente reage com o Nitroso-PSAP do segundo reagente para formar um complexo verde intenso. Se for adicionada à amostra parte ou totalidade de iões ferro fixados especificamente com transferrina em locais de fixação de ferro não saturados a um pH alcalino, estes não estarão disponíveis para a reacção colorida com o Nitroso-PSAP. A diferença entre alterações resultantes nas absorções medidas com ou sem as amostras é equivalente à quantidade de ferro fixada na transferrina. Isto consiste na capacidade de fixação de ferro não saturada (UIBC).

## *2. Interpretação de resultados*

Valor de referência: 228-428  $\mu\text{g/dl}$

A CTFF representa um valor aproximado do valor da transferrina. A redução dos níveis de transferrina produz uma diminuição da CTFF para valores baixos ou normais baixos. A hipoproteïnemia e a sobrecarga de ferro também estão associadas a uma redução da CTFF. É de notar que as condições que reduzem a CTFF podem mascarar a sua elevação na presença concomitante de deficiência de ferro crónica. Algumas das condições que aumentam os níveis de transferrina consequentemente fazem aumentar a CTFF.

## **E4. Saturação da Transferrina**

### *1. Método*

A saturação da transferrina (referida no doseamento do ferro) pode ser calculada a partir do CTFF e da siderémia:

$$\text{Sat. Transferrina}(\%) = \frac{\text{Fe}}{\text{CTFF}} \times 100$$

### *2. Interpretação de resultados*

Valores de referência: 20-45%

A ST% apresenta-se aumentada na hemocromatose (>90%), hemossiderose, talassémia, hepatite aguda, ingestão de ferro, gestação e uso de progestagénios. Apresenta-se diminuída em anemias ferropénicas (<10%), anemias secundárias a infecções e doenças crónicas, desnutrição e estados catabólicos agudos.

## **E5. Bilirrubinas**

### *1. Método*

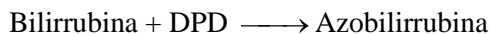
#### *i **Bilirrubina Total***

A absorvância a 540 nm é proporcional à concentração de bilirrubina total. É efectuada uma amostra em branco separada para reduzir a interferência do soro endógeno.



#### *ii **Bilirrubina Directa***

A absorvância a 570 nm é proporcional à concentração de bilirrubina directa na amostra.



### *2. Interpretação de resultados*

Valores de referência:

Bilirrubina total: 0.3-1.2 mg/dl

Bilirrubina directa: <0.2 mg/dl

O seu doseamento tem interesse no estudo de doentes ictericos em que está associada uma hiperbilirrubinémia. Este aumento de bilirrubina pode ocorrer por várias causas:

- *Hiperbilirrubinémia pré-hepática:* há uma produção exagerada de bilirrubina que se traduz por um aumento da sua forma não conjugada. É uma alteração que está presente em todas as formas de anemias hemolíticas;
- *Hiperbilirrubinémia hepatocelular:* podem ocorrer várias situações, nomeadamente, um *uptake* hepático anormal de bilirrubina (ex.: Síndrome de Gilbert, hepatite ou cirrose), uma conjugação de bilirrubina ineficiente (ex.: Recém-nascidos prematuros, Síndrome de Gilbert e de Crigler-Najjar, lesão hepatocelular provocada por uma hepatite viral), uma secreção anormal de bilirrubina na bÍlis (ex.: Síndromas de Rotor e Dubin-Johnson, lesão hepatocelular generalizada). Todas estas situações traduzem-se num aumento das duas formas (conjugada e não conjugada) de bilirrubina.
- *Hiperbilirrubinémia colestática:* a obstrução do fluxo da bÍlis tanto pode ser intra como extra-hepática e, ambas traduzem-se por um aumento da forma conjugada de bilirrubina.

## **F. Proteínas**

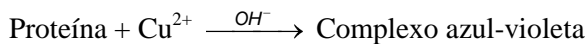
### **F1. Proteínas totais**

#### *1. Introdução*

O doseamento das proteínas totais é utilizado no diagnóstico e no tratamento de doenças diversas que envolvem fígado, rins ou a medula óssea, bem como perturbações ósseas e nutricionais.

#### *2. Método*

Iões cúpricos numa solução alcalina reagem com proteínas e polipéptidos que contenham pelo menos duas uniões de prótidos para produzir um complexo de cor violeta. A absorvância 540/660 nm é directamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.



#### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:* 6.6-8.3 g/dl

Temos diversos modos de estudar as proteínas presentes no soro, sendo o *doseamento das proteínas totais* o maior numero de proteínas em circulação abrange. A partir do valor obtido podemos aprofundar este estudo usando outros métodos mais específicos.

São duas as principais causas de alterações das proteínas totais no soro:

- mudança no volume da água plasmática;
- alteração na concentração de uma (ou mais) proteína(s) específica(s) constituinte(s) do plasma.

### **F2. Proteinúria**

#### *1. Introdução*

O glomérulo actua como filtro para as proteínas plasmáticas. O grau de filtração através da membrana é função do peso molecular, carga iónica e concentração plasmática. Geralmente, o transporte de proteínas através da membrana diminui progressivamente com o aumento do tamanho da proteína e da carga negativa.

#### *2. Método*

O vermelho de Pirogallol é combinado com molibdato para formar um complexo vermelho com uma absorvância máxima a 470 nm. A análise é baseada na mudança na absorvância que ocorre quando o complexo de molibdato-vermelho de Pirogallol liga grupos amino básicos de moléculas de proteínas. Um complexo azul púrpura é formado com uma absorvância máxima a 600 nm. A absorvância deste complexo é directamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.

#### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:* 0.05-0.08 g/24h (pode aumentar até 0.30 g/24h com prática de desporto)

A proteinúria (aumento das proteínas na urina) ocorre em 4 situações específicas:

- Permeabilidade glomerular acrescida, na qual a proteína constituinte é maioritariamente a albumina;
- Reabsorção tubular deficiente, em que as proteínas são de peso molecular baixo;
- Concentração acrescida de proteínas de baixo peso molecular, tais como as cadeias leves de imunoglobulinas;
- Secreção anormal de proteína para o tracto urinário (proteinúria pós-renal).

### **F3. C3 e C4**

#### *1. Introdução*

O sistema de complemento consiste em cerca de 20 proteínas do plasma, bem como em receptores nos glóbulos que desempenham um papel importante na inflamação ao facilitarem a fagocitose através de opsonização, células heterolíticas, aumentando a permeabilidade vascular e atraindo fagócitos. Estas proteínas podem ser divididas nos seguintes grupos:

1. *Via clássica* – a qual inclui: C1, C4, C2 e C3;
2. *Via alternativa* – que inclui: C3, factores B e D e properdina;
3. *O complexo de ataque* à membrana, que inclui o C5 ao C9;
4. Inibidores e activadores das 2 vias, incluindo o C1 inibidor, factores H e I, e C4b;
5. Receptores celulares para os componentes activados ou ligados às células.

#### *2. Método*

##### *i C3*

Quando uma amostra é misturada com tampão Tris e solução anti-soro C3 de cabra, o C3 humano reage especificamente com anticorpos C3 anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de C3 na amostra.

##### *ii C4*

Quando uma amostra é misturada com tampão Tris e solução anti-soro C4 de cabra, o C4 humano reage especificamente com anticorpos C4 anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de C4 na amostra.

#### *Interpretação de resultados*

Valores de referência:

C3: 90-180 mg/dl

C4: 10-40 mg/dl

C3 *aumentados* estão normalmente associados a:

- Resposta inflamatória de fase aguda;
- Obstrução biliar – em proporção directa com a hiperbilirrubinémia;
- Glomeruloesclerose focal.

Valores de C3 *diminuídos* estão associados a:

- Deficiência congénita – com aumento do risco de infecção;
- Deficiência adquirida – doenças vasculares associados ao colagénio, como a nefrite lúpica e infecções graves;
- Durante a infância.

C4 com valores ligeiramente  *aumentados* aparecem na resposta inflamatória de fase aguda (inflamação, trauma ou necrose tecidual).

Valores  *baixos* de C4 estão associados a:

- Deficiência genética – como por exemplo, Lúpus Eritematoso Sistémico e que levam a um aumento da probabilidade de infecção;
- Deficiência adquirida – níveis de C4 aparecem diminuídos por consumo. Temos como exemplo, o angioedema hereditário (deficiência em inibidor C1), anemia hemolítica e nefrite auto-imune;
- Durante a infância.

## **F4. Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM)**

### *1. Introdução*

As classes de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE estão presentes pela ordem decrescente de concentração no soro de indivíduos saudáveis.

#### *i*      **IgG**

A IgG é particularmente importante na defesa a longo prazo do organismo contra infecções, uma vez que, apresenta uma resposta mais lenta, mas mais sustentada do que a IgM a um estímulo antigénico primário. Contudo, os níveis de IgG sobem rapidamente se re-expostos ao mesmo estímulo antigénico. A IgG promove a fagocitose e activa o complemento.

#### *ii*     **IgA**

A IgA secretória é a imunoglobulina predominante nas secreções corporais, tais como a saliva, lágrimas, secreções nasais, muco traqueobrônquico e secreções gástricas. A função essencial desta IgA reside na ligação a microrganismos nas mucosas, a activação da via alternativa do complemento e a activação de reacções inflamatórias.

#### *iii*    **IgM**

A sua função principal na resposta imunitária é a aglutinação de patogénios e a activação da via complementar clássica.

### *2. Método*

Quando uma amostra é misturada com tampão Tris e solução anti-soro IgG, IgA ou IgM de cabra, o IgG, IgA ou IgM humano reage especificamente com anticorpos IgG, IgA ou IgM anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de IgG, IgA ou IgM na amostra.

### *3. Interpretação de resultados*

Valores de referência:

IgG: 700-1600 mg/dl

IgA: 70-400 mg/dl

IgM: 40-230 mg/dl

As alterações das concentrações de imunoglobulinas podem ser classificadas da seguinte forma:

- *Hipogamaglobulinémias* – deficiência de produção
- *Gamapatias policlonais*
- *Gamapatias monoclonais*

*(a) Hipogamaglobulinémias*

Na IgG, a deficiência pode ser genética (imunodeficiência combinada grave) ou adquirida (ex.: SIDA). O diagnóstico definitivo do síndrome clínico requer uma avaliação extensiva das funções humoral e celular na resposta imunitária. Uma diminuição de IgG também pode ocorrer como resultado de queimaduras graves, Síndrome Nefrótico, enteropatias com perda de proteínas e mielomas não-IgG.

Constatou-se que indivíduos com déficit de IgA secretória têm tendência para ter infecções nas mucosas com maior frequência, atopia e doenças auto-imunes. Indivíduos com deficiência em IgA possuem uma maior incidência de problemas reumáticos e de linfomas.

A deficiência em IgM é rara e está associada a infecções pirogénicas frequentes.

*(b) Gamapatia policlonal*

Os níveis de IgG estão aumentados em: doenças auto-imunes (Lúpus Eritematoso Sistémico, Artrite Reumatóide, Síndrome de Sjogren), sarcoidose, doença hepática crónica, infecção parasitária e infecções crónicas ou recorrentes.

Na gamapatia policlonal, a IgA, os níveis aumentados surgem na doença hepática crónica, infecções crónicas, especialmente do tracto GI inferior, doença inflamatória intestinal, alguns estados de imunodeficiências, tais como o síndrome de Wiskott-Aldrich e artrite reumatóide.

No caso da IgM, os níveis estão aumentados na cirrose biliar primária, infecção sanguínea por protozoários (malária), infecções víricas ou bacterianas e artrite reumatóide.

*(c) Gamapatia monoclonal*

Nesta patologia, um único clone de plasmócitos produz moléculas de imunoglobulinas com estrutura idêntica.

No caso da IgG podemos ter um mieloma múltiplo do tipo IgG, linfomas, leucemia e outras doenças.

Para a IgA podemos estar perante um mieloma múltiplo do tipo IgA.

A gamapatia monoclonal do tipo IgM pode estar na origem de uma Macroglobulinémia de Waldenstrom e linfoma maligno.

## **F5. Proteína C reactiva (PCR)**

### *1. Introdução*

A PCR é uma glicoproteína produzida durante a inflamação aguda ou a destruição dos tecidos. A proteína deve o seu nome à capacidade de reagir com o polissacarídeo C somático de *Pneumococos* e precipitá-lo.

### *2. Método*

Quando uma amostra é misturada com tampão Glicina e suspensão de látex, a PCR reage especificamente com anticorpos PCR anti-humanos revestidos nas partículas de látex para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de PCR na amostra.

### *3. Interpretação de resultados*

*Valores de referência:* <5.0 mg/l

Os níveis de PCR no soro podem subir após um enfarte do miocárdio, lesão, infecção, inflamação, cirurgia ou proliferação neoplásica. Com base nalguns estudos realizados, a detecção de níveis de PCR muito mais baixos podem indicar um risco acrescido de doença coronária em doentes assintomáticos.

## **G. Testes imunológicos**

### **G1. Título de Estreptolisina A (TASO)**

#### *1. Introdução*

O estreptococos do grupo A é uma das causas mais comuns de infecções bacterianas humanas, provocando doenças como a febre reumática aguda, glomerulonefrite aguda, faringite aguda, sinusite, pneumonia, escarlatina, gangrena e linfangite. A estreptolisina O é uma hemolisina produzida pelos estreptococos do grupo A. Num indivíduo infectado, a estreptolisina O age como um antigénio proteico ao qual o doente cria uma resposta de anticorpos. Os níveis aumentam numa semana e têm o seu pico 3-6 semanas após infecção. Na ausência de complicações ou reincidência da infecção, geralmente o nível de TASO cairá para níveis de pré-infecção dentro de 6-12 meses.

#### *2. Método*

Quando uma amostra é misturada com tampão de Cloreto de Amónio e suspensão de látex, os anticorpos Anti-estreptolisina O reagem especificamente com látex revestido com Estreptolisina O para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de ASO na amostra.

#### *3. Interpretação de resultados*

Este teste tem, valor diagnóstico directo em:

- Escarlatina;
- Eripsela;
- Faringite ou tonsilite estreptocócica.

Pode ter valor diagnóstico indirecto nos seguintes casos:

- Febre reumática;
- Glomerulonefrite;
- Detecção de infecção estreptocócica subclínica;
- Diagnóstico diferencial entre dor articular decorrente de febre reumática e artrite reumatóide.

## **G2. Factor Reumatóide**

### *1. Introdução*

Os factores reumatóides (RF) são anticorpos dirigidos contra determinados antígenos no fragmento Fc da IgG.

Geralmente, são anticorpos IgM, mas também podem ser IgG, IgA ou IgE. A sensibilidade do factor reumatóide na artrite reumatóide (AR) varia entre 30% em estudos baseados na população e 70-80% em estudos levados a cabo em hospitais, onde a doença tem tendência a ser mais grave. Níveis elevados de RF são mais específicos para diagnóstico de AR e são mais comuns em doentes com destruição rápida e progressiva das articulações e em outros com manifestações extra-articulares. Contudo, o RF é um ensaio não específico observando-se positivo em 1-5% da população saudável e em 15-20% de idosos que apresentam outros estados de doença crónica.

### *2. Método*

Quando uma amostra é misturada com tampão Glicina e suspensão de látex de IgG, o RF reage especificamente com a IgG em partículas de látex para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de RF na amostra.

### *3. Interpretação de resultados*

Os valores deste teste estão aumentados em patologias de origem reumatológica primárias ou secundárias, tais como:

- Artrite reumatóide (80%);
- Artrite reumatóide Juvenil (30%)
- SLE
- Síndrome de Sjogren (90%)
- Púrpura crioglobulinémica (90%)
- Polimiosite
- Esclerose sistémica progressiva
- Sarcoidose
- Infecções crónicas ou agudas
- Síndromes linfoproliferativas
- Patologias reumatóides: psoríases com artrites, colite ulcerativa, enterite regional, Síndrome de Reiter, Espondilite anquilosante.

## Electroforeses

### A. Electroforese de Proteínas séricas

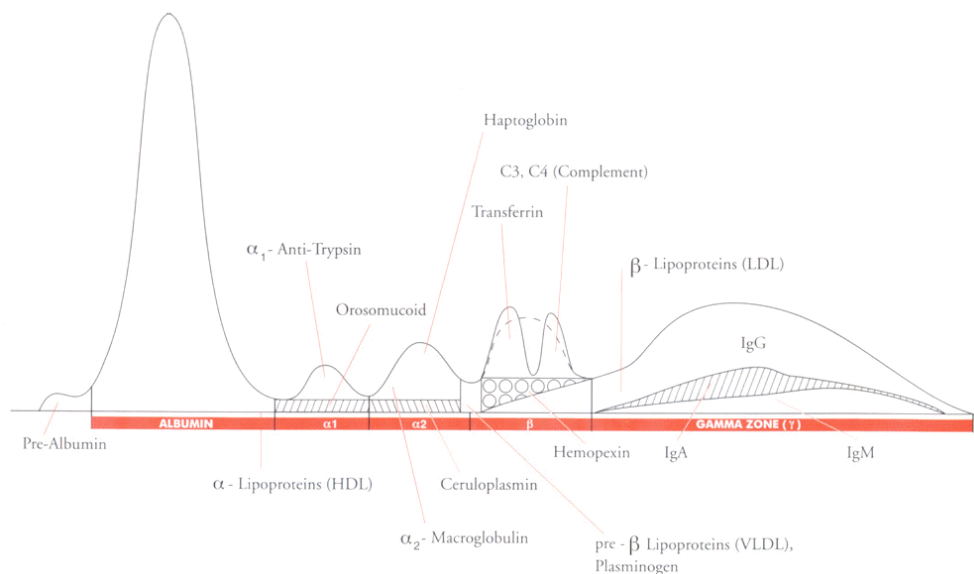
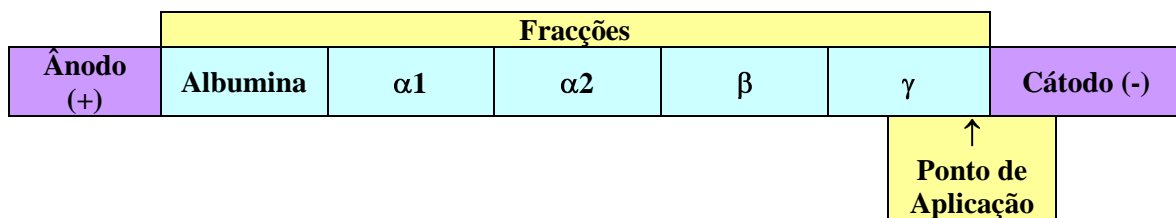
#### 1. Introdução

A electroforese é a prova de triagem mais usada para detectar anomalias nas proteínas séricas. A variação em concentração e composição de proteínas pode alterar-se em condições fisiológicas e patológicas. A destruição celular e alterações no metabolismo são responsáveis por grandes alterações na concentração proteica sérica e/ou alterações nas fracções proteicas.

A electroforese em gel de agarose, executada a pH 8,9, apresenta 5 ou 6 bandas:

- Albumina
- Globulinas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A fracção  $\beta$  pode surgir subdividida em duas novas fracções ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ), caso a electroforese seja feita com tampão contendo iões cálcio e o soro seja recente. Esta banda corresponde aos factores do complemento C3 e C4.

Diagrama esquemático da electroforese de proteínas:



**Figura 24** – Esquema de um proteinograma com as respectivas fracções e seus constituintes principais.

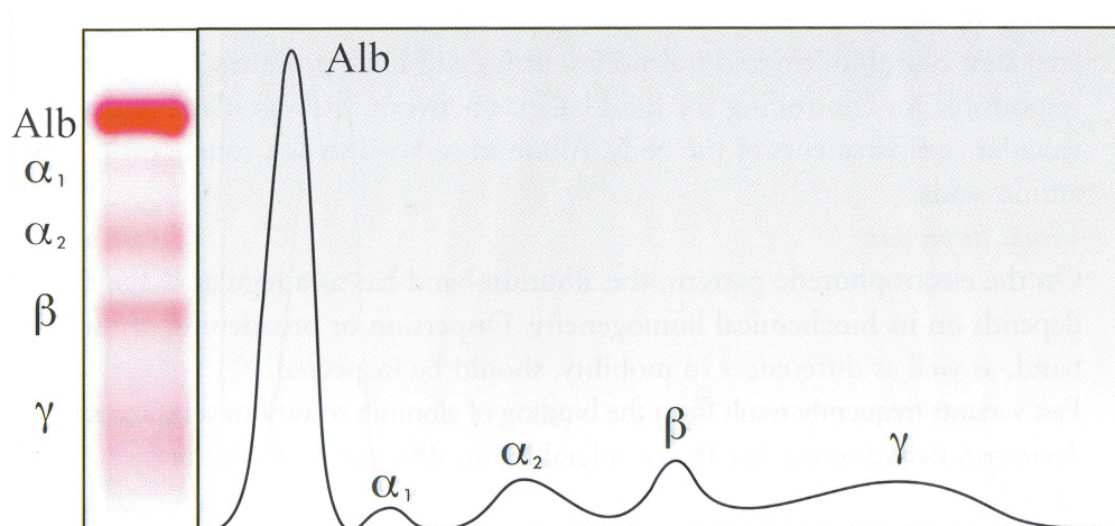
## 2. Método

A técnica de electroforese separa as proteínas séricas com base na premissa de que as espécies proteicas têm diferentes mobilidades quando sujeitas a um campo eléctrico. Cada molécula possui uma carga eléctrica devido à presença de grupos carregados positiva e negativamente. A carga total dita as características de migração das espécies a um dado pH. De acordo com o procedimento, as proteínas são separadas a um pH alcalino utilizando o princípio de “electroforeses de zona” em suporte adequado: gel de agarose. Quando a migração está completa, as proteínas são então sujeitas a um processo de coloração com o reagente Vermelho S de Ponceau. A tira é então sujeita a uma leitura por densitometria e os resultados são apresentados graficamente.



**Figura 25** – Sistema de electroforese em gel de agarose Microgel

## 3. Interpretação de resultados



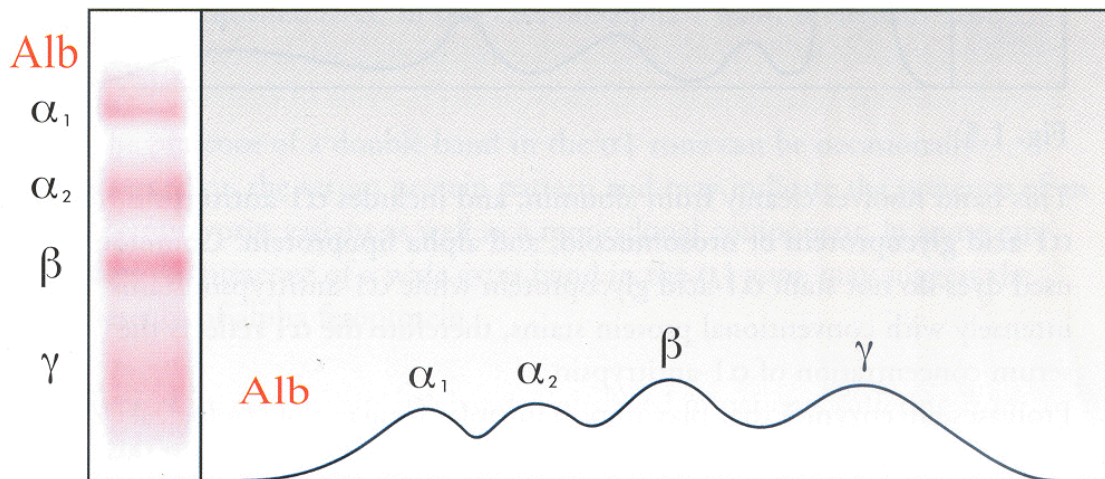
**Figura 26** – Gráfico normal de uma electroforese de proteínas.

### (a) Albumina

É a proteína em maior quantidade no soro (>60% do total de proteínas). Podemos ter as seguintes alterações na banda em termos de quantidade:

- *Aumento* – desidratação devido a uma perda consecutiva de água (sudorese excessiva, diarreia, vômito)
- *Diminuição* – por síntese diminuída (doença hepática, má nutrição, fome), perda proteica renal, queimaduras graves, hemorragia. Uma redução pouco marcada ocorre em situações de inflamação aguda, gravidez e em tumores.

Alterações quantitativas congénitas da síntese de albumina inclui a condição onde a albumina está ausente ou numa concentração muito baixa. A *analbuminémia* é caracterizada por uma marcada descida na produção de albumina cuja concentração está abaixo de 1% do normal.

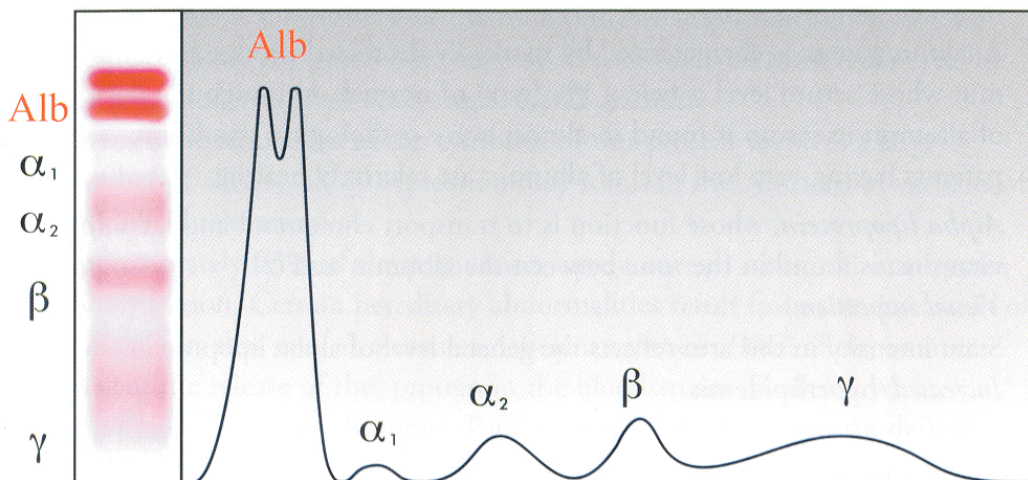


*Figura 27* – Gráfico de uma analbuminémia.

Para além das alterações quantitativas podemos ter alterações na migração da albumina com alteração da banda:

- Bisalbuminémia
- Aloalbuminémia

Estas duas alterações devem-se a condições genéticas, pelas quais, aparece uma banda adicional, na zona da albumina, com uma mobilidade electroforética maior ou menor do que a albumina.



*Figura 28* – Gráfico representativo de uma bisalbuminémia.

(b) *Banda  $\alpha 1$*

Esta banda inclui as seguintes proteínas:

- $\alpha 1$ -antitripsina
- $\alpha 1$ -glicoproteína
- $\alpha$ -lipoproteína

A banda  $\alpha 1$  pode estar:

- *Aumentada* – quando a  $\alpha 1$ -antitripsina está aumentada, pois está incluída nas proteínas de fase aguda e aumenta quando na presença de reacções inflamatórias;
- *Diminuída* – nas doenças pulmonares, particularmente no enfisema.

(c) *Banda  $\alpha 2$*

A banda  $\alpha 2$  inclui um componente anódico ( $\alpha 2$ -macroglobulina) e um componente catódico (haptoglobulina).

Esta banda pode estar:

- *Aumentada quando:*
  - ✓  $\alpha 2$ -macroglobulina aumenta:
    - Em condições fisiológicas como a infância e gravidez;
    - No síndrome nefrótico;
    - Inflamação aguda
  - ✓ Haptoglobulina aumenta:
    - Inflamação aguda ou crónica;
    - Neoplasias;
    - Enfarte do miocárdio.
- *Diminuída quando:*
  - ✓  $\alpha 2$ -macroglobulina diminui
    - Doença hepática associada a perdas proteicas
    - Artrite reumatóide
    - Medicamentos fibrinolíticos
    - Mieloma
  - ✓ Haptoglobulina diminui:
    - Anemia hemolítica
    - Anemia megaloblástica
    - Falha hepática (cirrose, tumor)

(d) *Banda  $\beta$*

A banda  $\beta$  inclui a transferrina e os factores do complemento C3 e C4.

O *aumento* da banda  $\beta$  pode ser devido a:

- Aumento da transferrina (já falado anteriormente)
  - ✓ Gravidez
  - ✓ Anemia ferropénica
- Aumento de C3 e C4 (já falado anteriormente)

A presença de proteína de Bence-Jones, a qual também pode migrar na zona  $\beta$ , pode fazer aumentar a banda.

A *diminuição* da banda  $\beta$  pode ser devido a:

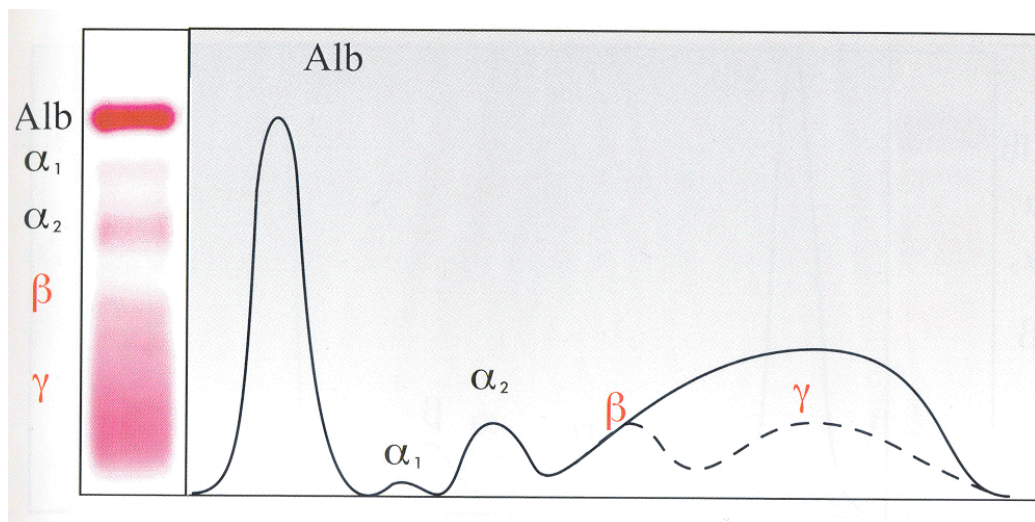
- Diminuição da transferrina
  - ✓ Doença hepática
  - ✓ Nefrose
  - ✓ Neoplasia maligna
  - ✓ Infecção aguda e crónica
- Diminuição do complemento
  - ✓ Estádios activos de doenças imunitárias (SLE, anemia hemolítica auto-imune)
  - ✓ Doença hepática

(e) *Banda  $\gamma$*

A variação da banda  $\gamma$  pode ser:

- *Aumento:*
  - ✓ Hipergamaglobulinémia
  - ✓ Doença hepática
  - ✓ SLE
  - ✓ Infecção crónica
  - ✓ Mieloma múltiplo policlonal ou monoclonal
  - ✓ Linfoma
- *Diminuição*
  - ✓ Idade
  - ✓ Medicamentos
  - ✓ Leucemia linfocítica crónica
  - ✓ Doença das cadeias leves
  - ✓ Agamaglobulinémia

A ponte beta-gama é observada em cirrose alcoólica.



**Figura 29** – Gráfico de uma electroforese de proteínas com uma ponte beta-gama.

## **B. Electroforese de lipoproteínas**

### *1. Introdução*

As diferenças em quantidade e tipo de lípidos permite classificar as lipoproteínas em 4 grupos principais de acordo com a sua insolubilidade electroforética:

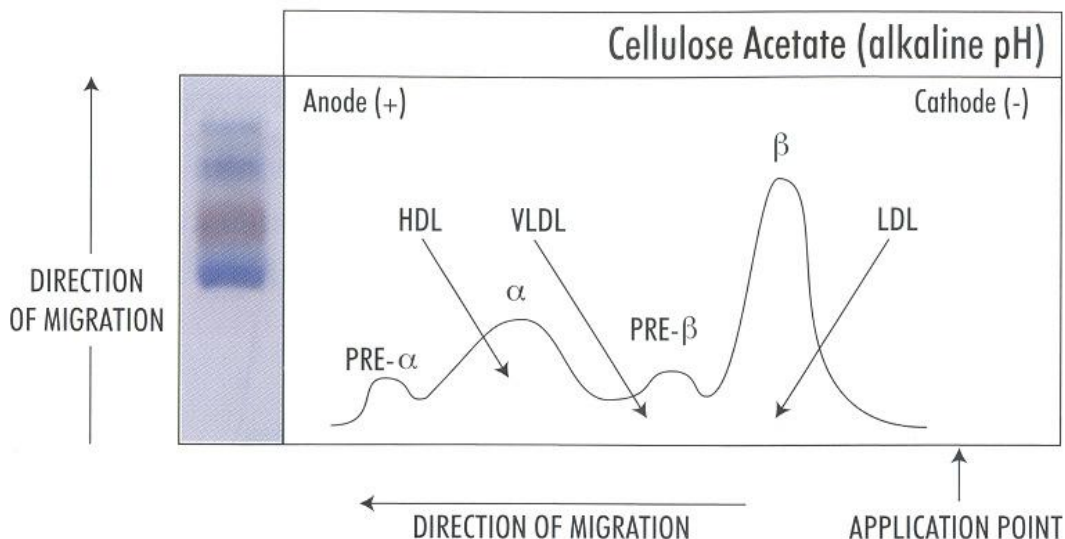
- Quilomicrons
- Beta
- Pré-beta
- Alfa

Deve-se ter em conta que a fracção beta, pré-beta e alfa contêm as mesmas classes de lípidos, mas as suas percentagens pode variar em cada tipo de lipoproteínas.

A análise de lipoproteínas é baseada nas suas diferentes propriedades químicas e físicas:

|               | Mobilidade electroforética |        |          |        |                                      |               |
|---------------|----------------------------|--------|----------|--------|--------------------------------------|---------------|
| Ânodo (+)     | Pré-alfa                   | Alfa   | Pré-beta | Beta   | Quilomicrons<br>(ponto de aplicação) | Cátodo (-)    |
| Densidade     | Ácidos gordos livres       | HDL    | VLDL     | LDL    |                                      | Densidade     |
| Colesterol    |                            | 20%    | 10-40%   | 45%    | 2-5%                                 | Colesterol    |
| Triglicéridos |                            | 1-5%   | 40-60%   | 10-12% | 80-90%                               | Triglicéridos |
| Fosfolípidos  |                            | 26%    | 22%      | 22%    | 2-5%                                 | Fosfolípidos  |
| Proteínas     |                            | 45-50% | 10-5%    | 10-5%  | 1-2%                                 | Proteínas     |

A electroforese em gel de agarose em pH alcalino das fracções isoladas separa as lipoproteínas em: alfa, beta, pré-beta, quilomicrons e pré-alfa.



**Figura 30** – Gráfico normal de uma electroforese de lipoproteínas e respectivas fracções.

2. *Método*

As lipoproteínas são separadas nas tiras de gel de agarose de acordo com a sua carga eléctrica. A mobilidade electroforética das fracções das lipoproteínas é determinada pelas cargas terminais e laterais das apoproteínas e também pela carga eléctrica dos fosfolípidos. As bandas de lipoproteínas são reveladas através da coloração com a solução alcalina que contém *negro de Sudão*.

3. *Interpretação de resultados*

A electroforese de lipoproteínas permite caracterizar algumas situações anormais de distribuição das mesmas, podendo ser classificadas em hipolipoproteinémias e hiperlipoproteinémias.

(a) *Hipolipoproteinémias*

▪ *Hipobetalipoproteinémia*

É uma patologia rara, de carácter hereditário, e que resulta na diminuição dos níveis de colesterol e fosfolípidos.

▪ *Abetalipoproteinémia*

É uma patologia hereditária caracterizada por uma marcada e grave deficiência em quase todos os lípidos excepto as alfa-lipoproteínas.

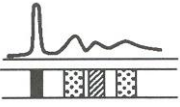
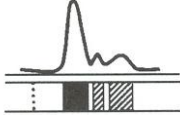
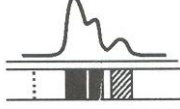
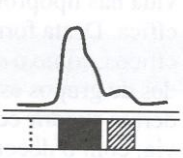
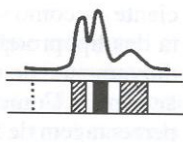
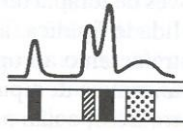
▪ *Diminuição de alfa-lipoproteínas*

A diminuição marcada desta classe de lipoproteínas é observada em doenças hepáticas como a doença hepática parenquimatosa.

A doença de Tangier é uma condição genética rara, na qual as alfa-lipoproteínas estão completamente ausentes em indivíduos homozigóticos, enquanto heterozigóticos apresentam níveis baixos.

(b) *Hiperlipoproteinémias*

A electroforese de lipoproteínas é usada para classificar as hiperlipoproteinémias de acordo com os 5 fenótipos estabelecidos de *Fredrickson e Lees*.

| TIPO                                     | COLESTEROL                         | TRIGLICÉRIDOS           | LIPOPROTEÍNAS   | COMENTÁRIOS   | CAUSAS SECUNDÁRIAS   |
|--|------------------------------------|-------------------------|---|---|--|
| <b>I</b><br><i>Raro</i>                  | Ligeiro aumento<br>(20% do normal) | Aumento<br>pronunciado  |    | <i>Aumento dos quilomicrons<br/>Pré-beta normal ou com ligeiro aumento<br/>Diminuição de beta e alfa</i>                                      | Disglobulinémia<br>Diabetes Mellitus<br>Pancreatite  |
| <b>IIa</b><br><i>Comum</i>               | Aumento<br>pronunciado             | Normal                  |    | <i>Aumento pronunciado de beta<br/>Pré-beta normal ou diminuída<br/>Alfa normal<br/>Quilomicrons normais</i>                                  | Hipotiróidismo<br>Síndrome Nefrótico<br>Obstrução biliar<br>Disglobulinémia<br>Dieta com alto teor de colesterol                                   |
| <b>IIb</b><br><i>Provavelmente comum</i> | Aumento<br>(geralmente)            | Aumento                 |    | <i>Aumento de beta<br/>Aumento de pré-beta<br/>Alfa Normal<br/>Quilomicrons normais</i>   | Iguais às do tipo IIa<br>Gota  |
| <b>III</b><br><i>Pouco frequente</i>     | Aumento (20% do normal)            | Aumento (10% do normal) |  | <i>Aumento de Beta ("Beta larga" em 2/3 dos casos)<br/>Pré-beta normal ou ligeiramente aumentada<br/>Alfa normal<br/>Quilomicrons normais</i> | Diabetes Mellitus<br>Hepatopatia<br>Hipotiróidismo   |
| <b>IV</b><br><i>Mais comum</i>           | Aumento (20% do normal)            | Aumento                 |  | <i>Aumento moderado ou pronunciado de pré-beta<br/>Beta e alfa normais ou ligeiramente reduzidas<br/>Quilomicrons normais</i>                 | Hipotiróidismo<br>Síndrome nefrótico<br>Gravidez<br>Estrogénios<br>Diabetes Mellitus<br>Pancreatite<br>Disglobulinémia<br>Álcool<br>Urémia<br>Gota |
| <b>V</b><br><i>Pouco frequente</i>       | Aumento (4% do normal)             | Aumento                 |  | <i>Aumento dos quilomicrons<br/>Aumento de pré-beta<br/>Diminuição de beta e alfa</i>   | Pancreatite<br>Álcool<br>Diabetes Mellitus<br>Disglobulinémia  |

## *Urianálise*

### *A. Análise de Urina tipo II*

#### *1. Introdução*

A análise à urina é, normalmente, um dos primeiros testes num doente com suspeita de patologia renal. A Urina tipo II consiste no estudo das suas características físico-químicas e exame citológico de sedimento. A amostra é a primeira da manhã e tem os seguintes elementos:

- Caracteres gerais
- Elementos químicos
- Exame microscópico

#### *2. Método*

Para a determinação semi-quantitativa de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue na urina, é utilizado o analisador URISYS 2400. Este analisador utiliza tiras de teste com os parâmetros anteriormente assinalados e faz uma leitura colorimétrica.

Após a passagem por este sistema, todas as urinas com aspecto turvo e com reacção positiva para leucócitos e eritrócitos são seleccionadas para serem centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Após a centrifugação são observadas ao microscópio.



*Figura 31* – Sistema Roche Urisys 2400 para Urinas tipo II

*Princípio dos testes utilizados pelo sistema Urisys 2400:*

- **pH** - A zona de teste contém os indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol, que reagem especificamente com os iões  $H^+$ . Os valores de pH mais frequentes da urina recente de indivíduos saudáveis variam entre 5 e 6.
- **Leucócitos** – O teste revela a presença de esterases leucocitárias. Estas esterases decompõem um éster indoxílico em indoxil, que reage com um sal de diazónio, produzindo um corante violeta. A reacção não é afectada pela presença de bactérias, tricomonas ou eritrócitos na urina.
- **Nitritos** - O teste é baseado no princípio da prova de Griess e é específico para nitritos. A reacção revela a presença de nitritos e, indirectamente de bactérias produtoras de nitritos na

urina, através de uma coloração rosa-vermelha da zona de teste. Uma ligeira coloração rosa indica bacteriúria significativa.

- **Proteínas** - O teste baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. A reacção é particularmente sensível à albumina. A quinina, quinidina, cloroquina, tolbutamida e um pH elevado (ate pH 9) não exercem influência sobre o teste.
- **Glucose** - A determinação da glucose é baseada na reacção específica da oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste é independente do pH e da gravidade específica da urina e não é afectado pela presença de corpos cetónicos.
- **Corpos cetónicos** – O teste baseia-se no princípio da prova de Legal. A sensibilidade para o ácido acetoacético é superior á da acetona.
- **Urobilinogénio** - Um sal de diazónio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogénio, originando um corante azóico vermelho. O teste é específico para urobilinogénio e não está sujeito aos conhecidos factores de interferência da prova de Ehrlich.
- **Bilirrubina** – O teste baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazónio. Uma coloração ligeiramente cor-de-rosa já constitui um resultado positivo ou seja, patológico. Outros constituintes da urina produzem uma coloração amarela de intensidade variável.
- **Sangue** – A acção semelhante à peroxidase, da hemoglobina e da mioglobina catalisa especialmente a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona de teste, originando uma coloração azul-esverdeada.
- **Zona de compensação** - Esta zona branca, que não contém reagentes, permite uma compensação, por parte do analisador, para a cor intrínseca da urina para, relativamente aos parâmetros leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubina.

### 3. *Interpretação*

#### *i* **Cor**

De acordo com a classificação de Vogel, as cores 1 a 3 são normais e indicam a presença de pigmentos normais, tais como: urocromo, porfirinas, uroeritrina e urobilinogénio.

No entanto, as restantes cores considerem-se patológicas:

- **Cor 4** – amarelo-alaranjado – indica a presença de excesso de urobilinogénio e pode provir de um doente com icterícia.
- **Cor 5** – amarelo-acastanhado – o urobilinogénio passa a urobilina e aparece em doentes hepáticos. Esta cor também pode estar presente quando há restos de menstruação.
- **Cor 6** – amarelo - hematúria
- **Cor 7** – vermelho - hematúria
- **Cor 8** – acastanhado – hematúria
- **Cor 9** – preta – devido a porfirinas, melanina e ácido homogentísico característico da alcaptonúria.

#### *ii* **pH**

O pH normal da urina é de 5.0-6.0. Valores acima de 6.0 surgem na alcalose ou, raramente, quando o mecanismo de acidificação do rim falha.

As infecções por algumas bactérias, como o *Proteus*, alcalinizam a urina.

#### *iii* **Densidade**

A densidade é importante por várias razões:

1. Trata-se de um parâmetro de avaliação da função tubular renal;
2. A incapacidade de concentrar urina pode acompanhar certas doenças com função tubular relativamente normal, como a Diabetes Insípida, hipertiróidismo grave ou anemia falciforme.

3. Afecta outros exames à urina.

O valor normal deve ser entre 1,020 a 1,025. No entanto, podemos ter:

- >1,035 – tumores secretores de ADH;
- 1,030 – desidratação, perda de líquidos;
- 1,015-1,010 – aumento da toma de líquidos
- <1,010 – administração de diuréticos ou ausência de ADH.

**iv**     Aspecto

O aspecto deve ser límpido. Pode, no entanto, haver turvação quando há leucócitos ou células em suspensão. Nas mulheres, a urina pode estar ligeiramente turva devido a contaminação vaginal.

**v**       Glucose

A glucose na urina deve ser negativa, pois caso apareça podemos estar perante uma situação anormal. Na maioria dos casos a glucose aumentada na urina é consequência de hiperglicémia temporária, mas por vezes a sua excreção se deve a defeitos tubulares. Embora exista uma relação grosseira entre a glicémia e a glicosúria, não se recomenda o seu doseamento para monitorizar a diabetes. A glicosúria não tem sensibilidade para detectar precocemente a Diabetes Mellitus (DM) porque o limiar de reabsorção do rim é de 180 mg/dl, muito superior ao limite superior de diagnóstico da DM.

Nas crianças, o teste não detecta a eliminação de outros açúcares como a galactose ou a frutose que pode estar elevada em perturbações congénitas do metabolismo. O ácido ascórbico dá resultados falsos negativos.

**vi**      Proteínas

- a. Em condições normais, a membrana glomerular impede a passagem da maior parte das moléculas proteicas grandes do sangue para a urina. Todavia, uma pequena quantidade é filtrada, e uma fracção desta é reabsorvida pelos túbulos sendo o restante excretado. Essas quantidades não são normalmente detectadas pelos métodos de rotina.

**vii**     Corpos cetónicos

Os corpos cetónicos incluem o ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, ácido acetoacético e a acetona.

A obtenção de um resultado positivo na urina é pouco frequente e, em geral, indica um acentuado excesso de cetonas. Este excesso é frequentemente devido à acidose metabólica grave, cujo exemplo clássico é a acidose diabética.

**viii**    Nitritos

Muitas bactérias, como por exemplo o *Proteus mirabilis*, produzem uma enzima denominada redutase que tem a capacidade de produzir os nitratos urinários a nitritos. Um resultado positivo pode indicar a presença de uma infecção. No entanto, pode ser negativo e existir infecção pois nem todas as bactérias as possuem, como por exemplo o *Enterococcus faecalis*.

**ix**      Urobilinogénio

Este é um produto de degradação da bilirrubina conjugada. O urobilinogénio aumenta em consequência de um aumento acentuado da produção secundária à elevação do nível sérico de bilirrubina não-conjugada (geralmente devido a processos hemolíticos) ou em consequência da incapacidade das células parenquimatosas do fígado de metabolizar quantidades anormais de urobilinogénio absorvidas pelo intestino (geralmente devido a cirrose ou hepatite viral).

**x Exame microscópico do sedimento**

Ao observar o sedimento urinário ao microscópico podemos ter como principais elementos:

**x.i Leucócitos**

As contagens superiores a 5 leucócitos por campo são consideradas anormais e sugerem inflamação renal ou do trato urinário. Na ausência de bactérias, as causas mais comuns são a Urolitíase, tuberculose, nefrites intersticiais, rim poliquístico e necrose da papila renal.

A observação concomitante de cilindros leucocitários indica que a infecção é de origem renal.

**x.ii Eritrócitos**

O valor normal pode ir até 2 eritrócitos por campo.

Ao observar um valor elevado de eritrócitos poderemos estar perante:

- *Causas não-patológicas:*
  - ✓ Exercício físico intenso
  - ✓ Contaminação menstrual
- *Causas patológicas*
  - ✓ Tumores renais ou do trato urinário
  - ✓ Necrose da papila renal
  - ✓ Traumatismo
  - ✓ Distúrbios da coagulação
  - ✓ Infecção do trato urinário
  - ✓ Urolitíase
  - ✓ Nefrite intersticial
  - ✓ Rins poliquísticos

A hematúria de origem renal caracteriza-se por hemácias dismórficas.

**x.iii Células**

Existem três tipos diferentes: Escamosas, Transição, Renal.

|  |   |
|--|---|
| <b>Células epiteliais escamosas</b>                  | Encontram-se na vagina, uretra e trígono feminino, zona perineal. Podem-se encontrar algumas células escamosas no exame a fresco e servem para ajudar a focar o microscópio. A sua presença não tem qualquer significado e apenas significa contaminação.   |
| <b>Células transicionais (epitélio de transição)</b> | São células do epitélio que reveste todo o tracto urinário, desde a pélvis até à base da bexiga. São células esféricas e de núcleo central e oval. Estas células incham com a água e tornam-se esféricas, como um balão. A urina de pessoas normais pode conter algumas destas células, e o seu número está aumentado em infecções sendo vistas juntamente com PMN. |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Células epiteliais renais</b> | São células dos tubos renais que podem ser observadas em urinas normais, mas um nº aumentado, > de 15, permite suspeitar fortemente de doença renal activa ou de lesão tubular. Estas células são pequenas, ovóides, com núcleo oval e excêntrico, não absorvem água e mantêm a sua forma ovóide. |
|----------------------------------|---|

x.iv Cilindros

Os cilindros são formados por gel dos túbulos renais cuja matriz orgânica básica é a proteína de Tamm-Horsfall, originária das células tubulares renais. São classificados de acordo com a forma, tamanho e conteúdo, e a identificação dos diferentes tipos traduz as alterações parenquimatosas renais e a origem renal dos elementos aí contidos.

Classificação dos cilindros:

| <b>Tipo</b>         | <b>Morfologia/Composição</b>   | <b>Significado</b>                              |
|---------------------|--|---|
| <i>Hialino</i>      | Homogéneo, cilíndrico, formado por proteínas de Tamm-Horsfall                      | Estase urinária                                 |
| <i>Granuloso</i>    | Cilíndrico com partículas finas relativamente refringente                          | Lesão tubular inespecífica, em geral patológica |
| <i>Leucocitário</i> | Cilindro hialino com leucócitos no interior  | Infecção renal (pielonefrite)                   |
| <i>Hemático</i>     | Inclusão de hemácias, cor de ferrugem  | Glomerulonefrite, nefrite intersticial          |
| <i>Epitelial</i>    | Cilindro hialino com células tubulares   | Lesão tubular                                   |
| <i>Céreo</i>        | Homogéneo, opaco, degeneração das margens com indentação, extremidades irregulares | Lesão tubular, insuficiência renal              |
| <i>Lípido</i>       | Transparente, com inclusão de gotas lípidicas                                      | Síndrome nefrótico                              |
| <i>Largo</i>        | Granuloso ou céreo com grande diâmetro   | Origem no ducto colector, insuficiência renal   |

x.v Cristais

Os cristais podem constituir uma evidência de formação de cálculos e da presença de certas doenças metabólicas. Os cristais tendem a ser dependentes do pH. Os cristais mais vulgares de aparecer, ou os mais importantes a ter em consideração, são os seguintes

(a) *Urina ácida*

- Cristais de ácido úrico
- Cristais de oxalato de cálcio
- Cristais de cistina
- Granulações de uratos amorfos

(b) *Urina alcalina*

- Cristais de fosfato triplo de amónio e magnésio
- Granulações de fosfatos amorfos

x.vi *Células de adipócitos*

São células grandes, cujo citoplasma está ocupado quase na totalidade por um grande vacúolo cheio de lípidos. Estão sempre acompanhados por grânulos lípidicos e/ou cristais de colesterol. Não se observam em indivíduos normais e estão relacionados com a obstrução ou ruptura dos vasos linfáticos, os quais vertem o seu conteúdo para fora destas vias.

## **B. Contagem de Addis**

### *1. Introdução*

Fornece valores precisos dos elementos presentes na urina com o volume urinário conhecido, volumes exactos de amostra e com o emprego de câmara de contagem (Neubauer).

### *2. Método*

- Colher a urina durante 12 horas seguidas – por exemplo, das oito da noite (despreze-se esta) às oito da manhã, inclusive;
- Misturar e medir o volume total; transferir 10 ml da mistura para um tubo especial;
- Centrifugar a 2.000 rpm., durante 5 minutos;
- Decantar a urina sobrenadante e ajustar o volume de sedimento obtido, com solução fisiológica (NaCl 0,9%), para 1 a 5 ml, dependendo da quantidade do resíduo visível no fundo do tubo; mistura-se até homogeneizar;
- Colocar uma gota desta mistura na câmara de Neubauer e contar o número de hemácias, cilindros e leucócitos em toda a área reticulada, o que fornecerá o número destes elementos em 0,0009 ml.
- O número de cilindros (ou outro elemento) eliminado em 12 horas é obtido aplicando-se a seguinte fórmula:

$$S/v \times n \times V/10 = \text{cilindros ou elemento contado}$$

Nesta fórmula, V representa o volume de urina em 12 horas; 10, o número de mililitros centrifugado; S é o volume no qual o sedimento foi diluído (1 a 5 ml); n é o número total de cilindros (ou outros elementos) contados; e v é o volume no qual a contagem foi feita.

**Exemplo:** Sedimento diluído para 2 ml: S = 2; contagem feita em 0,0009 ml: v = 0,0009; número de piócitos contados – 10: n = 10; volume urinário de 12 horas: 500; V = 500; temos, portanto;

$$2/0,0009 \times 10 \times 500/10 = 1.111.000 \text{ piócitos/12h}$$

### *3. Interpretação de resultados*

São considerados normais os seguintes números de cada uma das estruturas eliminadas em 12 horas:

- Cilindros hialinos – até 5.000
- Hemácias – até 500.000
- Piócitos – até 1.000.000

Contagens acima destes valores são verificadas em lesões renais, especialmente na glomerulonefrite, condição na qual esta contagem é de grande valor prognóstico. O número de hemácias e cilindros pode alcançar cifras elevadíssimas, da ordem de milhões.

## **C. Pesquisa de drogas de abuso**

### **1. Introdução**

#### ***i* Anfetaminas**

As Anfetaminas são uma família de aminas simpaticomiméticas cujos efeitos biológicos incluem uma potente estimulação do Sistema Nervoso Central. Possuem igualmente, propriedades anorécticas, hipertérmicas e cardiovasculares. São normalmente tomadas na sua forma oral, intravenosa ou inalação do fumo, e são absorvidas rapidamente após absorção. As anfetaminas aumentam o ritmo cardíaco e pressão sanguínea e suprimem o apetite.

Alguns estudos indicam que o forte abuso pode resultar em danos permanentes para determinadas estruturas nervosas do cérebro.

#### ***ii* Barbituratos**

Os Barbituratos representam uma classe muito comum de depressivos do sistema nervoso central. Estes são usualmente administrados por via oral, mas nalgumas ocasiões também são injectados por via intramuscular ou intravenosa. Antes da inactivação do composto no fígado, 30-40% deste liga-se às proteínas plasmáticas, a restante parte é distribuída por vários tecidos. Os Barbituratos variam desde os de acção rápida (aproximadamente 15 min., como o pentobarbital e secobarbital) aos de acção longa (24 horas ou mais, como o fenobarbital). Os Barbituratos de acção curta são completamente metabolizados no organismo, enquanto os Barbituratos de acção longa são secretados primariamente sem modificações.

#### ***iii* Benzodiazepinas**

As Benzodiazepinas (BZD) constituem uma classe de fármacos que são usados terapêuticamente como ansiolíticos, anti-convulsionantes e sedativos hipnóticos. Estando sujeitas ao abuso, tolerância e dependência, estes agentes estão entre as mais frequentes prescrições medicamentosas encontradas nas análises toxicológicas. Após absorção intravenosa ou oral, existe uma rápida absorção inicial das benzodiazepinas pelo cérebro e outros órgãos de maior irrigação. Subsequentemente, ocorre uma fase de redistribuição nos tecidos que são menos irrigados, especialmente músculos e gordura. As Benzodiazepinas são usualmente administradas por via oral e são metabolizadas no fígado.

#### ***iv* Cocaína**

A cocaína, um derivado das folhas da planta de coca, é um potencial estimulante do sistema nervoso central e um anestésico local. De entre os efeitos psicológicos induzidos pelo uso da cocaína, salienta-se a euforia, auto confiança e sensação de aumento de energia, acompanhado de um aumento do ritmo cardíaco, dilatação das pupilas, febre, tremores e sudação. A cocaína é excretada na urina primariamente como benzoilecgonina, num curto período de tempo. A Benzoilecgonina possui uma vida média biológica de 5 a 8 horas, que é muito mais longa do que a cocaína (0.5 a 1.5 horas), e pode geralmente ser detectada após 24 a 60 horas de uso ou exposição a esta droga.

#### ***v* THC (canabinóides)**

A Marijuana é um agente alucinogénico derivado da porção florida da planta do cânhamo. Fumar é o método primário de utilização da marijuana/cannabis. O abuso desta droga, utilizando doses superiores, produz efeitos ao nível do sistema nervoso central, alteração do

humor e percepções sensoriais, perda de coordenação, alteração da memória, ansiedade, paranóia, depressão, confusão, alucinações e aumento do ritmo cardíaco.

Quando a marijuana é ingerida, a droga é metabolizada pelo fígado, o metabolito urinário da marijuana é o ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocanabinol-9-hidroxicilo e o seu glucuronido. Isto significa que a detecção de canabinóides incluindo o seu metabolito carboxil, indica o consumo de marijuana/cannabis.

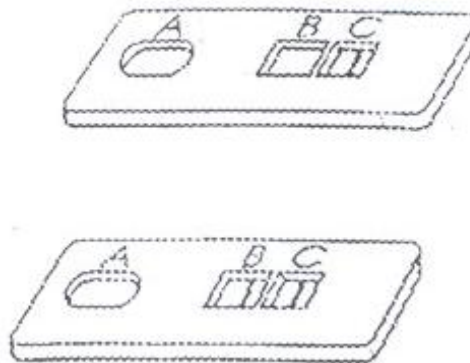
*vi*      **Morfina/Opiáceos**

Os opiáceos, tais como a heroína, morfina e codeína, são derivados de uma resina de ópio da papoila. A heroína é rapidamente metabolizada em morfina. Assim, a morfina e o glucuronido da morfina podem ser encontrados na urina de uma pessoa que tomou unicamente heroína. O organismo humano também transforma codeína em morfina. Por consequência, a presença na urina de morfina (ou o seu metabolito glucuronido, indicam a utilização de heroína, morfina e/ou codeína).

2.      ***Método***

Este teste para as moléculas anteriormente mencionadas é um imunoensaio de um só passo no qual a droga quimicamente marcada (droga conjugada) compete com a droga que poderá estar presente na urina, para os mesmos sítios de ligação do anticorpo. O Dispositivo teste consiste numa tira membrana com droga conjugada na banda teste, acondicionada num alojamento de plástico.

Um controlo ou banda de referência (C) com uma diferente reacção antigénio-anticorpo é igualmente adicionada na tira de membrana imunocromatográfica para indicar se o teste é efectuado correctamente. Esta linha corada de controlo deve ser sempre visível, independentemente da presença ou não da droga ou seu metabolito. Isto significa que uma urina positiva produz sempre duas bandas de cor, enquanto uma urina negativa produz somente uma banda controlo corada.



**Figura 32** – Exemplo do método usado

## *Exame de Fezes*

### *A. Sangue oculto*

#### *1. Método*

O teste usado é teste rápido imunocromatográfico qualitativo para detecção de sangue oculto nas fezes, nos casos de suspeita de carcinoma colorectal. O método utiliza uma combinação única de corante monoclonal conjugado e uma fase sólida de anticorpos policlonais para identificarem selectivamente a Hemoglobina Humana com uma alto grau de sensibilidade e especificidade.

#### *2. Interpretação de resultados*

A pesquisa de sangue oculto tem como objectivo a pesquisa de hemorragias a nível GI, e como rastreio de neoplasias, especialmente do cólon.

A presença de sangue nas fezes pode ser devida a várias causas além da hemorragia colonrectal, tais como, hemorróidas, fissura anal e hematúria. Nestes casos, as fezes podem aparecer de cor vermelho-vivo.

Nas lesões superiores, normalmente, o sangue não é detectado macroscopicamente devido à digestão, pelo que as fezes têm uma aparência negra – melena. No entanto, em pequenas hemorragias a cor não se altera significativamente, passando despercebida numa eventual hemorragia. É nestas situações que se deve pesquisar o sangue oculto.

O teste é positivo quando na presença de hemoglobina, o que não exclui a presença de uma dieta rica em carne, dando origem a falsos positivos. Este é um dos problemas principais do teste.

A pesquisa também pode ser positiva devido a neoplasias do trato GI (especialmente do cólon), úlceras intestinais, colite ulcerosa, trombose venosa das veias mesentéricas e outras. Há que ter em conta também alguns fármacos tais como os salicilatos que originam perdas a nível gástrico.

## *Análise de Esperma*

### *A. Espermograma*

#### *Introdução*

A execução de um espermograma tem como finalidade principal:

- Avaliação das glândulas seminais;
- Avaliação da fertilidade;
- Monitorização pós-vasectomia.

Este exame é essencial na investigação da infertilidade masculina, porém, não é considerado um teste de fertilidade.

A análise base deste teste utiliza:

- Medida do volume, pH e avaliação da cor
- Observação do tempo de liquefacção e viscosidade
- Contagem do nº de espermatozoides, avaliação da motilidade e morfologia
- Observação semi-quantitativa de leucócitos, eritrócitos e outros elementos relevantes.

#### *1. Método*

##### *i Colheita*

A recolha da amostra é um dos passos essenciais para a obtenção de um bom resultado. Assim sendo o paciente deve seguir à risca as instruções dadas pelo laboratório. A colheita deverá ser feita no laboratório e para um reservatório estéril.

##### *ii Procedimento laboratorial*

###### *(a) Exame macroscópico*

**1. Medição do Volume:** Normal de 2 a 5 ml

**2. Tempo de Liquefacção e Viscosidade:**

O coágulo seminal sofre liquefacção 5-25 minutos após a colheita. Este passa de um estado gelatinoso, com aspecto heterogénio e espesso a um estado liquefeito, muito fluido e homogénio, na maioria dos casos. Um esperma fluido na emissão significa geralmente uma azoospermia que no entanto tem de ser confirmada. O tempo que demora a liquefazer-se designa-se por *Tempo de Liquefacção* e é possível de ser medido se a colheita for feita no laboratório.

Após a liquefacção é feita a avaliação da viscosidade e é feita com uma pipeta. Se o esperma cair gota-a-gota é considerado normal. Um esperma muito viscoso pode indicar a presença de uma infecção ou um processo imunológico.

**3. Aspecto e Cor:**

Após a liquefacção o esperma transforma-se num líquido homogéneo, branco amarelado, opaco e viscoso.

**4. pH**

O Ph do esperma é o resultado da mistura das secreções das vesículas seminais e das secreções prostáticas. As seminais produzem uma secreção com Ph elevado, acima de 8,0. O líquido prostático tem o Ph ácido que pode variar entre 5,0 e 6,0.

Assim o pH do esperma está entre 7 a 8 (Reacção neutra a alcalina).

Um pH elevado pode sugerir uma infecção e um pH baixo pode levar à suspeita de um processo obstrutivo.

(b) *Exame Microscópico*

### **1. Exame Inicial Qualitativo**

É feito logo após a liquefação do esperma e boa homogeneização do material.

Esta observação inicial serve *para ter ideia da concentração de espermatozoides*. Os espermatozoides são elementos móveis constituídos por uma cabeça ovóide de 6 a 7 micra à qual está fixado um flagelo muito fino com cerca de 50 micra de comprimento.

Caso não sejam observados espermatozoides, nesta fase, antes de determinar a Azoospermia, deve centrifugar-se toda a amostra de esperma a 3000 rpm durante 15 a 20 min. O sobrenadante é retirado e o sedimento homogeneizado é observado entre lamina e lamela, e todos os campos do microscópio devem ser observados. Se não for encontrado nenhum espermatozoide ou células jovens, dá-se o diagnóstico de *Azoospermia* ou de forma mais ampla designar como Azoocitospermia.

*Um exame Normal revela:* raras células epiteliais e os leucócitos têm um nº compreendido entre 500 e 2000 por mm<sup>3</sup> (ou seja 0,5 a 2% do valor dos espermatozoides)

*Um exame considerado Patológico revela :* numerosas hemácias e leucócitos em excesso.

Para além da observação de espermatozoides, espermátides, leucócitos e hemácias deve-se pesquisar também a presença de outros elementos patológicos, tais como, *Trichomonas vaginalis* e elementos leveduriformes.

### **2. Contagem**

A contagem é feita em câmara hemocitométrica de Neubauer e é normal um valor de 60.000 a 120.000 espermatozoides por ml.

É recomendado fazer uma inativação prévia dos espermatozoides, separando cerca de 0,05ml do esperma muito bem homogeneizado, para tubo de hemólise e colocar a 56°C durante 5 min. Após isto, transferir 10 a 15 microlitros da diluição do esperma com soro fisiológico, para o centro da câmara, cobrir com a lamela e contar em 5 quadrados ( o central e os 4 laterais).

Para concentrações aproximadamente de 20x10<sup>6</sup> e 40x10<sup>6</sup> espermatozoides por ml o esperma é diluído a 1/40 ou 1/50, para contagens inferiores diluir a 1/10 ou 1/20.

Calcular da seguinte forma o nº de espermatozoides/ml:

$$\frac{N^{\circ} \times 10.000 \times \text{Inverso da diluição}}{N^{\circ} \text{ de Quadrantes contados}}$$

Em que N° = número de espermatozoides contados

### **3. Mobilidade**

A avaliação da mobilidade é feita logo após a liquefação do esperma, para que não haja uma subvalorização dos espermatozoides imóveis.

Normalmente os espermatozoides devem ter movimentos relativamente rápidos com um avanço regular. Anormalmente a sua mobilidade é nula ou muito lenta ou ainda excessiva (movimentos desordenados).

A mobilidade é classificada em 4 categorias diferentes:

- Mobilidade progressiva, linear e rápida
- Mobilidade progressiva lenta
- Mobilidade não-progressiva

- Imóveis

O valor normal é de, no mínimo, 50% com mobilidade e 25% com mobilidade rápida e progressiva

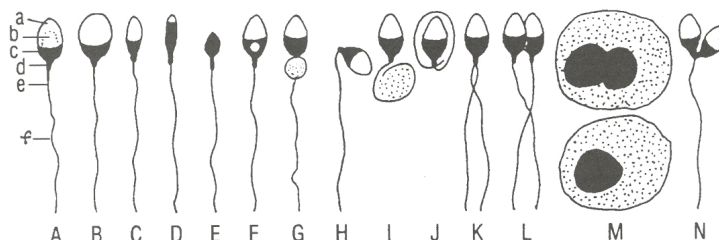
#### 4. Morfologia

A par das avaliações da mobilidade e da concentração de espermatozoides, a morfologia tem o papel de completar a tríade de maior relevância na avaliação da qualidade espermática. A morfologia ideal seria a feita de material não corado e não fixado, no entanto é necessário que as análises sejam feitas com esfregaços secos, fixados e corados.

O ponto de partida para determinar se a morfologia é normal, é conhecer toda a anatomia do espermatozoide.

Os espermatozoides devem ter uma cabeça oval lisa, com área cromossômica bem definida, ocupando 40 a 70% da área da cabeça, ou cabeça levemente afilada na área cromossômica e o flagelo fino, bem delimitado, em prolongamento da cabeça.

Um espermatozoide **normal não apresenta nenhuma anormalidade de cabeça, peça intermediária e cauda**. Anormalmente a cabeça poderá ser piriforme, deformada, aumentada ou diminuída em volume; o flagelo será em ângulo recto com a cabeça, espessa, dupla ou forçado.



**Figura 33** – Exemplos de alterações morfológicas de espermatozoides. O espermatozoide com a letra A é considerado normal.

Os tipos morfológicos anormais prevalentes são agrupados em 4 formas principais:

- **Defeitos da cabeça** – macrocéfalos, microcéfalos, fusiformes, piriformes, redondos, amorfos, vacuolizados, bicéfalos, mistos, etc.
- **Defeitos na peça intermédia** – inserção assimétrica, filamentar, irregulares, mistas, etc.
- **Defeitos na cauda** – curtas, múltiplas, curvas, quebradas, enroladas, irregulares, mistas, etc.

**Um bom espermatozoide tem pelo menos 40% de formas anormais.**

## **Imunologia**

### **A. Introdução**

A esta secção do laboratório chegam vários tipos de amostras para proceder à respectiva análise. Dentro destas temos o tubo de gel de soro e, nalguns casos, urinas. Na triagem de produtos, os tubos de gel destinados às provas de imunologia são centrifugados a 3500 rpm durante 15' e posteriormente distribuídos pelos vários sistemas automáticos. Cada doente tem apenas um tubo de gel destinado para a imunologia, o qual é utilizado em primeiro lugar nos sistemas automáticos e posteriormente segue para as técnicas manuais.

A secção de Imunologia de Labamaro é constituída pelos seguintes elementos: uma Técnica Superior de Análises e três Técnicas de Análises Clínicas. As três técnicas estão distribuídas da seguinte maneira: 2 nos sistemas automáticos e triagem e 1 nas técnicas manuais, imunofluorescência e micro-ELISA.

As Técnicas de Análises Clínicas (TAC) têm como responsabilidade a recepção dos seus tubos vindas da triagem, proceder à organização dos mesmos, encaminhá-los para os sistemas automáticos, a manutenção dos seus aparelhos, a execução do controlo de qualidade interno e avaliação externa da qualidade, execução analítica das amostras, após fazer sair as listas de trabalho e verificar os produtos em falta. As TAC dos sistemas automáticos trabalham em conjunto com o aparelho Bayer Advia Centaur e os dois aparelhos Immulite 2000.

A Técnica Superior de Análises tem como função a organização, coordenação da secção, tomar nota das ocorrências durante o trabalho e auxiliar as técnicas quando necessário. No início do trabalho procede à avaliação dos resultados do controlo de qualidade e, caso haja algum problema de carácter técnico tem como responsabilidade o contacto com os representantes do sistema em causa para resolução do mesmo. Após a saída das listas de trabalho finais e a execução analítica, cabe à Técnica Superior a validação técnica dos vários resultados obtidos. A observação ao microscópio de fluorescência é executada exclusivamente pela técnica superior.

Aos especialistas em Análises Clínicas cabe a validação biopatológica de processos e contacto com os clínicos prescritores e doentes quando aplicável. O controlo de qualidade externo, depois da obtenção dos resultados na secção, é avaliado pelo Director Técnico.

## *Sistemas Automáticos de Imunologia*

Tal como foi dito anteriormente na introdução deste relatório, a secção de imunologia de Labamaro agrupa uma série de auto-analisadores. Os vários parâmetros doseados estão distribuídos pelos seguintes sistemas:

- Bayer Advia Centaur
- DPC Immulite 2000
- Sistema de micro-ELISA da Sorin

Os vários testes realizados podem ser distribuídos pelas seguintes áreas de estudo:

- Endocrinologia
- Alergologia
- Marcadores de Anemia
- Marcadores Tumoriais
- Serologia Infecciosa
- Monitorização terapêutica

### *A. Sistemas Automáticos*

#### **A1. Sistema Bayer Advia Centaur**



*Figura 34 – Sistema Advia Centaur*

Este sistema utiliza a quimioluminescência directa nas suas determinações. O *pack* de reagente é constituído por uma fase líquida e uma fase sólida. A fase sólida é constituída por partículas magnéticas revestidas contidas no reagente. Os resultados quantitativos ou semi-quantitativos obtêm-se por extrapolação das curvas de calibração em memória. Nos doseamentos dos vários analitos, este aparelho utiliza vários tipos de imunoensaios:

- **Imunoensaio competitivo** – doseamentos que usam este tipo de ensaio:
  - ✓ Cortisol
  - ✓ Progesterona
  - ✓ Testosterona
  - ✓ Digoxina

- ✓ Ácido Valpróico
- **Tipo Sanduíche** – doseamentos que usam este tipo de ensaio:
  - ✓ iPTH
  - ✓ Ferritina
  - ✓ IgE específica
  - ✓ Anticorpos anti-HCV
  - ✓ Anticorpos anti-HIV
  - ✓ Anticorpos anti-HAV
- **Tipo Imunocaptura** – doseamentos que usam este tipo de ensaio:
  - ✓ Anticorpo anti-HBc IgM
  - ✓ Anticorpo anti-HAV IgM

## **A2. Sistema DPC Immulite 2000**

O sistema Immulite 2000 é um analisador que permite a realização de ensaios imunométricos de vários tipos por quimioluminescência. O reagente é constituído por uma fase sólida (pérola de poliestireno coberta por anticorpos) e uma fase líquida. A pérola funciona como reservatório para a reacção imunológica, incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal de leitura. Os resultados das amostras obtêm-se por extrapolação da curva de calibração.



*Figura 35 – Sistema Immulite 2000*

Este aparelho executa diversas provas:

|  |  |
|--|--|
| <i>Painel da Tiróide</i>                           | TSH, T3 Total, T3 Livre, T4 total, T4 livre e Anticorpos Antitiróideos         |
| <i>Painel de Fertilidade</i>                       | FSH, LH, Prolactina, Estradiol e Beta-HCG                                      |
| <i>Hormonas da função Adrenal</i>                  | ACTH   |
| <i>Hormonas da função Gastrointestinal</i>         | Insulina   |
| <i>Imuno-alergologia</i>                           | IgE total, Phadiotop e IgE específicas   |
| <i>Diagnóstico Pré-Natal</i>                       | PAPP-A, Beta-HCG livre, Alfa-fetoproteína, Beta-HCG e Estriol Livre            |
| <i>Marcadores de anemia e metabolismo do ferro</i> | Vitamina B12 e Ácido Fólico  |
| <i>Marcadores tumorais</i>                         | PSA, PSA livre, CEA, CA125, CA 19.9, CA 15.3 e Alfa-fetoproteína               |
| <i>Serologia infecciosa</i>                        | Ag HBs, Ac HBs, Ac HBc, Ac anti-Rubéola, Ac anti-Toxoplasmose, Ac anti CMV IgG |

### **A3. Sistema Sorin para micro-Elisa**



*Figura 36 – Sistema de micro-ELISA*

Este aparelho é um sistema aberto para ensaios imunométricos por micro-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Aqui realiza-se os seguintes ensaios:

- Ac anti-EBV VCA IgG
- Ac anti-EBV VCA IgM

## **B. Áreas de Estudo**

### **B1. Endocrinologia**

#### *1. Distribuição dos diferentes analitos por função fisiológica*

Os parâmetros de Endocrinologia são executados nos Sistemas Immulite 2000 e Advia Centaur, de acordo com a seguinte distribuição:

| <b>Função</b>                     | <b>Analitos</b>                         | <b>Aparelho</b> |
|-----------------------------------|---|-----------------|
| <b>Função Tiróidea</b>            | <i>TSH (Tirotrófina)</i>                | Immulite 2000   |
|                                   | <i>T3 (Triiodotrionina)</i>             |                 |
|                                   | <i>T4 (Tiroxina)</i>                    |                 |
|                                   | <i>T3 Livre (Triiodotrionina Livre)</i> |                 |
|                                   | <i>T4 Livre (Tiroxina Livre)</i>        |                 |
|                                   | <i>ATA (Ac anti-peroxidase)</i>         |                 |
|                                   | <i>ATG (Ac anti-tireoglobulina)</i>     |                 |
| <b>Hormonas de Fertilidade</b>    | <i>FSH</i>                              | Immulite 2000   |
|                                   | <i>LH</i>                               |                 |
|                                   | <i>Estradiol</i>                        |                 |
|                                   | <i>Prolactina</i>                       |                 |
|                                   | <i>Beta-HCG</i>                         | Advia Centaur   |
|                                   | <i>Progesterona</i>                     |                 |
|                                   | <i>Testosterona</i>                     |                 |
| <b>Diagnóstico Pré-Natal</b>      | <i>PAPP-A</i>                           | Immulite 2000   |
|                                   | <i>Beta-HCG Livre</i>                   |                 |
|                                   | <i>Alfa-fetoproteína</i>                |                 |
|                                   | <i>Beta-HCG</i>                         |                 |
|                                   | <i>Estriol livre</i>                    |                 |
| <b>Hormonas da Função Adrenal</b> | <i>ACTH</i>                             | Immulite 2000   |
|                                   | <i>Cortisol</i>                         | Advia Centaur   |
|                                   | <i>Cortisol urinário</i>                |                 |
| <b>Função Paratiroidea</b>        | <i>iPTH</i>                             | Advia Centaur   |
| <b>Hormonas Gastrointestinais</b> | <i>Insulina</i>                         | Immulite 2000   |

#### *2. Interpretação de resultados*

Os resultados são avaliados em conjunto dentro de cada função endocrinológica. Assim sendo, a função tiróidea é analisada como um todo e não cada parâmetro isoladamente. O mesmo sucede com os restantes painéis. Na presença de alterações hormonais, são também analisados alguns parâmetros realizados noutras secções do laboratório. Com por exemplo, a pesquisa de hipoglicémia num hipotireoidismo ou numa insuficiência adrenal.

No caso do diagnóstico pré-natal, podemos ter os seguintes painéis de acordo com os trimestres de gravidez:

- **1º Trimestre (da 9ª à 13ª semana):**
  - ✓ *PAPP-A*
  - ✓ *B-HCG livre*
- **2º Trimestre (da 14ª à 20ª semana):**
  - ✓ *Alfa-fetoproteína*
  - ✓ *β-HCG*
  - ✓ *Estriol Livre*

Estes resultados são avaliados e introduzidos conjuntamente com os dados ecográficos. Dado que são doseamentos que causam uma grande tensão psicológica por parte da grávida e podem induzir à execução de amniocentese, a validação é feita apenas pelos especialistas presentes. Os resultados finais são dados com base em estudos probabilísticos.

## **B2. Alergologia**

### *1. Introdução*

Os métodos laboratoriais para testar alergias são baseados na descoberta de que muitas alergias são mediadas pelas imunoglobulinas de classe IgE, actuando como pontos de ligação entre os alérgenos e as células especializadas.

Muitas alergias são mediadas por imunoglobulinas específicas (IgE). Nos doentes sensibilizados que sofrem deste tipo de alergia, IgE mediada (atópica ou anafilática), as moléculas de IgE funcionam como ponto de contacto entre o alérgeno e células especializadas que libertam histaminas e outros agentes quando na presença desses alérgenos; desencadeando-se uma reacção alérgica. Com base na história clínica, os testes *in vitro* de IgE específica podem auxiliar o clínico a identificar o alérgeno (ou alérgenos) para o qual o doente está sensibilizado.

### *2. Métodos*

#### **Labamaro:**

| <i>Parâmetro</i>                                      | <i>Aparelho</i> |
|---|-----------------|
| <b>IgE Total</b>                                      | Immulite 2000   |
| <b>Phadiotop (<i>painel de IgE's específicas</i>)</b> | Immulite 2000   |
| <b>IgE específica</b>                                 | Immulite 2000   |

### *3. Interpretação de resultados*

Os resultados são analisados tendo em conta o processo anterior do doente e a totalidade dos resultados obtidos. As IgE's específicas são avaliadas em conjunto com a IgE total.

### **B3. Marcadores de anemia**

#### *1. Introdução*

Na secção de imunologia são doseadas 3 substâncias intervenientes neste metabolismo:

- Ferritina
- Vitamina B12
- Ácido Fólico

A vitamina B12 (cobalamina) e folato são nutrientes essenciais à hematopoiese. A anemia megaloblástica é quase sempre causada pela deficiência de uma destas duas vitaminas. Níveis de folato circulante são geralmente normais ou elevados na deficiência de vitamina B12. A deficiência de folato é normalmente observada em consequência de uma dieta deficiente (como no caso de alcoolismo) ou carência crescente desta vitamina (como na gravidez). Causas comuns de níveis elevados de vitamina B12 podem incluir doença do fígado, doença mieloproliferativa (sendo a leucemia mielóide crónica um caso especial) bem como o uso de suplementos multivitamínicos.

A molécula de ferritina consiste num invólucro proteico (PM 450 000 D) e num núcleo de ferro. Encontram-se altas concentrações nas células do fígado e nos centros de reciclagem dos eritrócitos (células RE) no fígado, biliar e medula óssea. A ferritina existe nestes órgãos como fonte de reserva principal para fornecer ferro, com função protectora contra o efeito tóxico do excesso e mantém uma reserva disponível para a eritropoiese. A ferritina também está presente no plasma, onde a sua concentração é normalmente um indicador satisfatório do armazenamento de ferritina no organismo.

#### *2. Método*

Estes parâmetros são executados nos seguintes aparelhos:

| <i>Parâmetro</i>    | <i>Aparelho</i>      |
|---------------------|----------------------|
| <b>Ácido Fólico</b> | <b>Immulite 2000</b> |
| <b>Vitamina B12</b> |                      |
| <b>Ferritina</b>    | <b>Advia Centaur</b> |

#### *3. Interpretação de resultados*

Os resultados são analisados tendo em conta o processo anterior do doente e a totalidade dos resultados noutras secções de outros parâmetros relacionados com metabolismo do ferro.

O resultado da ferritina é confirmado através do resultado final do hemograma e dos parâmetros referidos anteriormente no relatório de Bioquímica (Siderémia, CTFF, Transferrina e Saturação da Transferrina), e outros considerados necessários.

Os resultados de Vitamina B12 e Ácido Fólico são estudado em conjunto e, de igual forma, são estudados com o resultado do hemograma e outros parâmetros considerados necessários.

## **B4. Marcadores Tumorais**

### *1. Introdução*

Os marcadores tumorais são moléculas produzidas pelas células neoplásicas de alguns tipos de tumores. Estas substâncias permitem conjuntamente com outros parâmetros ou exames, ajudar a diagnosticar e monitorizar determinados tipos de tumores.

### *2. Método*

Todos os marcadores tumorais aqui referidos são doseados no sistema Immulite 2000.

### *3. Interpretação de resultados*

Os resultados são analisados tendo em conta o processo anterior do doente e a totalidade dos resultados obtidos noutras secções. Resultados alterados são verificados e repetidos caso se torne necessário. Deve-se ter também em conta que os Marcadores Tumorais conhecidos e utilizados são também produzidos por células normais e os seus níveis são influenciados por um grande número de parâmetros.

| <i>Marcador Tumoral</i>                                     | <i>Principais aplicações</i>       | <i>Aumentos inespecíficos</i>   |
|---|------------------------------------|---|
| <b>AFP – Alfa-Fetoproteína</b>                              | Hepatocarcinoma, Ovário            | Patologias hepáticas benignas, gravidezes múltiplas                                   |
| <b>CEA - Antígeno Carcinoembrionário</b>                    | Mama, pulmão, cólon/recto          | Hábitos tabágicos, patologias benignas pulmonares e digestivas, I.R.C.                |
| <b>CA 15.3</b>  | Mama                               | Patologias benignas hepáticas, digestivas, pulmonares e ováricas, doenças auto-imunes |
| <b>CA 19.9</b>  | Ovário, Endométrio, Tubo Digestivo | Patologias benignas pulmonares e digestivas   |
| <b>CA 125</b>   | Ovário, Endométrio                 |   |
| <b>PSA – Antígeno Prostático específico</b>                 | Próstata                           | Adenoma da Próstata, prostatites e manipulações da Próstata                           |
| <b>β-hCG – fracção β da hormona Gonadotropina Coriónica</b> | Placenta, Testículo                | Gravidez  |

## **B5. Serologia Infecçiosa**

### *1. Introdução*

A serologia infecciosa inclui um o doseamento de grande variedade de anticorpos contra agentes infecciosos.

Resumidamente podemos afirmar que são produzidos anticorpos, na maioria - mas não em todas - das infecções bacterianas ou virais. Inicialmente, a Imunoglobulina IgM, em geral antes ou pouco depois do início da doença; atinge um título máximo dentro de cerca de uma a duas semanas após o início dos sintomas clínicos e, a seguir, diminui para níveis normais em poucas semanas (habitualmente em menos de seis meses). Dentro de uma semana ou mais após a detecção dos anticorpos IgM, aparece a imunoglobulina G (IgG). Os anticorpos IgG atingem um pico dentro de uma a três semanas (por vezes mais) após o pico do anticorpo IgM. Tipicamente, os anticorpos IgG persistem por muito mais tempo do que os anticorpos IgM (vários anos ou até mesmo durante toda a vida). Por conseguinte, a presença de anticorpo IgM costuma indicar uma infecção aguda recente. Em geral, a presença de anticorpos IgG requer a obtenção de um título crescente para diagnosticar uma infecção aguda (embora, em algumas doenças haja circunstâncias que alteram este critério), visto que, na ausência de título crescente, não podemos saber se a elevação dos anticorpos IgG se deve a uma infecção recente ou antiga.

### *2. Método*

As determinações da Serologia Infecçiosa são realizadas nos vários sistemas de Imunologia:

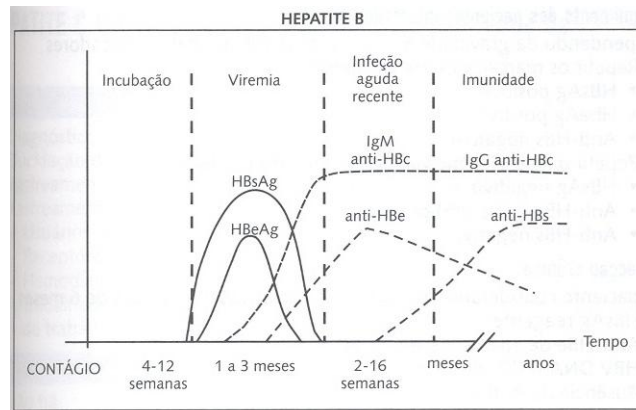
| <b>Patologia</b>       | <b>Marcador</b>  | <b>Sistema</b> |
|------------------------|------------------|----------------|
| <b>Hepatite A</b>      | HAV total        | Advia Centaur  |
|                        | HAV IgM          |                |
| <b>Hepatite B</b>      | Ag HBs           | Immulite 2000  |
|                        | Ac HBs           |                |
|                        | Ac HBc           |                |
|                        | Ac HBc IgM       | Advia Centaur  |
| <b>Hepatite C</b>      | HCV total        | Advia Centaur  |
| <b>HIV</b>             | HIV              | Advia Centaur  |
| <b>Rubéola</b>         | Rubéola IgG      | Immulite 2000  |
|                        | Rubéola IgM      |                |
| <b>Toxoplasmose</b>    | Toxoplasmose IgG | Immulite 2000  |
|                        | Toxoplasmose IgM |                |
| <b>Citomegalovirus</b> | CMV IgG          | Immulite 2000  |
|                        | CMV IgM          |                |
| <b>Epstein-Barr</b>    | EBV VCA IgG      | Micro-ELISA    |
|                        | EBV VCA IgM      |                |

### *3. Interpretação de resultados*

Os resultados obtidos são analisados em conjunto para cada tipo de patógeno.

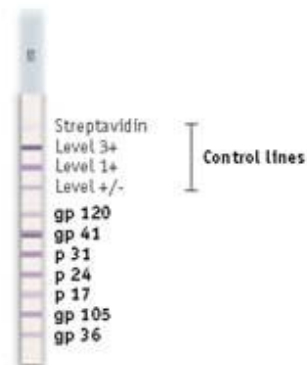
Em todos aqueles em que é feito o doseamento de IgG e IgM, no caso de surgir uma elevação de IgM o resultado é confirmado e analisado. No caso da Toxoplasmose e Rubéola, em que os seus doseamentos são realizados maioritariamente em grávidas, é feita a repetição da análise passadas 3 semanas no primeiro caso e 2 semanas no segundo. Nestes últimos casos, o título de IgG também é analisado, verificando-se se houve alterações no mesmo que possam sugerir a existência de uma infecção no intervalo das colheitas realizadas. Nos restantes casos, fica ao critério do clínico, caso não se trate de grávidas.

Os marcadores da Hepatite B, por serem vários e específicos, são avaliados em conjunto. A avaliação dos resultados para uma infecção não crónica é avaliada de acordo com o gráfico seguinte:



**Figura 37** – Evolução dos marcadores de Hepatite B ao longo do tempo

No caso específico dos anticorpos anti-HIV, o laboratório tem um procedimento especial no caso de um resultado positivo. Assim, é feita uma repetição de colheita e o resultado é analisado por imunoblot. Este Imunoblot contém impregnado uma série de Glicoproteínas características deste vírus, servindo para a confirmação da presença de Ac's anti-HIV tipo 1, incluindo o grupo O, e tipo 2 em soro ou plasma humanos. Permite ainda distinguir infecções por HIV do tipo 1 das do tipo 2.



**Figura 38** – Tira de *Immunoblot* utilizada

## **B6. Monitorização Terapêutica**

### *1. Introdução*

A terapia orientada por níveis sanguíneos dos princípios activos tem uma maior possibilidade de obter melhores efeitos terapêuticos e evitar a ocorrência de toxicidade. Deste modo, podemos verificar se foram alcançadas as concentrações sanguíneas adequadas e, por outro lado, se não estamos a atingir o limite de toxicidade em fármacos com janelas terapêuticas estreitas.

### *2. Método*

| <b>Fármaco</b>         | <b>Categoria farmacológica</b> | <b>Aparelho</b> |
|------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <i>Digoxina</i>        | <i>Anti-arritmico</i>          | Advia Centaur   |
| <i>Ácido Valpróico</i> | <i>Anti-epiléptico</i>         |                 |

## *Técnicas Manuais de Imunologia*

### *A. DIG (Diagnóstico Imunológico da Gravidez)*

#### *1. Introdução*

A HCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) é produzida pela placenta na mulher grávida. Esta é excretada na urina durante a gravidez e pode ser facilmente detectada usando uma reacção de aglutinação directa.

Os níveis séricos são geralmente maiores do que os urinários nas 2 primeiras semanas após a concepção, assemelhando-se a estes durante a 3ª semana; a partir de então, os níveis urinários são maiores que os sanguíneos. Consegue-se detectar com estes testes, uma gravidez normal de 6-10 dias após a implantação.

#### *2. Método*

O método usado é uma reacção de aglutinação directa com partículas de látex revestidas de anticorpos monoclonais anti-HCG. Estas partículas interagem com a HCG presente na urina provocando uma aglutinação visual macroscopicamente.

### *B. Reacção de Waaler-Rose*

#### *1. Introdução*

Os factores reumatóides são um grupo de anticorpos dirigidos à porção Fc da molécula de IgG. Apesar de se encontrarem numa série de doenças reumáticas, tais como o Lúpus Eritematoso Sistémico (SLE) e Síndrome de Sjögren e também nalgumas doenças não reumáticas, o seu papel é essencial no diagnóstico da Artrite Reumatóide. Estima-se que 80% dos doentes com Artrite Reumatóide tenham o factor reumatóide positivo.

#### *2. Método*

A reacção de Waaler-Rose é um método hemaglutinação para a determinação semi-quantitativa do factor reumatóide no soro humano.

São utilizados eritrócitos de carneiro sensibilizados com IgG de coelho e que aglutinam na presença de factor reumatóide na amostra.

Para a determinação quantitativa de Factor Reumatóide é utilizado um outro método descrito no Relatório de Estágio de Bioquímica.

## **C. Antígenos febris**

### **1. Introdução**

Os testes de antígenos febris são suspensões normalizadas de bactérias utilizadas para identificar e quantificar anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infecções febris, tais como a Brucelose, Salmonelose e certas Rickettsioses. Estes testes são aplicações serológicas para as reacções clássicas da Reacção de Widal para o diagnóstico de Febre Tifóide e a Reacção de Weil-Felix em que os antígenos preparados a partir de *Proteus* são usados para detectar anticorpos anti-Rickettsias.

### **2. Método**

Os testes de antígenos febris utilizam como método uma reacção de aglutinação directa entre uma suspensão de bactérias inactivadas e tingidas, e o soro do paciente. O antígeno da suspensão do antígeno aglutina na presença do correspondente anticorpo homólogo nas amostras ensaiadas.

#### **i Reacção de Widal**

Antígenos usados:

- *Salmonella typhi* H (H:d)
- *Salmonella typhi* OU (OU:9,12)
- *Salmonella paratyphi* AH (H:a)
- *Salmonella paratyphi* AO (OU:1,2,12)
- *Salmonella paratyphi* BH (H:b)
- *Salmonella paratyphi* BO (OU:1,4,5,12)

Os títulos superiores a 1/80 para os antígenos da *Salmonella* são indicativos de doença recente. As reacções com o Antígeno O (Somático) ocorrem mais precocemente, em geral, após a primeira semana de infecção; as reacções com antígeno H (flagelares) são mais tardias e persistem durante algum tempo. Os títulos de Antígeno H elevam-se de modo inespecífico de modo frequente.

#### **ii Reacção de Weil-Felix**

Antígenos usados são:

- *Proteus* OX19
- *Proteus* OX2
- *Proteus* OXK

O soro de indivíduos saudáveis contém anticorpos contra antígenos de *Proteus*. Um título inferior a 1/160 não é considerado significativo. A produção de anticorpos inicia-se após 7 a 10 dias depois do começo da doença. Como a reacção de Weil-Felix depende de antígenos de *Proteus* é necessário descartar a hipótese de uma infecção urinária por esta bactéria, uma vez que esta pode causar um resultado falso-positivo. Esta reacção, infelizmente, possui um elevado número de falsos-positivos.

## **D. Reacção de Paul-Bunnell**

### *1. Introdução*

Este teste é usado para detectar a infecção pelo vírus Epstein-Barr, o qual causa a Mononucleose Infecciosa. A reacção de Paul Bunnell detecta a presença de anticorpos heterófilos.

### *2. Método*

O Reagente apresenta uma suspensão de partículas de látex de poliestireno, as quais são revestidas por glicoproteína purificada de bovino. O anticorpo heterófilo associa-se ao anticorpo correspondente do látex, resultando numa aglutinação visível.

## **E. Reacções de detecção de *Treponema pallidum***

A Sífilis é causada pela espiroqueta *Treponema pallidum*. Em geral a Sífilis é dividida em fases:

- Primária – com duração de 4 a 6 semanas
- Secundária – dura cerca de 12 semanas com sintomatologia e 3 a 5 anos latente
- Terciária – que pode surgir ou não após a fase secundária.

## **E1. Teste RPR (Rapid Plasma Reagin)**

### *1. Introdução*

Trata-se de um método não-treponémico. Permite a detecção de anticorpos IgM e IgG contra o antígeno cardiolipina-lecitina-colesterol. Este teste possui a função de rastreio ou de monitorização terapêutica.

### *2. Método*

As reaginas plasmáticas, anticorpos dirigidos contra o antígeno de fonte não treponémica, produzem agregação com o antígeno, conglutinando com as partículas de carvão.

As amostras positivas por este método devem ser analisadas por provas treponémicas, como o TPHA antes de confirmar a infecção. Podem surgir falsos-positivos nalgumas situações tais como: toxicodpendência, outras doenças venéreas, gravidez e doenças auto-imunes.

## **E2. Teste TPHA**

### *1. Introdução*

O teste TPHA é um teste treponémico. Este teste utiliza o treponema como antígeno, detectando anticorpos contra o mesmo. Este teste é um teste confirmatório de alta especificidade.

### *2. Método*

Os anticorpos dirigidos contra o *Treponema pallidum* presentes no soro humano provocam a aglutinação de hemácias de ave em suspensão, sensibilizadas com um preparado antigénico de *Treponema pallidum*.

## **F. Imunofluorescência**

### **F1. Identificação de *Chlamydia trachomatis* em colheitas urogenitais**

#### *1. Introdução*

A *Chlamydia* é uma bactéria imóvel, gram negativa com desenvolvimento intracelular, obrigatório formando inclusões características podendo ser detectadas ao microscópio.

*C. trachomatis* é responsável por uma parte importante das doenças sexualmente transmissíveis encontradas no mundo. Na mulher, *C. trachomatis* é responsável por afecções endocervicais que podem estar na origem de uma sintomatologia inespecífica (leucorreia crónica...) ou mesmo silenciosa. A infecção pode ser transmitida para o recém-nascido durante o nascimento, originando conjuntivites e pneumonias neonatais. Salpingites crónicas podem estar na origem de problemas tubários responsáveis por gravidezes extra-uterinas ou esterilidade.

No homem, *C. trachomatis* é responsável pela maioria dos casos de uretrites não gonocócicas (UNG). O diagnóstico é apresentado quando há noção de contacto com uma pessoa infectada ou pela detecção de sintomas característicos. Este diagnóstico deve ser confirmado por cultura celular. Estas técnicas de cultura celular requerem, pelo menos 48 horas.

#### *2. Método*

Este método permite a detecção por, IF directa, das *Chlamydia* nas colheitas urogenitais e oculares com dois anticorpos monoclonais, um dirigido contra o antigénio do género *Chlamydia*, o outro dirigido contra um antigénio específico da espécie *trachomatis*. Estes anticorpos são conjugados à fluoresceína.

Os anticorpos reconhecem 15 serotipos da espécie *Chlamydia trachomatis* e da espécie *Chlamydia psittaci*. Permitem detectar as *Chlamydia* nos seus diferentes estados de evolução: corpos elementares, corpos reticulados e inclusões quando estas estão presentes.

## *Autoimunidade*

Nas doenças auto-imunes, a resposta imunitária faz parte do processo da doença, pois o sistema imunitário reage contra compostos presentes naturalmente no ser humano como se fossem uma ameaça para o organismo.

Nalguns casos, os auto-anticorpos presentes podem fazer prever uma doença específica ou a taxa de progressão de uma dada doença. Noutros casos, os auto-anticorpos podem ser detectados em doenças com um longo período sem sintomas clínicos, como por exemplo a Diabetes tipo 1 e Tiroidites, onde os auto-anticorpos são detectados no sangue periférico anos antes da destruição de células secretoras de hormonas levando ao aparecimento de sintomatologia.

No entanto, embora a pesquisa de auto-anticorpos seja importante a nível laboratorial, nas patologias auto-imunes o que prevalece é o quadro clínico do doente e a sua sintomatologia.

*Método usados para detecção de auto-anticorpos*

### *i      Imunofluorescência indirecta*

Esta é a técnica standard para detecção de auto-anticorpos, pois tem uma elevada especificidade. Neste método as amostras positivas e negativas produzem uma grande diferença no sinal produzido, sendo possível determinar facilmente a distribuição do corante indicador (fluoresceína) num exame ao microscópio.

Um padrão de fluorescência típico resulta da ligação de auto-anticorpos a estruturas específicas celulares. Todas as áreas fluorescentes que não correspondem a este padrão típico são consideradas fluorescências inespecíficas.

A imunofluorescência é considerada, o principal método de detecção de auto-anticorpos, uma vez que, o espectro total de antígenos do substrato original está disponível permitindo a detecção de um grande número de anticorpos e atingindo uma taxa de detecção elevada.

## G. Anticorpos Anti-Nucleares (ANA)

### G1. Metodologia para pesquisa de anticorpos anti-nucleares

#### Anticorpos Anti-Nucleares

##### 1. Método

O método de eleição para esta pesquisa é a imunofluorescência indirecta com substrato de células epiteliais humanas de cultura (HEp-2), usando como conjugado anticorpos anti-IgG humanos marcados com Isotiocianato de Fluoresceína.

No caso de surgir um resultado positivo de fluorescência, prossegue-se com a descrição do padrão e titulação. Posteriormente, estuda-se o padrão e tenta-se aprofundar o mais possível, tentando descobrir o auto-anticorpo responsável. No entanto, no ambulatório, o estudo deste resultado surge apenas se o clínico fizer um pedido específico.

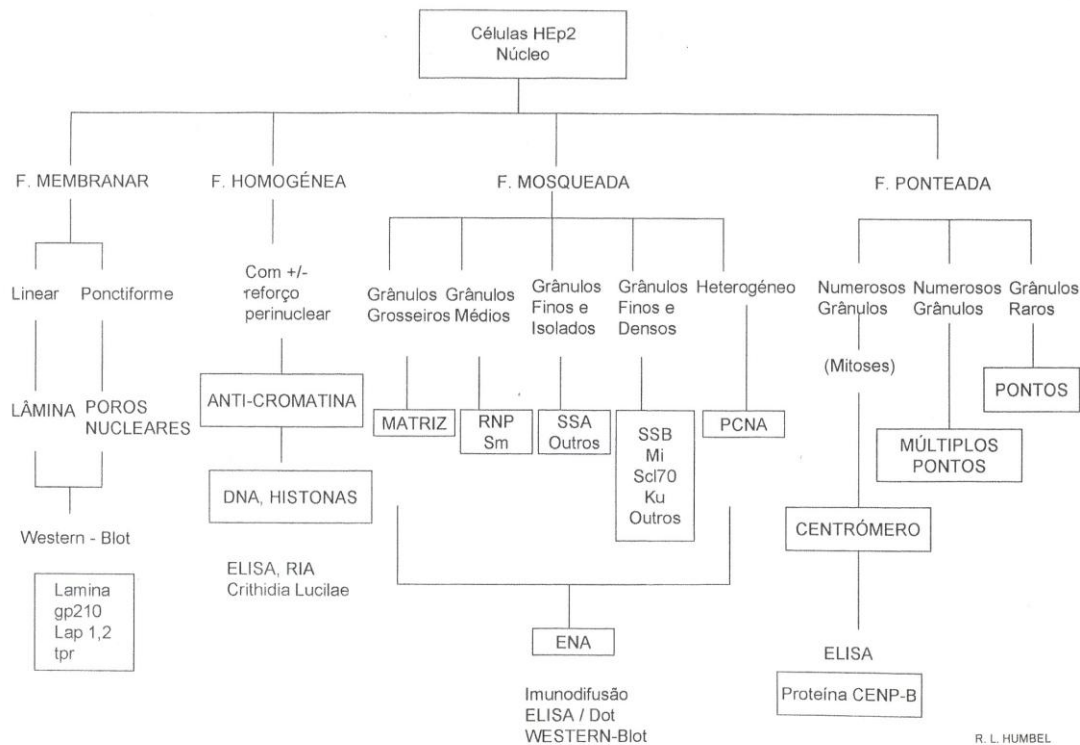


Figura 39 – Esquema de orientação para o Screening de anticorpos anti-nucleares

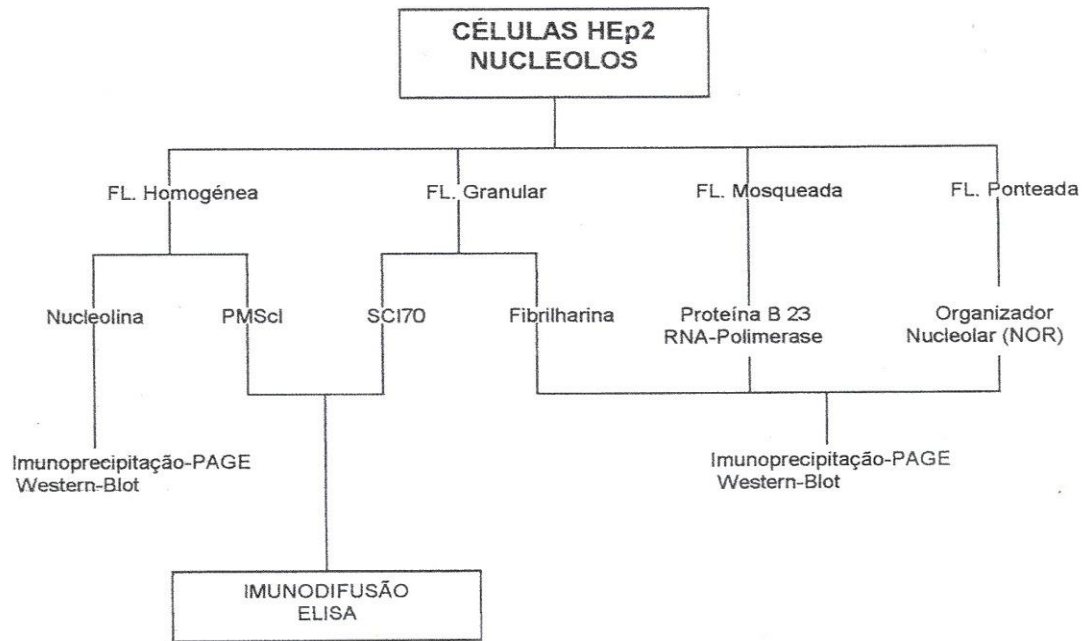


Figura 40 – Esquema de orientação para o *screening* de anticorpos anti-nucleares

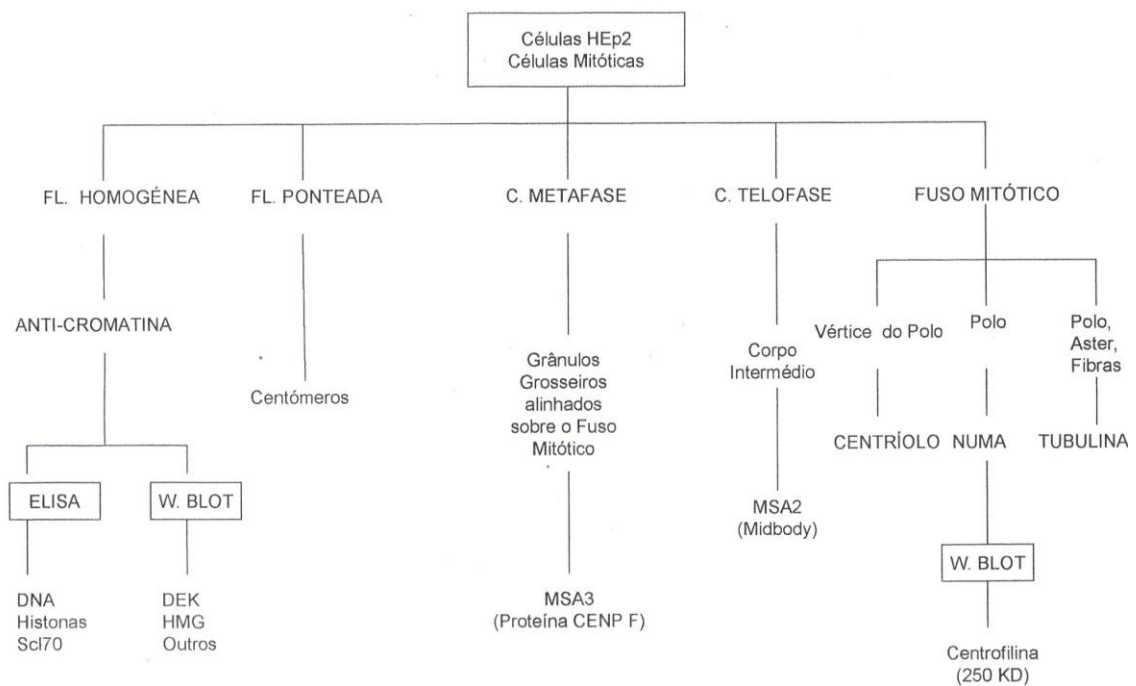


Figura 41 – Esquema de orientação para o *screening* de anticorpos anti-nucleares

## **G2. Pesquisa de anticorpos anti-dsDNA por IFI**

### *1. Método*

Quando na lâmina HEP-2 temos uma fluorescência de padrão homogêneo, podemos confirmar a presença de dsDNA por IFI com lâmina de *Crithidia luciliae*.

A *Crithidia luciliae* é um flagelado que possui uma mitocôndria gigante (cinetoplasto) contendo dsDNA que, geralmente não apresenta nenhum dos antígenos presentes no núcleo da célula. Os anticorpos contra o cinetoplasto são, deste modo, dirigidos apenas contra o dsDNA. A sensibilidade deste teste é superior à das lâminas HEP-2 pelo que se utiliza também como teste diagnóstico e de monitorização de Lúpus Eritematoso Sistémico.

### *2. Interpretação de resultados*

Os ANA nas amostras de soro de doentes são característicos em muitas doenças específicas, especialmente (mas não exclusivamente) naquelas de natureza reumatológica. As mais proeminentes são:

| <b><i>Doença auto-imune</i></b>                    | <b><i>Prevalência de ANA (%)</i></b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>Lúpus Eritematoso sistémico (SLE)</b>           |                                      |
| • <b>Activo</b>                                    | 95-100                               |
| • <b>Inactivo</b>                                  | 80-100                               |
| <b>Lúpus Eritematoso induzido por medicamentos</b> | 100                                  |
| <b>Colagenose mista (MCTD, Síndrome de Sharp)</b>  | 100                                  |
| <b>Artrite Reumatóide</b>                          | 20-40                                |
| <b>Outras doenças reumáticas</b>                   | 20-50                                |
| <b>Esclerose sistémica progressiva</b>             | 85-95                                |
| <b>Polimiosite e dermatomiosite</b>                | 30-50                                |
| <b>Síndrome de Sjögren</b>                         | 70-80                                |
| <b>Hepatite Crónica Activa</b>                     | 30-40                                |
| <b>Colite ulcerosa</b>                             | 26                                   |

*Relatório de Estágio  
Mestrado de Análises Clínicas*

De maneira reduzida, podemos também associar os ANA a determinadas doenças:

| <b>Antigénio</b>        | <b>Doença</b>   | <b>Prevalência (%)</b> |
|-------------------------|---|------------------------|
| <b>dsDNA</b>            | SLE   | 60-90                  |
| <b>ssDNA</b>            | SLE   | 70-95                  |
|                         | Lúpus Eritematoso induzido por medicamentos           | 60                     |
|                         | Colagenose mista                                      | 20-50                  |
|                         | Polimiosite/Dermatomiosite                            | 40-50                  |
|                         | Escleroderma, Síndrome de Sjögren, Artrite Reumatóide | 8-14                   |
| <b>RNA</b>              | SLE   | 50                     |
|                         | Escleroderma, Síndrome de Sjögren                     | 60                     |
| <b>Histonas</b>         | Lúpus Eritematoso induzida por medicamentos           | 95                     |
|                         | SLE   | 30-70                  |
|                         | Artrite Reumatóide                                    | 15-50                  |
| <b>U1-RNA</b>           | Colagenose mista                                      | 95-100                 |
|                         | SLE   | 30-40                  |
|                         | Artrite Reumatóide                                    | 3                      |
| <b>Sm</b>               | SLE   | 20-40                  |
| <b>SS-A (Ro)</b>        | Síndrome de Sjögren                                   | 40-95                  |
|                         | SLE   | 20-60                  |
|                         | Síndrome Lúpico neonatal                              | 100                    |
| <b>SS-B (La)</b>        | Síndrome de Sjögren                                   | 40-95                  |
|                         | SLE   | 10-20                  |
| <b>Fibrilarina</b>      | Esclerose Sistémica Progressiva (forma difusa)        | 5-10                   |
| <b>RNA polimerase I</b> | Esclerose Sistémica Progressiva (forma difusa)        | 5-10                   |
| <b>PM-Scl (PM1)</b>     | Polimiosite/Dermatomiosite                            | 50-70                  |
|                         | Esclerose Sistémica Progressiva (forma difusa)        | 5-10                   |
| <b>Centrómeros</b>      | Esclerose Sistémica Progressiva (forma limitada)      | 80-95                  |
| <b>Scl-70</b>           | Esclerose Sistémica Progressiva (forma difusa)        | 25-75                  |
| <b>Ciclina (PCNA)</b>   | SLE   | 3                      |
| <b>RANA</b>             | Artrite Reumatóide                                    | 90-95                  |
| <b>Ku</b>               | SLE   | 10                     |
|                         | Polimiosite/dermatomiosite, Esclerose                 | >50                    |
| <b>Mi-1 e Mi-2</b>      | Dermatomiosite  | 5-10                   |

## **H. Doenças endócrinas**

### **H1. Anticorpos anti-tiróideos**

#### *1. Introdução*

Os anticorpos anti-tireoperoxidase estão presentes tipicamente em indivíduos com:

- Tiróidite de Hashimoto (90-100%)
- Mixedema ou Hipotiroidismo primário (80%)
- Doença de Graves (50-80%)
- Diabetes Mellitus tipo 1 (40%)
- Grávidas (14%)

Para além destas patologias também aparecem conjuntamente aos anticorpos anti-tireoglobulina noutras patologias, tais como:

- Tiroidite sub-clínica
- Doença de Addison
- Autoimunopatias poliendócrinas
- Bócio

#### *2. Método*

È utilizado o sistema Immulite 2000 para o doseamento destes auto-anticorpos.

## **Microbiologia**

### **A. Introdução**

A esta secção do laboratório chegam vários tipos de amostras biológicas, inclusivamente de veterinárias, para proceder à respectiva análise. Em primeiro lugar, são visto todos os frescos das amostras e, logo se seguida são semeadas. Os exames corados são vistos mais tarde, no próprio dia.

A secção de Microbiologia de Labamaro é constituída pelos seguintes elementos: uma Técnica Superior de Análises e duas Técnicas de Análises Clínicas.

As Técnicas de Análises Clínicas (TAC) têm como responsabilidade a recepção das amostras vindas da triagem, fazer sair as listas de trabalho, proceder à organização das amostras, executar para cada tipo de amostra os procedimentos descritos no manual de microbiologia, e verificar os produtos em falta. Uma das TAC's tem como tarefa principal o tratamento das amostras e sementeiras. A outra tem como função auxiliar a técnica superior na execução técnica de identificações e antibiogramas no sistema Vitek 2 Compact, antibiogramas manuais e outros testes específicos.

A Técnica Superior de Análises tem como função a organização, coordenação da secção, tomar nota das ocorrências durante o trabalho e auxiliar as técnicas quando necessário. No início do trabalho procede à avaliação das caixas semeadas nos dias anteriores, avalia os resultados de identificações e antibiogramas, e introduz os resultados no sistema informático. No caso da detecção de algum problema de carácter técnico tem como responsabilidade o contacto com os fornecedores do sistema em causa para resolução do mesmo. A observação ao microscópio de exames a fresco e de exames corados é executada exclusivamente pela técnica superior.

Aos especialistas em Análises Clínicas cabe a validação biopatológica de processos e contacto com os clínicos prescritores e doentes. O controlo de qualidade externo, depois da obtenção dos resultados na secção, é avaliado pelo Director Técnico.

## Sistemas automáticos utilizados

### A. Sistema Vitek 2 Compact

Os sistemas Vitek 2 e Vitek 2 Compact da Biomerieux utilizam a mesma tecnologia para identificação de m.o. e no teste de susceptibilidade de antibióticos. Por essa razão são apresentados em conjunto.



Figura 42 – Vitek 2 Compact

Este sistema possui:

- Uma unidade de leitura de códigos de barras das cartas de identificação e antibiogramas.
- O aparelho que inclui: uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas e uma zona de incubação e leitura automática de cartas (por turbidimetria e colorimetria)
- Software que analisa e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho. Este 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 final indica se o resultado do antibiograma é consistente com a bactéria identificada.

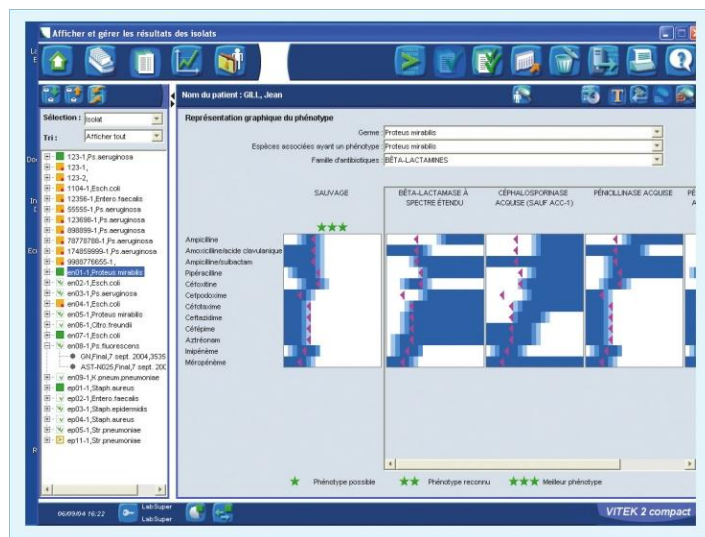


Figura 43 – Quadro o AES com a classificação do fenótipo bacteriano.

Este sistema tem 2 tipos de cartas:



**Figura 44** – Cartas do sistema Vitek 2 Compact

- **Cartas de identificação:** Cada carta possui poços que contêm substratos bioquímicos desidratados. Não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina deste modo o risco de omissão ou de erro.
  - ✓ **GN** – identificação de Gram negativos
  - ✓ **GP** – identificação de Gram Positivos
  - ✓ **NHI** – identificação de *Neisserias e Haemophilus*
  - ✓ **YST** – identificação de leveduras
- **Cartas de antibiograma:** A carta teste de Susceptibilidade aos Antibióticos contém poços contendo substratos de antibióticos.
  - ✓ **AST-N037** – ATB para enterobacteriaceas
  - ✓ **AST-N022** – ATB para bactérias Gram negativas fermentadoras e ATB de 2ª linha para outros Gram negativos
  - ✓ **AST-P534** – ATB para *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus* sp
  - ✓ **AST-P536** – ATB para *Staphylococcus* sp

Deste modo, a maioria dos m.o. são identificados e são feitos os seus antibiogramas por este sistema, permitindo uma maior segurança nos resultados obtidos. Uma vez que as cartas são seladas, a possibilidade de contaminação é menor. Por esta razão, as contaminações colocam-se muitas vezes do lado do utilizador no momento da manipulação das caixas ao fazer as suspensões que encherão as cartas.

O procedimento para a realização dos Testes de Identificação dos m.o.'s isolados e dos seus testes de Sensibilidade aos Antibióticos, através do sistema Vitek 2 Compact, é executado segundo as indicações do fornecedor.

**Meios de Cultura**

Os meios de cultura utilizados pelas secções de microbiologia são os seguintes:

| <i>Meios de Cultura</i>                                     | <i>Constituição</i>  | <i>Tipo de meio</i>  | <i>Observações</i>   |
|---|--|--|--|
| <b>Caldo Coração – cérebro (BHI-T)</b>                      | Este caldo é composto por uma base nutritiva enriquecida.  | Cultura das bactérias exigentes  | Este caldo está especificamente adaptado ao crescimento dos microrganismos aeróbios exigentes. |
| <b>Gelose CPS ID 3</b>                                      | É constituída por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas e 2 substratos cromogénicos que permitem revelar a actividade enzimática correspondente.<br>A revelação do indol é favorecida pela incorporação de triptofano na gelose.<br>A concentração elevada em agar evita a invasão de <i>Proteus</i> na gelose.                  | <b>Meio cromogénico</b> para a contagem dos microrganismos urinários                     | A contagem microbiana da colheita é feita mediante um método de sementeira padronizado.        |
| <b>Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)</b> | A gelose contém uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (estreptococos, <i>Listeria</i> ...).<br>A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise.<br>A presença de ácido nalidíxico e de colimicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) bem como os <i>Bacillus</i> . | Meio de <b>isolamento selectivo</b> que permite o desenvolvimento das bactérias Gram (+) | Isolamento selectivo das bactérias exigentes. Detecção das hemólises                           |
| <b>Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)</b>     | A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (estreptococos, <i>Listeria</i> ...).<br>A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana.   | Meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes  | Isolamento das bactérias exigentes. Detecção das hemólises.                                    |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| <p>Gelose Endo (END)</p>                            | <p>As enterobactérias que fermentam a lactose originam colónias rosas ou vermelhas por acidificação do meio com o aparecimento eventual de um reflexo metálico para a espécie <i>Escherichia coli</i>.<br/>A presença de 2 corantes inibe o crescimento das bactérias Gram (+).</p>   | <p>Isolamento selectivo das enterobactérias e dos coliformes.</p> | <p>Meio de isolamento e de diferenciação destinado à pesquisa dos coliformes e de outras enterobactérias</p>                        |
| <p><b>Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)</b></p> | <p>A gelose Chocolate Haemophilus 2 é composta por uma base nutritiva rica em factores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX.<br/>A selectividade foi obtida através da associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das bactérias Gram (+) e das leveduras.</p>   | <p><b>Isolamento selectivo</b> de <i>Haemophilus</i></p>          | <p>Meio selectivo para o isolamento das diferentes espécies de <i>Haemophilus</i> em colheitas polimicrobianas de origem humana</p> |
| <p><b>Gelose Mueller Hinton 2 (MH2)</b></p>         | <p>A composição da gelose Mueller Hinton 2 permite o crescimento das bactérias não exigentes (enterobactérias, bacilos Gram (-) não fermentadores, estafilococos e enterococos) pesquisados em patologia, garantido o mínimo de interferência dos componentes da fórmula no resultado do antibiograma.<br/>A sua concentração em iões bivalentes é ajustada assegurando a precisão correcta da determinação da sensibilidade das <i>Pseudomonas</i> aos aminosídeos e às tetraciclinas. O seu baixo teor em timina – timidina (elementos inibidores da actividade das sulfamidas) diminui os fenómenos de crescimento à volta dos discos e permite uma melhor determinação dos diâmetros de inibição.</p> | <p>Estudo da sensibilidade aos antibióticos e sulfamidas</p>      | <p>Meio que se destina à realização de antibiogramas por difusão</p>  |

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| <p style="text-align: center;">Gelose Chapman (MSA)</p>   | <p>Os microrganismos que fermentam o manitol originam colónias amarelas. Este carácter é um critério de orientação para a identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>.<br/>O teor elevado em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de alguns dos outros germes.</p>  | <p>Isolamento dos estafilococos.</p>   | <p>Meio que se destina ao isolamento dos estafilococos.</p>   |
| <p style="text-align: center;"><b>Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)</b></p>                      | <p>Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida em factores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX.</p>  | <p>Isolamento das bactérias exigentes</p>  | <p>A gelose Chocolate PolyViteX é um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes que pertencem aos germes <i>Neisseria</i>, <i>Haemophilus</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>.</p> |
| <p style="text-align: center;"><b>Gelose Sabouraud Gentamicina a Cloranfenicol 2 (SGC2)</b></p> | <p>A presença de peptonas e glucose favorece o desenvolvimento das estirpes/cepas fúngicas.<br/>A presença de gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) e Gram (+).<br/>O cloranfenicol melhora a selectividade em relação a algumas espécies, por vezes, resistentes à gentamicina (<i>estreptococos</i>, <i>Proteus</i>...).<br/>O pH da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento dos fungos face ao desenvolvimento bacteriano.</p> | <p><b>Isolamento selectivo</b> das leveduras e bolores</p>   | <p>Meio selectivo recomendado para o isolamento das leveduras e dos bolores a partir de amostras polimicrobianas.</p>   |
| <p style="text-align: center;"><b>Gelose Chocolate PolyViteX VCAT3 (VCA3)</b></p>               | <p>Esta gelose é composta por uma base nutritiva enriquecida com factores X (hemina) e V (NAD) produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX.<br/>A selectividade é obtida por associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas.</p>   | <p><b>Isolamento selectivo</b> de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i></p> | <p>Meio selectivo para o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> em Colheitas polimicrobianas.</p>   |

|                                    |  |   |   |
|------------------------------------|--|---|---|
| <b>Gelose XLD<br/>(XLD)</b>        | <p>Os microrganismos que possuem descarboxilase originam colónias vermelhas por descarboxilação da lisina.</p> <p>As bactérias que produzem H<sub>2</sub>S originam colónias com centro negro.</p> <p>As espécies que fermentam um dos três açúcares contidos no meio originam colónias amarelas ou laranjas.</p> <p>A inibição dos germes Gram (+) é obtida pela presença de desoxicolato de sódio.</p> | <p>Isolamento selectivo das <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i></p>   | <p>Meio de isolamento selectivo e de diferenciação destinado à pesquisa das <i>Salmonella</i> e das <i>Shigella</i> a partir de colheitas clínicas (fezes).</p> |
| <b>Gelose Campyloset<br/>(CAM)</b> | <p>A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento da espécie pesquisada.</p> <p>A fertilidade é aumentada devido à utilização de redutores.</p> <p>Os antibióticos e antifúngicos presentes no meio inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos.</p>  | <p><b>Isolamento selectivo</b> dos <i>Campylobacter</i></p>           | <p>Meio selectivo para o isolamento dos <i>Campylobacter</i> intestinais (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente) a partir de fezes.</p>              |
| <b>Caldo Selenito</b>              | <p>A sua composição favorece o crescimento das <i>Salmonella</i> no seio de uma flora polimicrobiana.</p> <p>Após a etapa de enriquecimento, o caldo Selenito F deve ser repicado em meios destinados à detecção das <i>Salmonella</i>.</p>  | <p>Caldo de <b>enriquecimento</b> para as <i>Salmonella</i></p>       | <p>Este meio destina-se ao enriquecimento das <i>Salmonella</i> a partir das fezes.</p>   |
| <b>Caldo Todd Hewitt</b>           | <p>A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora polimicrobiana.</p> <p>Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos da flora de acompanhamento.</p> <p>Após a etapa de enriquecimento, o caldo Todd-Hewitt deve ser repicado em meios destinados à detecção dos estreptococos.</p>              | <p>Caldo de <b>enriquecimento selectivo</b> para os estreptococos</p> | <p>Caldo de enriquecimento selectivo destinado à detecção dos estreptococos.</p>  |

*Relatório de Estágio*  
*Mestrado de Análises Clínicas*

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| <b>Meio<br/>LOWENST<br/>EIN-<br/>JENSEN<br/>(LJ-T)</b> | Este meio, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, favorece o crescimento das micobactérias. | Cultura de <i>Mycobacteriu<br/>m<br/>tuberculosis</i><br>e outras<br>micobactérias<br>. | O meio Löwenstein-Jensen destina-se à cultura das micobactérias. |
|--|--|---|--|

## *Análise Microbiológica de Produtos*

### *A. Urina*

#### *a. Introdução*

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

As infecções bacterianas são normalmente adquiridas por via ascendente, da uretra para a bexiga podendo atingir os rins. A propagação via hematogénica, é pouco comum, sendo o tecido renal o primeiro a ser atingido.

O trato urinário é afectado geralmente por bacilos Gram negativos, como a *Escherichia coli*. O *Proteus mirabilis* está associado, frequentemente, a cálculos urinários, uma vez que este microrganismo (m.o.) produz urease, a qual transforma a ureia em amónia, alcalinizando a urina. A *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* são organismos frequentemente encontrados em infecções hospitalares e acamados, uma vez que a resistência destes m.o. aos antibióticos favorece a sua selecção neste tipo de doentes.

Entre as bactérias Gram positivas, o *Staphylococcus saprophyticus* tem uma propensão peculiar para causar infecções em mulheres jovens sexualmente activas.

#### *b. Colheita*

A urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura. Podemos ter vários tipos de colheita:

- Urina colhida por micção “jacto médio“
- Urina colhida por punção de catéter urinário
- Urina colhida por punção supra-púbica
- Urina colhida por drenagem de nefrostomia / ureterostomia
- Urina colhida com saco colector em crianças

#### *c. Processamento laboratorial*

##### *i. Exame directo*

- **Exame directo a fresco do sedimento urinário**
  - ✓ Centrifugação de 10 ml de urina a 1500 – 2000 rpm / 5 minutos e do sedimento fazer o Exame Citológico.
  - ✓ Observam-se os elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros, bactérias, fungos ou parasitas.
- **Exame do esfregaço de urina corado pelo GRAM**
  - ✓ Colocar 10ul de urina não centrifugada e bem homogeneizada, numa lâmina de vidro.
  - ✓ Determinar o número de microrganismos por campo, com objectiva de imersão (100x) - a presença de 1 ou mais bactérias por campo pode ser correlacionada com uma contagem de colónias de  $>$  ou  $= 10^5$  U.F.C./ml (Unidade Formadora de Colónia)

*ii      **Exame Cultural***

Serve para pôr em evidencia o agente bacteriano responsável por uma infecção das vias urinárias.

As sementeiras são orientadas pelo observado no exame microscópico directo com o Exame Citológico e a Coloração de Gram .

As culturas são feitas em **meio de Gelose CPS ID3 (CPS3)** da BioMérieux, de acordo com o descrito no folheto informativo, para pesquisa de Gram negativos fermentadores e não fermentadores e Gram positivos.

**Quantificação e identificação bacteriana :**

Após incubação as placas são observadas, é feita a contagem de colónias, de acordo com o descrito no folheto informativo que acompanha o meio de cultura e efectua-se o procedimento de identificação bacteriana em função das características macroscópicas das colónias e em caso de necessidade do exame microscópico das mesmas ou utilizando galerias de identificação com posterior leitura no aparelho da marca VITEK 2 compact.

Finalmente após a identificação deve proceder-se ao Antibiograma.

*d.      Interpretação de resultados*

*iii      **Urina colhida por micção “jacto médio”***

Se as condições de colheita e de transporte forem as mais adequadas, então contagens de 10.000 ( $10^4$  UFC/ml) a 100.000 ( $10^5$  UFC/ml) podem ser significativas de infecção. Podem-se seguir os seguintes critérios:

- ✓ Nº de UFC/ml  $> 10^5 \Rightarrow$  infecção urinária;
- ✓ Nº de UFC/ml  $< 10^4 \Rightarrow$  contaminação uretral ou vaginal;
- ✓ Nº de UFC/ml entre  $10^4$ - $10^5 \Rightarrow$  deve ser avaliada segundo os critérios clínicos.

Uma urina contaminada geralmente tem mais de um tipo de bactérias, enquanto que uma urina infectada tem um só tipo de bactéria. Excepto no caso dos doentes algaliados, em que se valorizam até 3 m.o.'s diferentes.

No método quantitativo **só** podemos afirmar que estamos perante **infecção urinária** se encontramos  **$> 10^5$  UFC/ml**, em doentes cuja urina foi colhida pelo método do jacto médio.

*iv      **Urina colhida por punção supra-púbica***

Neste caso, devemos valorizar todos os m.o. isolados com excepção das bactérias comensais da pele. Esta valorização não deve ter em conta a quantificação, que neste caso não é relevante.

*v      **Urina colhida com saco colector em crianças***

A avaliação de resultados deve ser cuidadosa, pois a probabilidade de contaminação do períneo é elevado. A taxa de falsos positivos é grande e, por isso, deve-se recorrer a nova colheita em caso de dúvida.

## **B. Hemoculturas**

### *a. Introdução*

As hemoculturas constituem a base do diagnóstico de uma bacteriémia ou de uma septicemia.

A septicemia é um síndrome clínico caracterizado por febre, tremores, dor, taquicardia, hiperventilação e toxicidade ou prostração, que ocorre quando uma bactéria circulante se multiplica com uma velocidade que excede a eliminação pelos fagócitos.

Como o sangue é um produto estéril, o isolamento a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção.

### *b. Colheita*

- A punção deve ser realizada na veia proximal periférica, uma vez que existe maior perigo de contaminação nas colheitas a partir das veias distais.
- Descontaminar a pele no local da punção com álcool iodado, evitando o uso de soluções de Iodo aquosas. Este passo é determinante para evitar contaminações.
- Efectuar 3 colheitas (em locais distintos) de amostras de sangue num espaço de 24 horas, com intervalo mínimo de 30 minutos entre cada uma delas e com o seguinte volume:
  - *Adulto*: 30 - 40 ml repartidos por 3 a 4 frascos;
  - *R.N.*: 1 – 2 ml;
  - *1 Mês – 2 Anos*: 2 – 3 ml;
  - *Crianças*: 3 – 5 ml;
  - *Adolescentes*: 10 – 20 ml.
- Desinfectar o bocal do frasco com Etanol a 70°.
- O frasco deverá ser transportado o mais rapidamente possível para o laboratório, não ultrapassando o tempo de 12 horas após a colheita, e não o refrigerando.

### *c. Processamento laboratorial*

#### *i. Exame Cultural – Sistema manual (Labamaro)*

##### **Meio de Cultura**

- O meio utilizado é um meio bifásico
- Incubação em atmosfera de aerobiose a 35°C durante 7 dias ou até 28 dias quando suspeita de diagnóstico de *Brucella*.
- Exame macroscópico duas vezes por dia nos primeiros 2 dias e depois diariamente com inversão do frasco para contacto do meio líquido com a gelose.

##### **Processamento de amostras positivas**

- **Exame macroscópico** – observação visual diária do crescimento microbiano e subcultura da hemocultura em meio sólido (gelose de Chocolate PVX) quando apresenta turvação, hemólise, formação de gás, formação de película ou colónias visíveis na transição entre o sedimento eritrocitário e o meio de cultura.
- Efectuar **subculturas em gelose de chocolate PVX** (com incubação em 5% CO<sub>2</sub> a 35°C até às 48 h), dos frascos que não apresentem crescimento visível às 72 h



**Figura 45** – Frasco de hemocultura bifásico usado

*d. Interpretação de resultados*

Embora as amostras para hemocultura sejam, em condições normais, estéreis, a sua colheita e inoculação no meio de cultura apresentam factores de erro que induzem a falsos positivos. Por isso, ao avaliar os resultados de uma hemocultura deve-se ter em atenção o tipo de m.o. que cresce e a sua predominância noutros produtos recolhidos do indivíduo. Deste modo, tenta-se seguir o mais depressa possível os seguintes critérios:

- **Identidade do m.o. isolado** – Quando na presença de alguns agentes de infecção (*S.aureus*, *S.pneumoniae*, enterobacteriaceas, *Cândida albicans* e outros fungos e Enterococos), o resultado é considerado como positivo. No entanto, outros podem indicar ou uma infecção ou contaminação, tornando problemática a valorização. Neste ultimo caso, temos os *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus hemolyticus*, *Streptococcus viridans* e outros Estafilococos coagulase negativa. Quando na dúvida deve-se seguir o seguinte critério:
  - ✓ O número de hemoculturas positivas:
    - *Uma amostra* - o crescimento de m.o.'s deve de ser valorizado em conjunto com os dados clínicos e com o médico do doente;
    - *Com mais de uma amostra:*
      - as hemoculturas devem estar puras;
      - duas delas devem apresentar crescimento do mesmo m.o.;
      - só uma hemocultura positiva aponta para uma provável contaminação.
  - ✓ Características biológicas das estirpes
  - ✓ Presença concomitante do m.o. isolado noutro local habitualmente estéril

## **C. Aparelho Respiratório Superior**

### *a. Introdução*

As infecções do trato respiratório superior são muito frequentes, sendo a maior parte de etiologia viral.

A existência de uma flora normal da naso e orofaringe previne uma colonização do trato respiratório por m.o. patogénicos. No entanto, em determinadas circunstâncias, tais como, a diminuição da imunidade ou lesão, estes m.o. podem causar doença e tornarem-se patogénicos.

Dentro da flora mista temos vários m.o. potencialmente patogénicos, podendo fazer parte da flora de indivíduos normais:

- ✓ *Streptococcus pneumoniae*
- ✓ *Streptococcus pyogenes*
- ✓ *Haemophilus influenzae*
- ✓ *Neisseria meningitidis e gonorrhoeae*
- ✓ *Klebsiella spp.* e outras enterobacteriaceas
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Corynebacterium diphtheriae*
- ✓ *Bordetella pertussis*
- ✓ Bactérias anaeróbias
- ✓ Leveduras

Nos seios perinasais e ouvido médio, em condições normais, não há flora microbiana.

### *b. Colheita*

Exsudado nasal ou Exsudado Faríngeo

### *c. Procedimento laboratorial*

#### *i. Exame directo*

- Exame corado de Gram:
  - ✓ Detecção de células e leucócitos
  - ✓ Avaliação da flora saprófita

#### *ii. Exame cultural*

##### *a) Labamaro*

| <b>Meio de Cultura</b>                            | <b>Condições de Incubação</b>   |
|---|---|
| <b>Gelose Chapman</b>                             | 24h/ 37°C   |
| <b>Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro</b> | 48h/ 37°C/ CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária)  |
| <b>Meio Todd-Hewitt</b><br>(apenas para faríngeo) | 24h/37°C<br>Com passagem a gelose de Columbia + 5% de sangue de carneiro após este período de incubação |

b) *Pesquisa de Neisseria sp*

| <i>Meio de Cultura</i>           | <i>Condições de Incubação</i>                        |
|----------------------------------|--|
| <i>Gelose de Chocolate VCAT3</i> | 72h/ 37°C/ CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |

d. *Interpretação de resultados*

A bactéria mais frequente e que maior número de faringites causa é o *Streptococcus pyogenes*, o qual pertence aos estreptococos beta-hemolíticos do Grupo A de Lancefield. Esta bactéria patogénica causa habitualmente algumas complicações, tais como:

- ✓ Amigdalite
- ✓ Escarlatina
- ✓ Febre reumática
- ✓ Cardiopatia reumática
- ✓ Glomerulonefrite

Por esta razão, o isolamento desta bactéria é extremamente importante. O seu aparecimento no exame cultural é sempre valorizado.

O isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Neisseria sp.*, em portadores são revestidos de importância epidemiológica, pois estes microrganismos não são habitualmente causadores de faringite. No entanto, a *Neisseria gonorrhoeae* pode causar faringites exsudativas, particularmente em indivíduos que praticam sexo oro-genital.

O *H. influenzae* é frequentemente isolado em amostras naso e orofaríngeas, mas não é habitualmente causador de faringite. Contudo, a epiglotite é uma infecção grave causada por este m.o.. Nesta patologia, a amostra recomendada para diagnóstico é, no entanto, a hemocultura.

Devemos igualmente ter em atenção que, devido a desequilíbrios na flora saprófita, pode haver uma estirpe predominante. Nestes casos, deve-se avaliar o resultado de acordo com as indicações clínicas do médico.

## **D. Aparelho Respiratório Inferior**

### *a. Introdução*

As infecções do trato respiratório inferior podem envolver a traqueia e a árvore bronquial (traqueítes, bronquites e bronquiolites) e/ou o tecido pulmonar (alveolite e pneumonia). Entre os sintomas estão incluídos tosse e produção de expectoração em diferentes graus.

As bactérias mais frequentes, nas infecções comuns, ocorrem em doentes com 50/60 anos e com doenças crónicas concomitantes, tais como a bronquite crónica, DPCO, diabetes ou alcoolismo. Os agentes mais comuns são:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus* (em doentes idosos)
- *Moraxella catharralis*
- Bacilos Gram Negativos
- *Legionella pneumophila*

Nas infecções nosocomiais, a predominância de agentes causadores altera-se. Isto deve-se a alguns procedimentos e condições, como por exemplo: gravidade da doença de base, intubação, ventilação, cirurgia e antibioterapia prévia. Os agentes mais importantes são:

- Bactérias Gram Negativas (60% dos casos): *Kleb. pneumoniae*, *E.coli*, *Enterobacter sp* e *Serratia marcescens*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter sp*
- *Staph. aureus*

Nos casos de bronquites crónicas, a predominância dos isolados é de *Haemophilus influenzae* e pneumococos. Na fibrose quística, encontramos com frequência: *Pseudomonas cepacea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*.

Nos doentes imunocomprometidos, os agentes mais comuns de isolar são:

- Bacilos Gram negativos (*Kleb. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*)
- *Pneumocistis carinii* (em HIV +)

### *b. Colheita*

#### **Colheita de expectoração:**

- A recolha deve ser feita de manhã, após a higiene da boca, para recipiente esterilizado.
- Evitar expectorar saliva ou descarga nasal.
- Colher o produto proveniente de tosse profunda para o contentor de colheita, recolhido de uma só vez e trazer de imediato ao Laboratório.

#### **Outros produtos do aparelho respiratório inferior:**

Estes são realizados por outros técnicos e os produtos são enviados ao laboratório.

c. *Procedimento laboratorial*

i. **Exame directo**

- Seleccionar uma porção purulenta da amostra, efectuar um esfregaço por estiramento e corar por Gram e Ziehl-Neelsen.
- Observar com a objectiva de 10x para avaliar a qualidade da amostra.
  - ✓ Nesta observação deve-se verificar o número de células epiteliais, leucócitos, elementos leveduriformes e bactérias.
  - ✓ Classifica-se a amostra de acordo com o quadro seguinte (**Tabela de Murray e Washington**):

|                | <b>Células epiteliais<br/>(pequena ampliação 10x)</b> | <b>Leucócitos<br/>(pequena ampliação 10x)</b> |
|----------------|---|---|
| <b>Grupo 1</b> | 25  | 10  |
| <b>Grupo 2</b> | 25  | 10-25   |
| <b>Grupo 3</b> | 25  | 25  |
| <b>Grupo 4</b> | <b>10-25</b>  | <b>25</b>                                     |
| <b>Grupo 5</b> | <b>&lt; 10</b>  | <b>25</b>                                     |

- ✓ Seleccionar as amostras dos Grupos IV e V para semear. Temos como excepção: os Lavados Bronco-alveolares e as secreções brônquicas que são sempre semeadas.

ii. **Exame cultural**

Os meios de cultura usados são os seguintes:

a) *Labamaro*

| <b>Meio de Cultura</b>  | <b>Condições de Incubação</b>                         |
|---|---|
| <b><i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i></b>                                  | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <b><i>Gelose Chocolate Haemophilus (HAEM2)</i></b>                              | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <b><i>Meio sólido de Löwenstein-Jensen<br/>(quando pedido pelo clínico)</i></b> | 6 Semanas / 37°                                       |

**Cultural de BK:**

O procedimento para pesquisa de *Mycobacterium* sp processa-se em três passos:

- Descontaminação e liquefacção da amostra. (de acordo com a bula dos reagentes usados)
- Preparação e inoculação dos meios de cultura líquidos e sólidos.
- Avaliação dos resultados e possível continuação do estudo.

d. *Interpretação de resultados*

Tal como foi dito anteriormente, existe uma série de m.o. responsáveis pelas infecções do trato respiratório inferior, pelo que a avaliação dos resultados é, por vezes, complicada.

Quando na presença de um exame cultural no qual o exame directo anterior revelou um elevado número de leucócitos e um Ziehl negativo, damos importância ao exame cultural e verifica-se a existência de um patógeno relevante. Se o número de leucócitos é baixo, o Ziehl é negativo e a flora bacteriana no cultural é polimorfa, então o exame cultural não tem significado. Se a flora é monomórfica ou com um predomínio claro, devemos proceder à identificação e TSA.

**Resultados de cultural de BK:**

No caso de obtermos um cultural de BK positivo, devemos, proceder a um exame de Ziehl das colónias. Se for negativo, então temos uma contaminação. Simultaneamente faremos uma passagem em gelose de sangue que confirmará os resultados anteriores. Se não houver crescimento de colónias o resultado é positivo.

## **E. Exsudado ocular**

### *a. Introdução*

A superfície externa dos olhos está constantemente exposta ao meio ambiente e, portanto, facilmente acessível ao contacto com organismos infectantes.

As infeções palpebrais são, geralmente, ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, com o envolvimento das bordas das pálpebras (blefarite) ou das glândulas e folículos das pálpebras.

A conjuntiva pode ser invadida por outras vias, como a via hematogénica e sistema nervoso, pelo que, nestes casos, os tecidos mais profundos do olho também podem ser invadidos.

As infeções oculares podem ser divididas em:

1. Infeções das estruturas externas do olho:
  - a. Blefarites
  - b. Conjuntivites
  - c. Queratites
2. Infeções das estruturas internas do olho:
  - a. Endoftalmites
3. Infeções do sistema lacrimal:
  - a. Caniculites
  - b. Dacriocistites
  - c. Dacrioadenites

### *b. Colheita*

Exsudado ocular

### *c. Procedimento laboratorial*

#### *i. Exame directo*

- Exame corado de Gram

#### *ii. Exame cultural*

##### *a) Labamaro*

| <i>Meio de Cultura</i>  | <i>Condições de Incubação</i>                         |
|---|---|
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i>   | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <i>Gelose Chapman</i>   | 24h / 37°C  |
| <i>Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol</i>                             | 48h /37°C<br>(observação diária)                      |
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex VCAT3<br/>Para pesquisa de Neisseria sp em RN</i> | 72h/ 37°C/CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária)   |

d. *Interpretação de resultados*

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

Os principais responsáveis de causar infecção são:

- **Blefarite:**
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Staphylococcus epidermidis*
  
- **Conjuntivite:**
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Haemophilus influenzae*
  - *Streptococcus pneumoniae*
  - *Streptococcus pyogenes*
  - *Neisseria gonorrhoeae*
  - *Moraxella catarrhalis*
  - ✓ **Principais agentes de conjuntivite no recém – nascido**
    - *Chlamydia trachomatis*
    - *Neisseria gonorrhoeae*
    - *Staphylococcus aureus*
    - Bacilos Gram negativo
  - ✓ **Principais agentes em doentes imunocomprometidos**
    - *Enterobacteriaceae*
    - *Pseudomonas aeruginosa*
  
- **Queratite**
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Streptococcus pneumoniae*
  - *Pseudomonas aeruginosa*
  - *Moraxella catarrhalis*
  - *Haemophilus spp*
  - *Acanthamoeba spp.*
  
- **Endoftalmite**
  - ✓ **Principais agentes de infecção**
    - Endoftalmites pós cirúrgicas
      - *Staphylococcus aureus*
      - *Staphylococcus coagulase-negativo*
      - *Streptococcus pneumoniae*
      - *Pseudomonas aeruginosa*
      - *Enterobacteriaceae*
  - ✓ **Endoftalmites pós traumáticas**
    - *Bacillus spp*
    - *Clostridium spp*
  - ✓ **Endoftalmites endógenas**
    - *Staphylococcus aureus*
    - *Streptococcus pneumoniae*
    - *Haemophilus influenzae*
    - *Neisseria meningitidis*
  
- **Celulite Orbitária**
  - ✓ Infecção pós cirúrgica
    - *Staphylococcus aureus*
  - ✓ Infecção pós trauma - Infecção mista por aeróbios e anaeróbios

- ✓ Infecção associada a sinusite
  - *Haemophilus influenzae*
  - *Streptococcus pyogenes*
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Streptococcus pneumoniae*
  - Bacilos Gram negativo

- **Infecções do Aparelho Lacrimal**

A dacrioadenite é uma infecção das glândulas lacrimais em que os principais agentes são:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*

A dacriocistite é uma infecção do saco lacrimal, que ocorre habitualmente por obstrução do canal lacrimal. Os principais agentes são:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Haemophilus influenzae*

## **F. Exsudado auricular**

### *a. Introdução*

A infecção auricular pode localizar-se no ouvido externo e no ouvido médio.

A otite média é uma patologia muito comum em latentes e crianças, uma vez que, a trompa de Eustáquio ainda está muito aberta. A maioria destes episódios tem origem viral e os patogénios bacterianos são normalmente originários da nasofaringe, tais como, o *Streptococcus pneumoniae* ou o *Haemophilus influenzae*, e algumas vezes *Streptococcus pyogenes* ou *Staphylococcus aureus*. A otite média crónica e sua complicação, mastoidite, são resultado de infecções por floras anaeróbias.

A otite externa é semelhante às infecções da pele e tecidos moles. Com a agravante de o canal auditivo ser estreito e tortuoso. Ao contrário do ouvido médio, o canal externo possui uma flora semelhante à da pele (estafilococos, corinebactérias e em menor proporção propionibactérias). O ambiente húmido e temperado favorece a colonização por *Staphylococcus aureus*, *Cândida albicans* e oportunistas gram negativos, como o *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

### *b. Colheita*

#### **Exsudado auricular – ouvido externo**

- Com uma zaragatoa, colher o exsudado do ouvido, rolando suavemente.
- Colocar a zaragatoa num tubo seco.
- Com outra zaragatoa fazer esfregaço em duas lâminas de vidro.
- Repetir este procedimento no outro ouvido com outras zaragatoas.

#### **Ouvido médio**

- O exsudado é colhido pelo otorrinolaringologista por meningocentese e enviado ao laboratório em recipiente estéril.

### *c. Procedimento laboratorial*

#### *i. Exame directo*

- Exame Corado de Gram

#### *ii. Exame cultural*

##### *a) Labamaro*

| <i>Meio de Cultura</i>                              | <i>Condições de Incubação</i>                         |
|---|---|
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i>             | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <i>Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro</i>   | 48h/ 37°C/ CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária)  |
| <i>Gelose Endo</i>                                  | 24h/37°C  |
| <i>Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol</i> | 48h/37°C<br>(observação diária)                       |

*d. Interpretação de resultados*

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

## **G. Exame bacteriológico das fezes**

### **1. Introdução**

A diarreia é a consequência mais comum de uma infecção do trato gastrointestinal (GI). Estas infecções variam em efeitos desde uma crise branda, auto-limitada, até uma diarreia grave, algumas vezes fatal, podendo haver vômito, febre e mal-estar associados. A diarreia é resultado da perda do equilíbrio hidroelectrolítico no lúmen intestinal, levando à produção de fezes líquidas ou não formadas.

As salmonelas são a causa mais comum de diarreia associada a alimentos nos países desenvolvidos, seguindo-se o *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp* e *E.coli* O157:H7.

As alterações digestivas podem ser devidas a 3 mecanismos fisiopatológicos:

- **Processo invasivo**
- **Processo tóxico**
- **Dismicrobismo**

No **processo invasivo** as bactérias reconhecem determinados receptores das células da mucosa intestinal, aderindo e invadindo estas. Algumas atravessam os enterócitos e vão colonizar as células da submucosa. É o caso da *Salmonella sp* um dos principais agentes responsáveis pelas diarreias infecciosas. Estas bactérias replicam-se nos macrófagos, o que explica a existência de portadores sãos. Algumas espécies de *Salmonella* também produzem uma enterotoxina termolábil, semelhante à toxina colérica. A *Shigella sp* também utiliza este mecanismo para infectar o intestino. Infecta os enterócitos, multiplicando-se no seu interior provocando a sua lise. Isto resulta na ulceração da mucosa intestinal, o que explica o aparecimento da síndrome desintérico: fezes com sangue e pus. Esta bactéria também tem capacidade de sintetizar enterotoxinas. Outros exemplos de estirpes bacterianas que apresentam este mecanismo de acção são a *E. coli* serótipo O157:H7, também responsável por colites hemorrágicas, o *Campylobacter sp* e a *Yersinia sp*.

No **processo tóxico** a bactéria fixa-se à superfície da mucosa, não penetrando no epitélio, e secreta uma exotoxina. Esta é responsável por uma vasodilatação capilar e por perturbações do metabolismo celular reversíveis e transitórias. Como consequência, verifica-se um afluxo de líquido através da parede intestinal com aumento da secreção dos sucos digestivos – síndrome colérica. Este desequilíbrio osmótico e hídrico traduz-se numa desidratação acentuada (fezes muito líquidas). São exemplos de bactérias que utilizam este mecanismo o *Vibrio cholerae* e a *E. coli* enterotoxinogénica (ECET).

O **dismicrobismo** resulta do desequilíbrio da flora intestinal com proliferação anormal de bactérias habitualmente pouco abundantes, por exemplo devido a uma antibioterapia prolongada. Bactérias que actuam por este mecanismo são por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp* e *Clostridium difficile* (responsável por colites pseudomembranosas).

### **2. Colheita**

#### **Coprocultura e Pesquisa de ovos, quistos e parasitas:**

- A recolha das fezes deve ser feita para frasco de boca larga, até cerca de metade da capacidade do frasco e ser entregue ao Laboratório.
- Para exame bacteriológico e micológico o recipiente deve ser esterilizado e entregue diariamente no Laboratório.
- Para exame parasitológico o recipiente deve ser lavado e as fezes podem ser refrigeradas e posteriormente entregues ao Laboratório.

3. *Procedimento laboratorial - Coprocultura*

*i Exame macroscópico*

Deve-se registar se as fezes são moldadas ou diarreicas, mucosas, sanguinolentas, a sua cor e alguma observação considerada importante.

*ii Exame directo*

- Exame a fresco com detecção semi-quantitativa de leucócitos e/ou eritrócitos.
- Coloração de Gram:
  - ✓ Avaliação da flora intestinal e detecção de bactérias de forma espiralada característica

*iii Exame cultural*

*Labamaro*

| <i>Meio de Cultura</i>   | <i>Condições de Incubação</i>                                  |
|--|--|
| <i>Gelose XLD</i>  | 24h/37°C   |
| <i>Selenito</i>  | 4-6h/37°<br>Com passagem a XLD passado este tempo de incubação |
| <i>Chapman</i>   | 24h/ 37°C  |
| <i>Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol</i><br>(Se pedido pelo médico ou de acordo com observação no exame a fresco e/ou Gram) | 48h/37°C<br>(observação diária)                                |
| <i>Gelose Campyloset (CAM)</i>   | 42°C/48h/atmosfera própria<br>(observação diária)              |

4. *Procedimento laboratorial – Ovos, quisto e parasitas*

**Pesquisa de Ovos e Quistos  
Método de Concentração Kit BioSepar**

- Introduzir um pedaço da amostra no tubo com meio A (primário), fechar e agitar
- Retirar a tampa e adicionar 1,25 ml de meio B e agitar
- Adicionar 0,2 ml de meio C e agitar
- Enroscar o 2º tubo cónico com filtro no tubo primário e agitar vigorosamente.
- Esperar 1-2 min.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
- Decantar o sobrenadante
- Adicionar III gotas de reagente C (corante)
- Observar ao microscópico entre lâmina e lamela.

**Pesquisa de Ovos (método de Willis)**

- Num copo de decantação baixo ou num tubo de ensaio (centrifuga), deitar uma pequena quantidade de uma solução saturada de cloreto de sódio (cerca de 300 ml para 1000 ml de água) e juntar um pouco de fezes desfazendo-as bem.
- Perfazer o volume do recipiente com o cloreto de sódio, até formar um menisco convexo.
- Sobre o frasco ou tubo colocar uma lamela e deixar repousar 20 minutos.
- Colocar a lamela sobre uma lâmina previamente marcada e observar ao microscópio com a objectiva 10X.

#### **Pesquisa de Quistos (método de Ritchie)**

- Colocar num copo de decantação cerca de 20 ml de soro fisiológico.
- Juntar um pedaço de fezes do tamanho dum caroço de azeitona.
- Misturar e filtrar, utilizando gaze em vez de papel de filtro, para um tubo de centrifuga cerca de 10 ml.
- Centrifugar durante 3 a 5 min<sup>s</sup> a 1500 rpm.
- Proceder a duas lavagens com soro fisiológico, empregando a mesma rotação de centrifugação. Após a última centrifugação decantar e juntar ao precipitado cerca de 7 cm de solução de formol a 10%.
- Deixar repousar durante 10 min.
- Acrescentar cerca de 3 ml de éter sulfúrico, misturar e centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm.
- Decantar, e do sedimento colocar uma gota numa lâmina.
- Junte-lhe uma gota de soluto de Lugol forte e cobrir com uma lamela.
- Observar com objectiva de 40 X.

#### **Pesquisa de *Schistosoma mansoni* (método de Telemann modif.)**

- Colocar num recipiente (copo de decantação) 5 ml de ácido acético a 5%.
- Juntar um pouco de fezes do tamanho aproximado de um caroço de azeitona.
- Misturar e deixar repousar num minuto.
- Decantar 4 ml da mistura para um tubo de centrifuga e adicionar igual quantidade de éter sulfúrico.
- Agitar muito bem para obter uma mistura mais ou menos homogénea.
- Centrifugar durante 3 min<sup>s</sup> a uma velocidade de 1500 rpm.
- Decantar e aproveitar o sedimento colocando este numa lâmina sobre a qual se vai colocar uma lamela.
- Ver ao microscópio com uma objectiva pequena.

#### 5. *Interpretação de resultados*

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

Tanto a *Salmonella spp* como a *Shigella sp* são sempre consideradas agentes patogénicos. Caso se identifiquem salmonelas deve-se prosseguir com a serologia para *Salmonella spp* tal como está descrito no capítulo seguinte, referente à identificação.

## **H. Aparelho Reprodutor**

### **1. Introdução**

#### *Infecções femininas*

O aparelho reprodutor feminino é constituído por ovários, trompas, endométrio, cavidade uterina, endocolo, exocolo, vagina e vulva. Sob o ponto de vista microbiológico, o aparelho reprodutor feminino divide-se em dois:

- *Aparelho genital baixo* – o qual é colonizado por uma flora saprófita (Flora de Döderlein). Este inclui a vulva, vagina e exocolo.
- *Aparelho genital alto* – habitualmente estéril, inclui o endocolo, cavidade uterina, trompas e ovário.

A flora vaginal é constituída por várias espécies, predominantemente *Lactobacillus* ou bacilos de Döderlein (gram variáveis, finos e compridos). Na infância e após a menopausa, dada a ausência de estrogénios, o pH vaginal torna-se neutro e a flora vaginal é substituída por outras espécies microbianas.

Temos vários tipos de infecções genitais nas mulheres:

| <b>Infecção</b>             | <b>Microrganismo</b>  | <b>Manifestações clínicas</b>  |
|-----------------------------|---|--|
| Vulvo-vaginites             | <i>Candida albicans</i>   | Leucorreias esbranquiçadas e granulosas, acompanhadas de prurido, queimaduras vaginais e edema vulvo-vaginal                                   |
|                             | <i>Trichomonas vaginalis</i>  | Leucorreias esverdeadas, mal cheirosas, acompanhadas de queimadura e disúria   |
| Vaginose                    | <i>Gardnerella vaginalis</i><br>Isolada ou associada a anaeróbios ( <i>Mobiluncus</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> )        | Leucorreias acinzentadas, mucosas e com odor a peixe característico<br>pH vaginal >4,5<br>acompanhado de um quadro inflamatório característico |
| Cervicites                  | <i>Chlamydia trachomatis</i>  | Assintomáticas ou apresentam leucorreias sanguinolentas devido a cervicite hemorrágica   |
|                             | <i>Neisseria gonorrhoeae</i>  | Assintomáticas ou com leucorreia amarelada   |
|                             | <i>Mycoplasma sp</i>  | Geralmente infecções assintomáticas  |
| Endometrites<br>Salpingites | <i>Chlamydia trachomatis</i><br><i>Neisseria gonorrhoeae</i><br>E anaeróbios:<br><i>Bacteroides fragilis</i><br><i>Prevotella bivia</i> | Forma aguda típica com dor pélvica, febre e metrorragia. Também existem formas assintomáticas ou com sintomatologia ligeira.                   |

No caso das grávidas no 3º trimestre de gravidez, faz-se a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo beta-hemolítico do grupo B), para prevenir a contaminação materno-fetal. Esta

bactéria é responsável por meningites, septicemias e pneumonias no recém-nascido com uma taxa de mortalidade entre 20-25%.

### *Infeções masculinas*

As infeções do aparelho reprodutor masculino dividem-se da seguinte maneira:

| <b>Infeção</b>                     | <b>Microrganismo</b>  |
|------------------------------------|---|
| Uretrite (também no sexo feminino) | Gonocócica:<br><i>Neisseria gonorrhoeae</i>   |
|                                    | Não Gonocócica:<br><i>Chlamydia trachomatis</i><br><i>Ureaplasma urealyticum</i><br><i>Trichomonas vaginalis</i><br><i>Mycoplasma hominis</i> |
| Recto                              | <i>Chlamydia trachomatis</i>  |
| Úlceras genitais                   | <i>Chlamydia trachomatis</i><br><i>Haemophilus ducrey</i><br><i>Treponema pallidum</i>  |
| Epididimite                        | <i>Chlamydia trachomatis</i><br><i>Neisseria gonorrhoeae</i>  |
| Prostatite                         | <i>Enterobacteriaceae</i><br><i>Pseudomonas spp</i>   |
| Orquite                            | <i>Enterobacteriaceae</i><br><i>Pseudomonas spp</i>   |

## 2. *Colheita*

Podemos ter os seguintes produtos:

- Exsudado Vaginal
- Endocólo: (excepto em mulheres grávidas)
- Vulvar
- Exsudado Uretral
- Espermocultura
- Colheita para pesquisa de *Mycoplasma*

## 3. *Processamento laboratorial*

### *i Exame Directo (excepto para pesquisa de Mycoplasma)*

- Exame a fresco – para pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes
- Coloração de Gram

**ii      Exame Cultural de Exsudados Vaginais**

| <i>Meio de Cultura</i>  | <i>Condições de Incubação</i>                         |
|---|---|
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i>   | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <i>Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol</i>   | 48/37°C<br>(observação diária)                        |
| <i>Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro</i><br><i>Para pesquisa de estreptococos do Grupo B</i> | 48h/ 37°C/ CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária)  |

**iii      Exame Cultural de Exsudados Uretrais**

| <i>Meio de Cultura</i>                              | <i>Condições de Incubação</i>                         |
|---|---|
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i>             | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <i>Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol</i> | 48/37°C<br>(observação diária)                        |

**iv      Pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum***

Procedimento de acordo com o fornecedor do Kit de identificação. Esta identificação é feita de acordo com as características bioquímicas destes m.o.:

- O *Mycoplasma* utiliza a arginina como substrato
- O *Ureaplasma* utiliza a ureia como substrato

Quando as amostras são positivas para este organismo é feito o antibiograma. Este antibiograma é também realizado de acordo com as especificações do fornecedor e testa os seguintes antibióticos:

- Doxiciclina
- Minociclina
- Tetraciclina
- Eritromicina
- Clindamicina
- Ofloxacina

**4.      Interpretação de resultados**

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

Alguns agentes de infecção são reportados sem antibiograma, uma vez que são sensíveis às moléculas usadas para o seu tratamento. Inclui-se neste caso a *Gardnerella vaginalis* ou por *Mobiluncus* por serem habitualmente sensíveis aos Imidazóis. A *Neisseria gonorrhoeae* deve sempre ser reportada com antibiograma uma vez que o seu nível de resistência às penicilinas tem aumentado consideravelmente.

## **I. Exsudados Purulentos**

### *Introdução*

As secreções (pus) provenientes de supurações superficiais e de abscessos é heterogénea tanto pela natureza dos agentes bacterianos como pela fisiopatologia da infecção.

As supurações classificam-se de acordo com a sua localização:

- **Classe I** – zonas profundas fechadas, normalmente estéreis
- **Classe II** – zonas profundas comunicando com superfícies contaminadas por uma flora comensal
- **Classe III** – zonas superficiais sempre contaminados (queimaduras e escaras)

As infecções, quer endógenas quer exógenas, são sobretudo devidas a bactérias aeróbias e a fungos. No entanto, também podem ser provocadas por bactérias anaeróbias.

### *1. Colheita*

- Limpar a ferida com uma zaragatoa embebida em soro fisiológico estéril.
- Com uma zaragatoa recolher o exsudado ou pus da ferida.
- Colocar outra zaragatoa no meio de transporte.
- Com outra zaragatoa fazer esfregaço em duas lâminas.

### *2. Processamento laboratorial*

#### *i Exame Directo*

- Coloração de Gram
- Coloração de Ziehl-Neelsen

#### *ii Exame Cultural*

### *Labamaro*

| <i>Meio de Cultura</i>                                | <i>Condições de Incubação</i>                         |
|---|---|
| <i>Gelose Chocolate PolyVitex (PVX)</i>               | 48h / 37°C /CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária) |
| <i>Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro</i> | 48h/ 37°C/ CO <sub>2</sub> 5%<br>(observação diária)  |
| <i>Gelose Endo</i>                                    | 24h/37°C  |
| <i>Gelose Chapman</i>                                 | 24h/ 37°C   |
| <i>Gelose Sabouraud</i>                               | 48/37°C<br>(observação diária)                        |

### *3. Interpretação de Resultados*

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

Caso existam mais do que três bactérias, o resultado é dado com flora mista e não é feito o ATB.

## **J. Exame Micológico**

### **1. Introdução**

Os fungos patogénicos mais comuns em doenças infecciosas da pele, cabelo e unhas são os Dermatófitos. Estes fungos possuem predilecção por locais quentes e húmidos (virilha, axilas, região interdigital) e geralmente as micoses causadas por estes fungos são auto-limitadas.

Normalmente o tipo de amostras para pesquisa de fungos e leveduras são:

- Raspado do couro cabeludo
- Escamas e lesões cutâneas não ulceradas
- Pelos
- Raspado sub-ungueal
- Secreções de mucosa (oral, vaginal, anal, ocular)
- Fezes

Podem também isolar-se outras espécies de fungos e também leveduras entre as quais se encontra a *Candida albicans*.

### **2. Colheita**

Dependente do tipo de produto. No caso específico de pesquisa de fungos em:

- Pêlos – com pinça esterilizada
- Unhas – raspagem ou zaragatoa, pinça (corte)
- Pele – raspagem com instrumentos esterilizados

### **3. Procedimento laboratorial**

#### **i Exame directo**

- Sobre uma lâmina colocar 2 gotas de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 40% e um pouco de material colhido (amostra).
- Cobrir com uma lamela e deixar a repousar por 2h em câmara húmida.
- Observar ao microscópio com objectiva de 40X, procurando estruturas filamentosas septadas ou não ou ainda formas leveduriformes.

#### **ii Exame cultural**

| <b>Meio de Cultura</b>  | <b>Condições de Incubação</b>                     |
|-------------------------|---|
| <b>Gelose Sabouraud</b> | 7 dias/37°C<br>e<br>7 dias à temperatura ambiente |

### **4. Interpretação de resultados**

Os resultados obtidos diferem em consonância com o tipo de produto. No caso de amostras de pêlo, cabelo e pele é habitual a presença de Dermatófitos e nalguns casos *Candidas*. Noutros casos, como as amostras de trato GI e trato respiratório, podemos obter *Candidas sp.* no primeiro caso e vários tipos de fungos, tal como os *Aspergillus*, no segundo caso.

## *Identificação de microrganismos*

Neste capítulo, apresentam-se as principais bactérias e fungos que aparecem com maior regularidade num laboratório de microbiologia. Para simplificar o relatório, apresento também a marcha geral de identificação dos m.o. a partir dos meios de cultura mais usados

### *A. Bactérias: Cocos Gram Positivos*

#### *1. Caracterização*

Com excepção dos membros da família *Enterobacteriaceae*, as bactérias gram positivas, especialmente os cocos, são os microrganismos isolados com maior frequência a partir de amostras biológicas humanas.

Os cocos Gram positivos aeróbios da família *Micrococcaceae* dividem-se em dois grandes grupos:

- Com **Catalase Positiva:**

- ✓ *Staphylococcus*
- ✓ *Micrococcus*
- ✓ *Stomatococcus*
- ✓ *Planococcus*

- Com **Catalase Negativa:**

- ✓ *Streptococcus*
- ✓ *Enterococcus*
- ✓ *Luoconostoc*
- ✓ *Pediococcus*
- ✓ *Aerococcus*
- ✓ *Gemella*

#### *2. Procedimento Laboratorial para identificação de Cocos Gram Positivos*

##### *i Exame de Gram*

- **Cocos Gram Positivos:**

1. Suspeita de *Staphylococcus*: cocos em cachos: isolados, aos pares, em tétradas.
2. Suspeita de *Streptococcus*: cocos em cadeias de comprimento variável
3. Suspeita de *Streptococcus pneumoniae*: diplococos gram positivos em forma de chama.

##### *ii Exame cultural*

###### *a) Meio Chapman*

Semeado quando na presença de produtos com flora mista.

- Colónias isoladas com viragem do meio para vermelho » Crescimento selectivo de *Staphylococcus sp.* (normalmente coagulase negativos) » Quando relevante clinicamente identificar e fazer o antibiograma (ATB) no sistema Vitek
- Colónias isoladas com halo amarelo, o que indica a produção de ácido a partir do manitol » suspeita de *Staphylococcus aureus* » confirmar com a prova da coagulase:
  - ✓ Coagulase **positiva** - *Staphylococcus aureus* e fazer o ATB
  - ✓ Coagulase **negativa** - *Staphylococcus coagulase negativo* » proceder à identificação e ATB quando relevante clinicamente.

b) *Gelose de sangue de carneiro (com ou sem ácido nalidixico) e Gelose de Chocolate PVX*

Após o crescimento podemos, em colónias suspeitas, prosseguir o seu estudo com a prova da *catalase*:

- Prova da catalase **positiva**: suspeita de bactérias do género *Staphylococcus*. Prosseguir com a prova da *coagulase*:
  - ✓ Coagulase **positiva** - *Staphylococcus aureus* e fazer o ATB
  - ✓ Coagulase **negativa** - *Staphylococcus coagulase negativo* » proceder à identificação e ATB quando relevante clinicamente.
- Prova da catalase **negativa**: suspeita de bactérias do género *Streptococcus* » Verificar a *hemólise* da colónia:
  - ✓ Hemólise **alfa** » exame corado de Gram com diplococos e colónias características » fazer a prova da **Optoquina**:
    - Se é sensível à Optoquina » *Streptococcus pneumoniae* (fazer ATB com galeria ATB Strep5 da Biomerieux)
  - ✓ Hemólise **beta**:
    - Prova da **Bacitracina** » Se for sensível temos um *Streptococcus pyogenes*. Fazemos esta prova nas amostras do aparelho respiratório superior ou outro em que este seja relevante. Fazer o ATB com galeria ATB Strep5 da BioMérieux.
    - Aglutinação com látex B » Se for positivo estamos na presença de *Streptococcus agalactiae* e fazer ATB.
    - Se negativo nestas provas e se for relevante prossegue-se com a identificação no sistema Vitek e respectivo ATB.
  - ✓ Sem hemólise: Se for relevante clinicamente faz-se a identificação (ID) e ATB.

## **B. Bactérias: Bacilos Gram negativos - Enterobacteriaceae**

### **B1. Enterobacteriaceae**

#### *1. Caracterização*

Os bacilos Gram negativos pertencentes às *Enterobacteriaceae* são as bactérias isoladas com maior frequência de amostras biológicas. Distribuídos amplamente na natureza, estes m.o. são encontrados no solo, água, plantas e, como indica o nome da família, no trato gastrointestinal de seres humanos e animais.

Todos os membros desta família são:

- Bacilos Gram negativos no exame corado de Gram
- Oxidase negativos
- Fermentam a glucose
- Crescem em meio Mac Conkey
- A maioria reduz os nitratos a nitritos

As bactérias potencialmente patogénicas desta família podem ser:

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <i>Citrobacter freundii</i>           | <i>Proteus mirabilis</i>               |
| <i>Citrobacter (diversus) koseri</i>  | <i>Proteus vulgaris</i>                |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i>       | <i>Proteus penneri</i>                 |
| <i>Edwardsiella tarda</i>             | <i>Providencia retgeri</i>             |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>         | <i>Providencia stuarti</i>             |
| <i>Enterobacter cloacae</i>           | <i>Salmonella</i> (todos os serotipos) |
| <i>Enterobacter agglomerans group</i> | <i>Serratia marcescens</i>             |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>         | <i>Serratia liquefaciens</i> (grupo)   |
| <i>Enterobacter sakazakii</i>         | <i>Shigella dysenteriae</i> (grupo A)  |
| <i>Enterobacter amnigenus</i>         | <i>Shigella flexeneri</i> (grupo B)    |
| <i>Enterobacter taylorae</i>          | <i>Shigella boydii</i> (grupo C)       |
| <i>Escherichia coli</i>               | <i>Shigella sonnei</i> (grupo D)       |
| <i>Hafnia alvei</i>                   | <i>Yersinia pestis</i>                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>          | <i>Yersinia enterocolitica</i>         |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>             | <i>Yersinia frederiksenii</i>          |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>             | <i>Yersinia intermedia</i>             |
| <i>Morganella morganii</i>            | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>     |

Estas bactérias têm como principais características:

- Alguns são agentes de **zoonoses**.
- As espécies que colonizam normalmente o Homem podem provocar infeções endógenas.
- Estes microrganismos são frequentemente agentes de **infecção nosocomial**.
- As espécies ***Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Yersinia enterocolitica*** são sempre agentes patogénicos do aparelho gastrointestinal.

As *Enterobacteriaceae* clinicamente relevantes podem ser consideradas em 2 grupos:

- **Bactérias patogénicas oportunistas** (os mais comuns)
  - ✓ *E. coli*.
  - ✓ *Klebsiella* spp.
  - ✓ *Proteus* spp.
  - ✓ *Enterobacter* spp.
  - ✓ *Serratia* spp.
  - ✓ *Citrobacter* spp.
- **Bactérias patogénicas obrigatórias**
  - ✓ *Salmonella* spp
  - ✓ *Shigella* spp.

- ✓ *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*

2. *Procedimento Laboratorial para identificação de Bacilos Gram Negativos (Enterobacteriaceae)*

*i Exame de Gram*

- **Bacilos Gram negativos** com extremidades arredondadas

*ii Exame cultural*

*c) Meio CPS ID3 da Biomerieux para urinas*

Semeado para deteção de microrganismos na urina.

- Colónias **arroxeadas** » fazer teste do *Indol*:
  - ✓ **Indol positivo** » *Escherichia coli* » fazer ATB no sistema Vitek
  - ✓ **Indol negativo** » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Colónias **azuis-esverdeadas, pequenas e secas** » fazer Gram das colónias
  - ✓ Se forem cocos Gram **positivos** » *Enterococcus sp* » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek (ver tópico referente à identificação de cocos Gram positivos para mais pormenores)
  - ✓ Se forem Bacilos Gram **negativos** » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Colónias **verdes, grandes e mucóides** » *Grupo KES* » suspeita de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*) » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Colónias **incolores a castanho** » fazer teste do *indol*
  - ✓ **Indol positivo** » suspeita de *Proteus* indolagénico, *Providencia* ou *Morganella* » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
  - ✓ **Indol negativo** » fazer o teste de TDA
    - **TDA positivo** » *Proteus mirabilis* » fazer ATB no sistema Vitek
    - **TDA negativo** » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Qualquer outro tipo de colónias » prosseguir com o exame de Gram
  - ✓ Cocos Gram positivos » seguir o mesmo procedimento da Gelose de Sangue com ácido nalidixico
  - ✓ Bacilos Gram negativos » fazer a prova da oxidase e prosseguir com identificação e ATB indicado no sistema Vitek
  - ✓ Leveduras » seguir o procedimento do meio de Sabouraud

*d) Meios Endo e Mac Conkey*

Estes meios baseiam a identificação presuntiva na fermentação da lactose:

- Colónias com **halo rosa ou vermelho com brilho metálico** (apenas para meio Endo) » *Escherichia coli* » prosseguir com ATB no sistema Vitek
- Colónias com **halo rosa ou vermelho** » são bactérias fermentadoras de lactose » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Colónias **transparentes ou rosa claro** » são bactérias não fermentadoras ou fermentadoras fracas da lactose » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek

e) *Meio XLD em coproculturas*

- Colónias **vermelhas com centro negro** » produção de H<sub>2</sub>S » suspeita de *Salmonella* » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek. Enviar para o exterior para fazer serologia.
- Colónias **transparentes com fundo vermelho** » suspeita de *Shigella* » prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
- Colónias **amarelas** » resultado negativo

f) *Meios não selectivos: Gelose de sangue e chocolate sem inibidores de crescimento*

- No caso de colónias suspeitas fazer o exame de Gram:
  - ✓ Se se observar Bacilos Gram negativos deve-se fazer a prova da *oxidase*:
    - Prova da oxidase **negativa** » suspeita de *Enterobacteriaceae* » Prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek
    - Prova da oxidase **positiva** » suspeita de bacilos não fermentadores » Prosseguir com identificação e ATB no sistema Vitek

## B2. Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores

### a. Caracterização

Os bacilos Gram Negativos não-fermentadores são um grupo de microrganismos aeróbios, não esporulados, que não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degradam através de outras vias metabólicas.

Representam cerca de 15% dos Bacilos Gram Negativos isolados, e destes 75% são representados pela *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

A maioria destas espécies faz parte do meio ambiente e causam infecções oportunistas.

Este grupo de bactérias tem como características:

- Bacilos Gram negativos
- Aeróbios estritos
- Oxidase positivos
- Não fermentadores
- Móveis por 1 flagelo polar
- São bactérias mesofílicas: têm temperatura óptima de crescimento entre os 30 a 37°, mas podem sobreviver a baixas temperaturas (4°C), ou crescer a 42°C.

Quadro resumo com as principais bactérias deste grupo e suas características:

| MICROORGANISMO   | HABITAT  | TRANSMISSÃO   | DOENÇAS e INFECÇÕES   |
|--|--|---|---|
| <i>Burkholderia cepacia</i>  | Solo, água, plantas, meio hospitalar.<br>Não faz parte da flora humana; pode colonizar aparelho resp. em doentes com fibrose quística                              | Exposição a material contaminado, transmissão pessoa a pessoa   | Infecções graves em doentes com fibrose quística ou doenças granulomatosas crónicas   |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i><br>(bacilo de Withmore)   | Solo. Não faz parte da flora humana.<br>Áreas do Sudoeste asiático   | Inalação ou inoculação directa a partir da pele ou mucosas  | Agente da <b>Melioidose</b> , com formas leves a formas fatais por sepsis   |
| <i>Burkholderia mallei</i>   | Não faz parte da flora humana<br>Agente de doença em equídeos e macacos  | Transmissão a humanos raras. Contacto com animais e penetração pela pele ou mucosas                                   | Infecções humanas raras, desde inf. agudas ou crónicas da pele até sepsis.  |
| <i>Burkholderia gladioli</i>   | Meio ambiente. Causa doenças em plantas<br>Não faz parte da flora humana pode colonizar sp. resp. doentes com fibrose quística                                     | Transmissão a humanos rara. Modo de transmissão desconhecido  | Idem  |
| <i>Ralstonia pickettii</i>   | Meio ambiente  | Modo de transmissão desconhecido; envolve exposição a material médico contaminado.                                    | Infecções humanas raras.<br>Pode ser isolada no sangue, urina ou expectoração: suspeitar de contaminação  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Meio ambiente, sobrevive em tubagens e canalizações domésticas, piscinas, soluções de lentes de contacto e meio hospitalar.<br>Raramente faz parte da flora humana | Ingestão de alimentos ou água contaminada; exposição a material e soluções contaminadas; transmissão pessoa a pessoa. | Patógeno oportunista pode causar <i>infecções comunitárias</i> (foliculite, otite externa, osteomielite pós traumática, endocardite e inf. respiratórias) ou <i>nosocomiais</i> (aparelho respiratório, urinário, feridas, bacteriémia e SNC) |
| <i>Pseudomonas fluorescens, putida, stutzeri</i>   | Meio ambiente (solo, água)<br>Não faz parte da flora humana  | Exposição a material e soluções contaminadas  | Infecções humanas raras. Pode ser isolada no sangue, urina ou expectoração: suspeitar de contaminação   |
| <i>P. mendocina alcaligenes, pseudoalcaligenes</i> , CDC gr 1, " <i>P. denitificans</i> ",<br><i>Pseudomonas-like gr. 2</i> , CDC gr. 1c | Meio ambiente<br>Não faz parte da flora humana   | Desconhecido. Rara em humanos   | Não causam infecções no Homem   |
| <i>Brevindomonas vesicularis e diminuta</i>  | Meio ambiente<br>Não faz parte da flora humana   | Desconhecido. Rara em humanos   | Infecções humanas raras.<br><i>B. vesicularis</i> é causa rara de bacteriémia   |

a. *Procedimento Laboratorial para identificação de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores*

i. *Exame de Gram*

- Bacilos **Gram Negativos**

ii. *Exame Cultural*

(a) *Meios não selectivos*

Crescimento de bactérias iridescentes, irregulares e com odor característico. Algumas crescem produzindo um pigmento azul-esverdeado (piocianina) ou pigmento amarelo-esverdeado (pioverdina). Nestes casos, nas colónias suspeitas, prossegue-se com o *teste da oxidase*:

- Oxidase **positiva** » suspeita de *Pseudomonas sp.* ou outra bactéria não fermentadora » prosseguir com ID e ATB próprio no sistema Vitek
- Oxidase **negativa** » suspeita de *Enterobacteriaceae* » prosseguir com ID e ATB próprio no sistema Vitek

(b) *Meio Endo e Mac Conkey*

Crescimento com fermentação da lactose **negativa** e com as características descritas anteriormente. Procedimento igual ao anterior.

## **C. Bactérias: Cocobacilos Gram Negativos**

### **C1. Género Haemophilus**

#### *1. Caracterização*

Os membros do género *Haemophilus* são bacilos gram negativos, imóveis, que requerem factores de crescimento presentes no sangue. Algumas espécies requerem Factor X (hemina e hematina) e a maioria necessita de Factor V (NAD). Tanto o factor X como o factor V estão presentes nos eritrócitos. O Sangue de Carneiro contém enzimas que hidrolisam lentamente o factor V. Em consequência, os *Haemophilus* dependentes de factor V não crescem em gelose de sangue de carneiro com eritrócitos intactos. O ligeiro aquecimento durante a adição de sangue ao agar base fundido na preparação do agar de chocolate, produz a lise dos eritrócitos, libertação dos factores V e X e inactivação das enzimas que hidrolisam o factor V.

O género *Haemophilus* inclui várias espécies:

- *H. influenzae*
- *H. parainfluenzae*
- *H. haemolyticus*
- *H. parahaemolyticus*
- *H. aphrophilus*
- *H. paraphrophilus*
- *H. segnis*
- *H. ducreyi*

As espécies deste género fazem parte da flora habitual do aparelho respiratório superior humano e dos animais (com excepção do *H. ducreyi*). As espécies consideradas patogénicas para o homem são: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* e *H. ducreyi*.

#### *2. Procedimento Laboratorial para identificação de Cocobacilos Gram negativos – género Haemophilus*

##### *i Exame de Gram*

- Cocobacilos Gram negativos pleomórficos.

##### *ii Exame cultural*

###### *(a) Gelose de Chocolate PVX e Gelose Haemophilus*

- Desenvolvimento de colónias pequenas, redondas, convexas ou achatadas, translúcidas com zona central mais opaca e com cheiro característico. Crescimento de 24h, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Se as colónias apresentarem estas características executar:
  - ✓ Gram das colónias:
    - Se **Cocobacilos Gram negativos** » fazer identificação com API NH da biomerieux e antibiograma ATB HAEM5 da Biomerieux

## **C2. Géneros *Neisseria* e *Branhamella***

### *a. Caracterização*

Os membros destes géneros são m.o. gram negativos cocóides ou bacilares que, com frequência, são observados ao pares ou em cadeias curtas. As formas cocóides possuem zonas laterais adjacentes achatadas, o que lhes confere o aspecto de grão de café. Estes organismos são imóveis e não apresentam esporos, crescendo optimamente a 35-37°C. São capnofílicas e desenvolvem-se melhor em atmosfera húmida. Todas as espécies são catalase e oxidase positivas.

### *1. Procedimento Laboratorial para identificação de Cocobacilos Gram negativos – géneros *Neisseria* e *Branhamella**

#### *i Exame de Gram*

- Diplococos gram negativos riniformes intracelulares (nos polimorfonucleares) » suspeita de *Neisseria sp*
- Diplococos gram negativos riniformes não intracelulares » suspeita de *Branhamella sp*

#### *ii Exame cultural*

##### *(a) Gelose de Chocolate VCAT*

- Colónias branco opaco elevadas e brilhantes que reflectem a luz » faz-se exame de Gram das colónias:
  - ✓ Se cocobacilos gram negativos » prosseguir com o teste da oxidase
    - Oxidase **positiva** » suspeita de *Neisseria sp* » Fazer ID com API NH e ATB pelo método manual

##### *(b) Gelose de Sangue de Carneiro ou Gelose de Chocolate PVX*

- Colónias branco opaco elevadas e brilhantes que reflectem a luz » faz-se exame de Gram das colónias:
  - ✓ Se cocobacilos gram negativos » prosseguir com o teste da oxidase
    - Oxidase **positiva** » suspeita de *Neisseria sp* » Fazer ID com API NH e ATB pelo método manual
- Colónias pequenas, redondas, esbranquiçadas, de 3-5 mm de diâmetro. Não aderem ao meio, deslizam inteiras quando arrastadas pela ansa. Suspeita de *Branhamella sp.* » faz-se exame de Gram das colónias:
  - ✓ Se cocobacilos gram negativos » prosseguir com o teste da oxidase
    - Oxidase **positiva** » suspeita de *Branhamella sp* » Fazer ID com API NH e ATB com galeria ATB HAEM5 da Biomerieux

## **D. Fungos**

### *a. Caracterização*

Os fungos são células eucariontes que se reproduzem por esporos.

Os fungos leveduriformes, designados por **leveduras**, são fungos unicelulares. Os outros que constituem a maioria são fungos **filamentosos** ou pluricelulares.

Certos fungos designados por dimórficos, podem apresentar a forma unicelular quando parasitam o hospedeiro e a forma de micélio quando crescem como saprófitas.

### *1. Procedimento Laboratorial para identificação de Fungos*

#### *a) Meio de Sabouraud*

- Crescimento de colónias brancas e opacas, cujo exame a fresco revela estruturas unicelulares » prosseguir com a prova de filamentação e prova da tinta-da-china (em LCR):
  - ✓ Filamentação **positiva** » *Candida albicans*
  - ✓ Filamentação **negativa** » levedura » se necessário, identificar com Sistema Vitek
  - ✓ Tinta-da-china **positiva** » fungo capsulado » suspeita de *Cryptococcus neoformans* » identificar com sistema Vitek
- Crescimento de colónias filamentosas, cujo exame a fresco revela estruturas pluricelulares » suspeita de fungos filamentosos » estudar o tipo de hifas, estruturas reprodutoras, e características macroscópicas » identificação do fungo com auxílio de atlas de micologia.

## ***Antibiograma – teste de sensibilidade aos antibióticos***

Os testes de sensibilidade realizados investigam a interação entre os antibióticos e as bactérias de maneira isolada e bastante artificial. Os resultados servem apenas como um guia útil para o provável resultado da terapia e na pior das hipóteses, podem estar incorrectos. Ao seleccionar os antibióticos a testar devemos ter em conta as seguintes condições:

- O tipo de produto (e local de origem) que é testado (e como tal é necessário ter em conta que tipo de antibióticos estão disponíveis para aplicação nesses locais).
- A idade do doente (se for uma criança não se administram antibióticos que façam mal à dentição ou ao crescimento ósseo).
- Se é uma doente grávida ou não.
- A sensibilidade da estirpe selvagem.
- A existência ou não de IR.
- As *guidelines* que existem para determinados m.o.'s, nomeadamente os aeróbios e fastidiosos.

### ***A. Métodos usados para execução de ATB's***

#### ***A1. Método das microdiluições***

Este é o método usado pelos sistemas Vitek 2 e Vitek 2 Compact e que também se aplica às galerias ATB de antibiograma da Biomerieux de leitura manual.

A carta de antibiograma do sistema VITEK 2 contém 64 poços contendo substratos de identificação ou antibióticos. A leitura dos poços é feita de 15 em 15 minutos utilizando o método cinético. Neste método, existe um poço controlo que permite verificar a existência de crescimento bacteriano e a sua cinética ao longo do tempo. A partir daqui, o resultado é avaliado pelo sistema AES que verifica a relação entre as CMI's encontradas e o m.o. identificado. O resultado final do ATB contém as sensibilidades e resistências do organismo, assim, como a classificação do fenótipo da bactéria e se o resultado é consistente com a identificação. O Vitek 2 disponibiliza uma grande gama de cartas para identificação e testes de susceptibilidade antibiótica para a maior parte dos microrganismos identificados no laboratório.

Estas cartas, que são específicas para o tipo de m.o. isolado, testam uma grande variedade de antibióticos de modo a apanhar a maior quantidade de produtos possível. Deste modo são testados, em simultâneo, antibióticos com interesse e outros sem interesse para aquela infecção, pelo que nem todos os resultados são enviados no antibiograma, fazendo-se a seguinte selecção:

- Só se referem os antibióticos com aplicação clínica à infecção em causa.
- Só se referem as sensibilidades dos antibióticos de 1ª linha, recorrendo-se aos de 2ª linha quando os m.o.'s apresentam resistências aos de 1ª.
- Todas as resistências a antibióticos são referidas, incluindo as resistências intrínsecas

Tabela com a constituição das cartas e galerias de antibiogramas:

| <b>Microrganismos</b>  | <b>Antibióticos ou Antifúngicos</b>  | <b>Observações</b>   |
|--|--|--|
| <b><i>Bacilos Gram negativos</i></b><br><br><i>Antibióticos de 1ª linha</i>  | Ampicilina<br>Amoxicilina/Ácido clavulânico<br>Piperacilina<br>Cefalotina<br>Cefuroxima<br>Cefoxitina<br>Cefotaxima <sup>1</sup><br>Ceftazidima <sup>1</sup><br>Amicacina<br>Gentamicina<br>Tobramicina <sup>2</sup><br>Ciprofloxacina<br>Norfloxacina <sup>3</sup><br>Ofloxacina<br>Nitrofurantoína <sup>4</sup><br>Trimetoprim/Sulfametoxazol  | <sup>1</sup> Resultado é dado quando as Cefalosporinas de 2ª Geração são resistentes.<br><sup>2</sup> Só em infeções oftálmicas.<br><sup>3</sup> Só em urina asséptica e infeções oftálmicas<br><sup>4</sup> Só em urina asséptica<br><br><i>Realizado no Sistema Vitek 2 Compact</i>                    |
| <b><i>Bacilos Gram negativos</i></b><br><br><i>Antibióticos de 2ª linha e Bacilos Gram negativos não-fermentadores</i> | Piperacilina<br>Ceftazidima<br>Aztreonam<br>Amicacina<br>Gentamicina<br>Netilmicina<br>Tobramicina<br>Ciprofloxacina<br>Trimetoprim/Sulfametoxazol<br>Colistina *<br>Imipenem *  | * Antibiótico testado mas só é divulgado o seu resultado quando os restantes apresentam resistências<br><br><i>Realizado no Sistema Vitek 2 Compact</i>  |
| <b><i>Staphylococcus sp</i></b>  | Oxacilina<br>Benzilpenicilina<br>Gentamicina<br>Tobramicina <sup>1</sup><br>Ciprofloxacina<br>Levofloxacina<br>Moxifloxacina<br>Norfloxacina <sup>2</sup><br>Eritromicina<br>Clindamicina<br>Teicoplanina <sup>4</sup><br>Tetraciclina<br>Fosfomicina <sup>3</sup><br>Nitrofurantoína <sup>3</sup><br>Ácido Fusídico<br>Rifampicina <sup>4</sup><br>Trimetoprim/Sulfametoxazol<br>Vancomicina <sup>4</sup> | <sup>1</sup> Só em infeções oftálmicas.<br><br><sup>2</sup> Só em urina asséptica e infeções oftálmicas<br><br><sup>3</sup> Só em urina asséptica<br><br><sup>4</sup> Antibiótico testado mas só é dado o seu resultado em casos em que se justifique<br><br><i>Realizado no Sistema Vitek 2 Compact</i> |

*Relatório de Estágio  
Mestrado de Análises Clínicas*

|   |  |   |
|---|--|---|
| <p><b><i>Enterococcus sp</i></b><br/><b><i>Streptococcus agalactiae</i></b></p> | <p>Benzilpenicilina<br/>Ampicilina<br/>Cefuroxima<br/>Imipenem <sup>4</sup><br/>Ciprofloxacina<br/>Levofloxacina<br/>Moxifloxacina<br/>Norfloxacina <sup>2</sup><br/>Eritromicina<br/>Clindamicina<br/>Teicoplanina <sup>4</sup><br/>Tetraciclina<br/>Nitrofurantoína <sup>3</sup><br/>Trimetoprim/Sulfametoxazol<br/>Estreptomicina de Alta<br/>Concentração<br/>Gentamicina de Alta Concentração<br/>Canamicina de Alta de Concentração<br/>Vancomicina <sup>4</sup></p> | <p><sup>2</sup> Só em urina asséptica e<br/>infecções oftálmicas<br/><br/><sup>3</sup> Só em urina asséptica<br/><br/><sup>4</sup> Antibiótico testado mas<br/>só é dado o seu resultado<br/>em casos em que se<br/>justifique<br/><br/><i>Realizado no Sistema Vitek<br/>2 Compact</i></p> |
| <p><b><i>Streptococcus sp</i></b></p>   | <p>Penicilina<br/>Amoxicilina<br/>Ampicilina<br/>Amoxicilina+ Ac. Clavulânico<br/>Cefotaxima<br/>Eritromicina<br/>Clindamicina<br/>Tetraciclina<br/>Levofloxacina<br/>Ofloxacina<br/>Ciprofloxacina<br/>Cloranfenicol <sup>1</sup><br/>Vancomicina <sup>4</sup><br/>Cotrimoxazol</p>   | <p><sup>1</sup> Só em infecções<br/>oftálmicas.<br/><br/><sup>4</sup> Antibiótico testado mas<br/>só é dado o seu resultado<br/>em casos em que se<br/>justifique<br/><br/><i>Realizado na galeria ATB<br/>STREP 5 da BioMérieux</i></p>  |
| <p><b><i>Haemophilus sp</i></b><br/><b><i>Branhamella sp</i></b></p>            | <p>Ampicilina<br/>Amoxicilina+Ác. Clavulânico<br/>Cefalotina<br/>Tetraciclina<br/>Ofloxacina<br/>Cotrimoxazol<br/>Rifampicina <sup>5</sup><br/>Cloranfenicol <sup>5</sup><br/>Cefuroxima<br/>Cefotaxima</p>  | <p><sup>5</sup> Só divulgados em<br/>amostras de LCR e de<br/>Exsudado Ocular<br/><br/><i>Realizado na galeria ATB<br/>HAEM da BioMérieux</i></p>   |
| <p><b><i>Leveduras</i></b></p>  | <p>Flucitosina<br/>Anfotericina B<br/>Fluconazol<br/>Cetoconazol<br/>Miconazol<br/>Intraconazol</p>  | <p><i>Realizado na galeria ATB<br/>Fungos Int da BioMérieux</i></p>   |

## **A2. Método de Kirby-Bauer**

O método de difusão em agar é um dos mais utilizados na rotina dos Laboratórios de Microbiologia, para testar “in vitro”, a susceptibilidade aos antimicrobianos (AM) das bactérias de crescimento rápido e de alguns microrganismos exigentes. As bactérias de crescimento lento não devem ser testadas por este método pois exige um enriquecimento do meio.

Este método baseia-se na relação dos “breakpoints” das CIM com os níveis terapêuticos dos antimicrobianos atingidos no sangue nas infeções sistémicas, ou ainda com níveis de antibiótico concentrado na urina para aqueles utilizados apenas em infeções do aparelho urinário.

Os resultados são dados como Sensível, Intermédio ou Resistente dependendo do resultado da medição e da sua interpretação na tabela do CLSI.

Este método só deve ser usado para bactérias que não possam ser testadas pelo método anterior e para confirmação de resultados duvidosos através do sistema automático.

Este método, apesar de ser um método de referência e fácil de executar, tem uma elevada percentagem de erros. Entre os potenciais erros desta metodologia temos:

- **Meio de cultura**
  - ✓ espessura não homogénea ou insuficiente
  - ✓ dessecação excessiva durante a conservação
- **Inóculo**
  - ✓ demasiado fraco aumenta os halos de inibição
  - ✓ demasiado forte diminui os halos de inibição
- **Deposição dos discos**
  - ✓ a proximidade dos discos pode levar a uma sobreposição dos halos de inibição
- **Leitura**
  - ✓ halos de inibição não definidos podem exprimir um mecanismo de resistência
  - ✓ erros na medição dos halos de inibição
- Para as bactérias exigentes devem-se ajustar as condições **necessárias ao seu desenvolvimento**
  - ✓ adição de sangue de carneiro para as bactérias *Neisseria* e *Streptococcus*
  - ✓ adição de sangue cozido (gelose de chocolate) para *Haemophilus*

Tabela com antibióticos e cargas usadas para o método de difusão:

| <b>Microrganismos ou Produto</b> | <b>Antibióticos</b>                | <b>Carga (µg)</b> |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| <i>Haemophilus sp</i>            | Eritromicina                       | 10                |
|                                  | Amox. + Ácido Cavulânico           | 20 + 10           |
|                                  | Cefradina                          | 10                |
|                                  | Cefotaxime                         | 30                |
|                                  | Gentamicina                        | 300               |
|                                  | Ciprofloxacina                     | 10                |
|                                  | Cotrimoxazol                       | 25                |
| <i>Staphylococcus sp</i>         | Meticilina                         | 10                |
|                                  | Oxacilina                          | 1                 |
|                                  | Flucloxacilina                     |                   |
|                                  | Ampicilina                         | 10                |
|                                  | Eritromicina                       | 15                |
|                                  | Gentamicina                        | 10                |
|                                  | Ciprofloxacina                     | 5                 |
|                                  | Tetraciclina                       | 30                |
|                                  | Cotrimoxazol                       | 25                |
|                                  | Vancomicina                        | 30                |
| <i>Streptococcus sp</i>          | Penicilina                         | 10                |
|                                  | Ampicilina                         | 10                |
|                                  | Eritromicina                       | 15                |
|                                  | Cefradina                          | 30                |
|                                  | Gentamicina                        | 10                |
|                                  | Cotrimoxazol                       | 25                |
|                                  | Vancomicina                        | 30                |
| <i>Enterococcus sp</i>           | Penicilina                         | 10                |
|                                  | Ampicilina                         | 10                |
|                                  | Gentamicina (elevada concentração) | 200               |
|                                  | Ciprofloxacina                     | 5                 |
|                                  | Tetraciclina                       | 30                |
|                                  | Vancomicina                        | 30                |
| <i>Pseudomonas sp</i>            | Aztreonam                          | 30                |
|                                  | Imipenem                           | 10                |
|                                  | Piperacilina + Tazobactam          | 100 + 10          |
|                                  | Ceftazidima                        | 30                |
|                                  | Tobramicina                        | 10                |
|                                  | Amicacina                          | 30                |
|                                  | Ciprofloxacina                     | 5                 |
| Cotrimoxazol                     | 25                                 |                   |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| <b>Bacilos Gram negativos</b><br><b>Antibióticos de 1ª linha</b> | <b>Ampicilina</b>                      | <b>10</b> |
|  | Amox. + Ácido Cavulânico               | 20 + 10   |
|  | Cefradina                              | 30        |
|  | Cefotaxime                             | 30        |
|  | Gentamicina                            | 10        |
|  | Ofloxacina                             | 5         |
|  | Cotrimoxazol                           | 25        |
| <i>Bacilos Gram negativos</i><br><i>Antibióticos de 1ª linha</i> | Aztreonam                              | 30        |
|  | Imipenem                               | 10        |
|  | Piperacilina + Tazobactam              | 100 + 10  |
|  | Ceftazidima                            | 30        |
|  | Cefuroxima                             | 30        |
|  | Tobramicina                            | 10        |
|  | Amicacina                              | 30        |
| <i>Bacilos Gram negativos em Urinas</i><br><i>Asséptica</i>      | Ciprofloxacina                         | 5         |
|  | Ampicilina                             | 10        |
|  | Amox + Ác Clavulânico                  | 20 + 10   |
|  | Gentamicina                            | 10        |
|  | Cefradina                              | 30        |
|  | Nitrofurantoína                        | 300       |
|  | Norfloxacina                           | 10        |
| <i>Outros M.o.'s em Urina Asséptica</i>                          | Cotrimoxazol                           | 25        |
|  | Nitrofurantoína                        | 300       |
|  | Norfloxacina                           | 10        |
| <i>Exsudado Ocular</i>   | Outros específicos para o m.o. isolado |           |
|  | Penicilina                             | 10        |
|  | Eritromicina                           | 15        |
|  | Ceftriaxona                            | 30        |
|  | Tobramicina                            | 10        |
|  | Cloranfenicol                          | 30        |
|  | Ciprofloxacina                         | 5         |
| <b>LCR</b>   | Cotrimoxazol                           | 25        |
|  | Penicilina                             | 10        |
|  | Ampicilina                             | 10        |
|  | Ceftriaxone                            | 30        |
|  | Gentamicina                            | 10        |
|  | Cloranfenicol                          | 30        |
|  | Rifampicina                            | 30        |
|  | Meropenem                              | 10        |
| Vancomicina  | 30                                     |           |

## **Controlo de qualidade**

### ***A. Controlo de qualidade interno***

O controlo de qualidade interno (CQI), nos sistemas automáticos, é passado todos os dias após a manutenção geral do aparelho. Na maior parte dos casos, o CQI é passado diariamente. Existem algumas exceções para análises que não aparecem diariamente, nestes casos o CQI apenas se faz quando existe esse tipo de análises. Nas técnicas manuais e imunofluorescência, o controlo é feito sempre que é feita a análise.

As calibrações são realizadas quando o controlo está fora dos limites, quando o reagente é mudado ou de acordo com um intervalo de tempo predeterminado pelo fornecedor. Os brancos das técnicas enzimáticas seguem as mesmas regras das calibrações.

### ***B. Avaliação externa da qualidade***

O programa utilizado para a avaliação externa da qualidade é o do INSA (Instituto Nacional Ricardo Jorge) e NEQAS. Após a realização das amostras, a avaliação do relatório é feito em primeiro lugar pelo Director Técnico, depois pelos restantes especialistas e finalmente pela técnica superior responsável. Em conjunto, fazem as alterações consideradas necessárias, caso existam, e caso algo não esteja em conformidade.

**2ª Parte – Introdução da Patologia Molecular: aplicação das técnicas de pesquisa do vírus Influenza H1N1 e Antígeno HLA-B27**

## **Introdução da Patologia Molecular em Labamaro**

Durante o período de estágio do Mestrado de Análises Clínicas, tive a oportunidade de dirigir a introdução da Patologia Molecular em Labamaro. Durante muitos anos, todas as análises constantes neste grupo eram enviadas para laboratórios exteriores com os quais havia um contrato de Laboratório Subcontratado, em conformidade com as leis de Licenciamento em vigor. Com o tempo, e com o crescimento que o laboratório apresenta, verificou-se que esta valência era essencial para preparar a entrada de novas tecnologias e novos métodos para manter uma evolução positiva.

Nos dias de hoje, e tendo em conta as alterações estruturais dos laboratórios hospitalares e privados, verifica-se que o laboratório necessita de evoluir para fora das tecnologias tradicionais, as quais já se encontram acessíveis no modo “point-of-care”. Tendo em conta, que no futuro o laboratório será despojado das tecnologias habituais, está a decorrer nos dias de hoje, uma “revolução laboratorial” dirigida para a medicina individual e personalizada. A Biologia Molecular está a proporcionar novas áreas de trabalho, tais como a farmacogenómica e proteómica, ou novos métodos mais rápidos de obtenção de resultados em áreas como a microbiologia.

Tendo em conta esta realidade decidiu-se adquirir um novo equipamento de Patologia Molecular, o Roche LightCycler 2.0. Este equipamento permite aplicar técnicas de PCR em Tempo Real, sem necessidade de preparações pós-PCR, como nas técnicas de PCR convencional. Tendo em conta a realidade internacional e com o surgimento da Pandemia de Gripe A, tivemos a oportunidade de começar com a Detecção do Vírus Influenza H1N1 2009. Esta técnica, embora seja sazonal, permitiu a adaptação do pessoal técnico e verificar as deficiências do laboratório nesta área, o que nos permitiu corrigir métodos de trabalho e adaptar as salas de trabalho. Em simultâneo, começamos a estudar a introdução da técnica de pesquisa de HLA-B27, a qual esperamos começar a validar no início do mês de Março.

A secção de Patologia Molecular dispõe de 2 salas. Uma sala, comum à microbiologia, serve para os procedimentos de extracção e tem uma câmara de fluxo de ar laminar. A outra sala serve exclusivamente a Patologia Molecular, e tem o equipamento LightCycler e outros equipamentos acessórios (ex: Banho Seco).

Em termos de pessoal, temos 1 técnica de Diagnóstico e Terapêutica que se dedica à extracção e 1 Especialista que se dedica aos procedimentos de preparação da amplificação.

Neste trabalho, descrevo os princípios do método aplicado à pesquisa de H1N1 2009 e HLA-B27, tendo em conta a base teórica por detrás de ambos e a respectiva aplicação à prática.

## **Patologia Molecular: Introdução**

### **A. Espaço laboratorial**

Ao instalar as técnicas de PCR num laboratório temos de ter em conta a possibilidade de contaminação cruzada de DNA nos ensaios.

A contaminação de DNA em ensaios de PCR pode ocorrer nos seguintes casos:

- Ambiente de trabalho: salas, equipamento, bancadas de trabalho e outras superfícies.
- Reagentes e consumíveis: oligonucleotidos, meio de transporte, consumíveis diversos
- Pessoal de laboratório e hábitos de trabalho: contaminantes da pele, cabelo, luvas e produção de aerossóis durante a pipetagem.

Normalmente, a contaminação cruzada e ambiental ocorre durante a manipulação de amostras. Assim sendo, o laboratório deve tentar cumprir, desde o início, dois objectivos:

- Separar as áreas usadas para a preparação de amostras, extracção, amplificação e pós-PCR.
- Minimizar o maior número possível de manipulações.

A contaminação pode ter origem nas seguintes fontes de contaminação:

- Contaminação cruzada, ou contaminação da amostra com material não amplificado de origem ambiental ou outras amostras.
- Contaminação do produto final (carry-over), ou contaminação da amostra com amplicons de PCR's anteriores, levando a uma amplificação subsequente do alvo e dos amplicons. Esta contaminação pode ter origem no armazenamento e processamento de amostras entre PCR's.

Portanto, é essencial a criação de áreas com separação física para a extracção, preparação de amostras para PCR e pós-PCR. É também essencial o uso de pontas de pipetas com filtro.



**Figura 46** – Câmara de Fluxo de ar laminar para extracção e purificação de ácidos nucleicos.

## ***Extracção e purificação de Ácidos Nucleicos***

A extracção é o primeiro passo a executar nas técnicas de biologia molecular. Existem uma série de tipos de extracção e que, dependendo do objectivo, são usados de diferentes maneiras conforme o tipo de produto que queremos purificar e isolar.

A chave para uma reacção de PCR bem sucedida é a purificação do ácido nucleico que precisamos. O objectivo primordial da extracção, para além de pretender obter uma boa concentração da sequência alvo, é remover todos os inibidores da reacção de PCR. Muitos PCR's falham devido à existência de ácidos nucleicos impuros, ou existência de contaminantes que influenciam negativamente a reacção.

Para obter ácidos nucleicos sem inibidores, deve-se usar sempre uma reacção de extracção adequada ao tipo de material que necessitamos (DNA ou RNA) e ao tipo de produto do qual estamos a extrair.

### **A1. Requisitos para obtenção de amostras extraídas para PCR**

Uma boa amostra purificada e extraída deve:

- Ter uma boa integridade. Isto é, a cadeia, deve ter um alto peso molecular, não estar degradada e estar íntegra.
- Após a extracção, uma cadeia de DNA intacta pode degradar-se caso as nucleases não foram completamente removidas durante o processo.
- Também podemos ter contaminações de amostras com nucleases após o uso contínuo. Deve-se aliquotar em pequenas porções. Deste modo, pode-se utilizar apenas uma vez e evita-se as contaminações.
- Estar livre de inibidores. Amostras impuras podem conter inibidores da polimerase tais como, porfirinas, heparina, citrato de sódio, clorofórmio, EDTA, xileno e metais pesados que diminuem a eficiência da reacção.
- Ser pura. Ou seja, deve ter um ratio A260/A280 de 1.8 a 2.0, o qual indica que está livre de proteínas e carboidratos.
- Estar livre de RNA. Grandes quantidades de RNA numa amostra de DNA podem quelatar Mg<sup>2+</sup> e diminuir o rendimento da reacção de PCR. Analogamente, se a amostra é RNA, a mesma deve não conter DNA (Ex: RT-PCR one-step).

### **A2. Quantidade de produto obtido**

A quantidade de amostra numa reacção influencia fortemente o desempenho da reacção de PCR. No caso de PCR convencional com DNA Taq Polimerase, deve-se seguir as seguintes recomendações:

- DNA genómico: deve ser no máximo 500 ng ou uma quantidade menor, caso seja possível.
- DNA Bacteriano: 1-10ng
- DNA plasmídico: 0.1-1.0 ng

### **A3. Métodos de extracção**

A extracção de ácidos nucleicos a partir de material biológico requer a lise celular, inactivação das nucleases celulares, e separação dos ácidos nucleicos do conteúdo celular.

Geralmente, a lise ideal é um compromisso. Em primeiro lugar, deve de ser suficientemente rigorosa para fragmentar a matriz (ex: sangue total, tecido). Em segundo lugar, deve ser suficientemente suave para preservar os ácidos nucleicos. Os procedimentos habituais de lise incluem:

- Disrupção mecânica

- Tratamento químico
- Digestão enzimática

O romper da membrana e inactivação das nucleases intracelulares podem ser combinados. A remoção do material celular remanescente pode ser feita por simples filtração ou precipitação.

#### **A4. Métodos de purificação**

Existem vários métodos para purificar a amostra de ácidos nucleicos a partir de uma matriz. No entanto, e tendo em conta as técnicas usadas, vou considerar os seguintes:

- Adsorção com sílica: Os ácidos nucleicos têm tendência a adsorver à sílica na presença de cloridrato de guanina. Dependendo da amostra biológica em questão, pode-se variar a força iónica e pH da solução, para aumentar o rendimento da reacção.
- Purificação por afinidade: Neste caso, explora-se as propriedades de hibridação de ácidos nucleicos para purificar alguns tipos de DNA ou RNA.
- Purificação baseado em soluções: Estes produtos usam as propriedades de lise celular e métodos de extracção para isolar amostras específicas.
- Filtração: Utiliza-se colunas de Quick Spin e mini Quick Spin para separar moléculas de acordo com o seu tamanho. Assim, pode-se separar fragmentos de DNA a partir de alguns tipos de contaminantes (sais, nucleótidos e primers)

A partir do passo de purificação da amostra, esta fica preparada para a fase seguinte: reacção de PCR, ou mais especificamente no nosso caso, RT-PCR.

## **B. PCR e RT-PCR: princípio do método**

A técnica de PCR baseia-se na existência da DNA polimerase. A principal função desta enzima é sintetizar novos filamentos de DNA na direcção 5'-3', a partir de uma cadeia simples. No entanto, a maioria das DNA polimerases nativas são polifuncionais. Para além da sua actividade habitual, as DNA polimerases são capazes de remover nucleótidos sequencialmente de uma ou da outra extremidade da cadeia.

As múltiplas aplicações desta enzima permitem um grande leque de aplicações.

### **B1. O ciclo de PCR**

A amplificação por PCR pode fazer aumentar um pequeno número de moléculas de um alvo específico, numa quantidade razoável de DNA.

A técnica de PCR baseia-se no processo natural de replicação. A reacção começa pela existência de 2 primers, que permitem identificar a sequência alvo para amplificar. Estes primers hibridam nas cadeias opostas de DNA, servindo de pontos de iniciação para a síntese de novas cadeias. A DNA polimerase termoestável, tal como a Taq DNA Polimerase, catalisam esta síntese.

Cada ciclo de síntese por PCR envolve 3 passos: desnaturação, annealing e extensão. Cada ciclo é repetido diversas vezes.

A natureza repetitiva do processo de PCR é a chave para o seu poder de amplificação. Uma vez que, as cadeias geradas a partir dos primers podem ser usadas no próximo ciclo, o número de cópias duplica todos os ciclos.

### **B2. RT-PCR**

Em 1987, Powell et al. descreveram uma técnica que estendia o poder do PCR à amplificação de RNA. Esta técnica, RT-PCR, usa a transcriptase reversa para converter o RNA em cDNA, e depois usa a DNA polimerase para amplificar o cDNA para níveis detectáveis. Esta técnica tornou possível o uso de PCR para detectar e analisar transcritos de mRNA e outros RNA's existentes em pequena quantidade.

A transcrição reversa e subsequente reacção de PCR pode ser realizada em dois passos (RT e PCR em 2 tubos separados), ou num único passo (as reacções de RT e de PCR são realizadas consecutivamente num único tubo). Cada procedimento tem as suas vantagens e desvantagens:

| <b>Vantagens da reacção One-Step</b>   | <b>Vantagens da reacção Two-Step</b>  |
|--|---|
| <p><i>Minimiza o tempo utilizado:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Tem menos pipetagens</li><li>▪ Reduz significativamente o tempo necessário para realizar a análise</li></ul>   | <p>Permite reacções óptimas de reacção:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Ambos RT e PCR podem decorrer sob condições óptimas de reacção</li></ul>  |
| <p><i>Reduz o risco de Contaminação:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Toda a reacção decorre num mesmo tubo</li><li>▪ Não requer qualquer transferência e não há abertura do tubo em passos intermédios</li></ul>                         | <p><i>Máximo de flexibilidade:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Permite escolher os primers</li><li>▪ O cDNA da reacção RT pode ser usado em diversos PCR's, permitindo a análise de múltiplos transcritos</li><li>▪ Permite uma escolha alargada de enzimas RT e PCR.</li></ul> |
| <p><i>Aumenta a sensibilidade e especificidade:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Usa primers específicos para sequência aumentando a sensibilidade e especificidade</li><li>▪ A cadeia de cDNA é usada como amostra para o PCR.</li></ul> | <p><i>Amplifica sequências longas</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Pode amplificar sequências até 14kb.</li></ul>  |

### **B3. PCR em Tempo Real**

Na grande maioria das vezes, os produtos de PCR são analisados num procedimento separado, o qual é realizado depois de finalizado o PCR. Este tipo de análise é designado “end-point” (pois é feito após os 30-40 ciclos de PCR). Este método é usado habitualmente para análises quantitativas, mas também pode ser usado para análises semi-quantitativas. A análise do pós-PCR é feita com electroforese em gel, permitindo obter dados sobre a pureza e tamanho dos produtos obtidos. O Brometo de Etídio é o corante fluorescente mais usado para a visualização dos produtos.

A análise de “end-point” não é aconselhada para PCR quantitativo porque é feita na fase de plateau, onde a reacção já não segue uma lógica exponencial. Nesta fase, a reacção já não pode ser descrita por uma fórmula matemática.

O PCR em Tempo Real é um método alternativo para ambas as análises qualitativas e quantitativas. Este tipo de análise permite que a amplificação e detecção de fluorescência sejam feitos por um só aparelho num único tubo e com dados recolhidos on-line. Um aparelho de pCR em Tempo Real mede a acumulação de produtos de PCR durante a amplificação com corantes fluorescentes ou através de sondas.

#### ***Vantagens do PCR em Tempo Real para análises qualitativas***

A maioria das aplicações de PCR requer apenas a análise qualitativa, ou seja, a detecção da presença ou não de uma dada sequência numa amostra em particular. Por essa razão a análise qualitativa de PCR em Tempo Real tem múltiplas vantagens em relação à determinação “end-point” do PCR convencional:

- A análise por PCR em Tempo Real é mais rápida e uma vez que o passo da análise posterior dos produtos de PCR é eliminada. A resposta positiva ou negativa pode ser obtida mais rapidamente durante a amplificação, ou seja, durante a fase exponencial, do que no caso do PCR convencional.
- O PCR em Tempo Real produz resultados bastante fiáveis devido à detecção mais sofisticada dos instrumentos de PCR em Tempo Real, a qual é mais sensível do que o Brometo de Etídio.
- O PCR em Tempo Real minimiza a possibilidade de contaminação uma vez que, ambas as fases de amplificação e detecção decorrem no mesmo tubo.

#### ***Vantagens do PCR em Tempo Real para análises quantitativas***

Os instrumentos de PCR em Tempo Real e reagentes permitiram que o PCR se tornasse numa ferramenta efectiva para a quantificação, superior aos procedimentos de blotting em sensibilidade e linearidade. Isto deve-se à possibilidade de criar análises matemáticas das curvas de amplificação.<sup>2</sup>

### *C. Roche LightCycler 2.0*

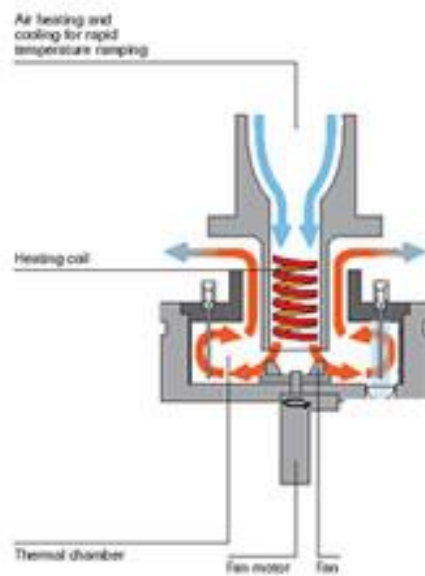


**Figura 47** – Roche LightCycler 2.0

A rapidez dos ciclos térmicos do LightCycler (LC) é possível devido à sua configuração característica. Em comparação com os termocicladores convencionais, o LC usa o ar para aquecimento e arrefecimento para os ciclos em alta velocidade, em vez dos termoblocos. O ar é introduzido no instrumento e aquecido através da passagem por óleo aquecido, o qual está colocado na parte superior do mesmo. A unidade inferior contém uma câmara térmica, o fotómetro e as unidades de drive.

A ventoinha colocada dentro da câmara térmica assegura a eficiente circulação de ar e a homogeneização da temperatura durante os ciclos. Durante a fase de aquecimento, a ventoinha na câmara é colocada a baixa velocidade para assegurar uma distribuição homogénea de temperatura. Durante a fase de arrefecimento, a ventoinha trabalha a alta velocidade de maneira a arrefecer os capilares.

Durante os períodos de medição, um motor roda o carrossel das amostras dentro da câmara, posicionando os capilares precisamente no ponto focal das ópticas do fotómetro.

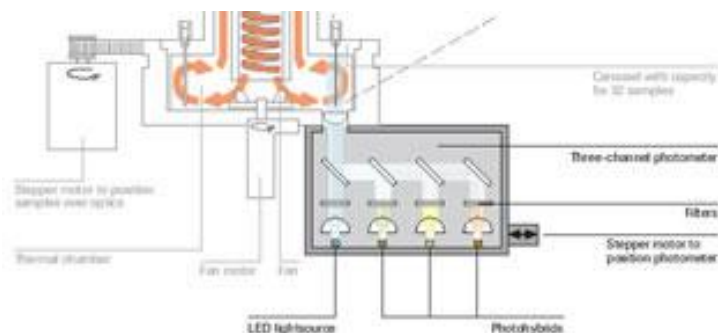


**Figura 48** – Esquema da câmara de aquecimento

O uso de ar como meio de transferência de calor contribui para as altas velocidades dos ciclos do LC. Assim, aquecimento e arrefecimento ocorrem habitualmente a uma velocidade dez vezes superior a um termociclador convencional. Um ciclo de amplificação típica requer apenas 50 segundos com capilares de 20  $\mu\text{l}$  e 95 segundos em capilares de 100  $\mu\text{l}$ . Isto significa que a uma reacção de amplificação com 40 ciclos no LC fica completa dentro de cerca de 35 a 65 minutos.

O fotómetro é composto por duas unidades ligadas a um condutor. A unidade de excitação está equipada com um LED azul com uma emissão máxima de 470 nm. O LED azul serve como fonte de energia para a excitação da amostra. A luz emitida pelo LED é focada na ponta do capilar e, assim excita os corantes fluorescentes aí contidos. A luz fluorescente emitida é reflectida no fotómetro com a ajuda de um espelho.

O condutor de luz divide a luz fluorescente em 6 canais independentes por comprimento de onda: 530 nm, 555 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm e 705 nm.



**Figura 49** – Diagrama esquemático da unidade de leitura

O Roche LightCycler é o termociclador usado em Labamaro. A sua tecnologia permite um sem número de aplicações distintas. Ambas as técnicas que descrevo a seguir baseiam-se na sua tecnologia e aplicações. A análise de resultados é feita directamente na base de dados do aparelho.

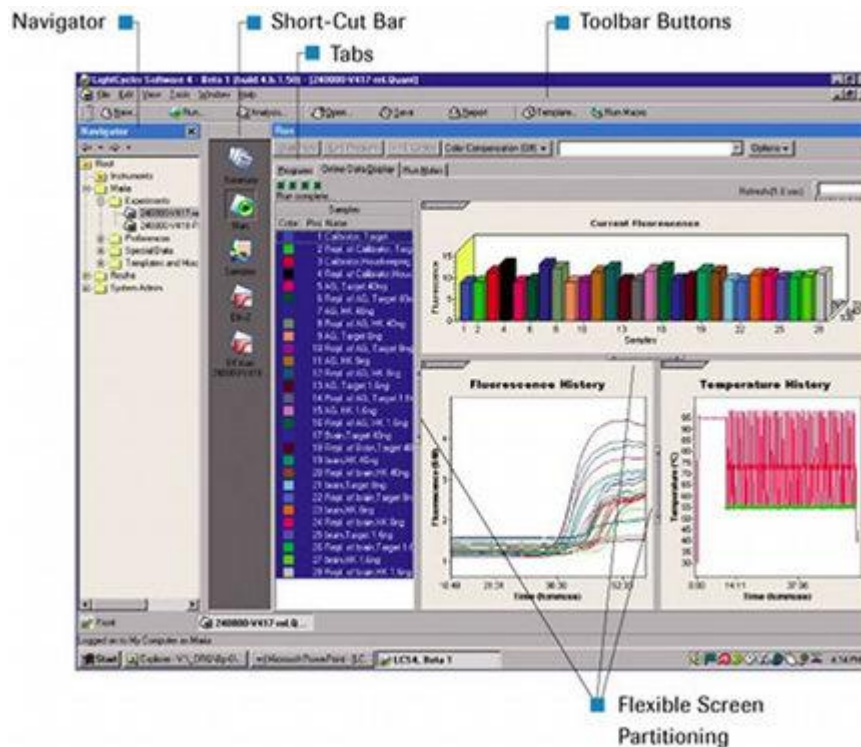
#### D. PCR em Tempo Real: Métodos de análise

Todos os sistemas de PCR em Tempo Real detectam um corante fluorescente e fazem a correlação do sinal com a quantidade de produto de PCR na reacção. Existem diversos métodos para detectar e avaliar estes produtos por fluorimetria. Os mais comuns pertencem a duas classes: ensaios com detecção independente de sequência e ensaios com detecção de sequências específicas com sondas.

No primeiro caso, a detecção independente da sequência, está relacionada com o uso de fluoróforos que se ligam à cadeia dupla de DNA independentemente da sequência. Uns dos exemplos são os ensaios com SYBR Green I.

Os ensaios com detecção de sequências específicas baseiam-se em sondas de oligonucleotídeos que hibridam com a cadeia complementar marcando um dado produto de PCR. Os formatos de sondas variam, no entanto, as mais comuns são: sondas de hidrólise, sondas de hibridação e sondas com marcação simples. As sondas estão acopladas a fluoróforos que podem ser detectados pelos instrumentos de PCR em Tempo Real.

Associado à detecção, os sistemas de PCR em Tempo Real permitem a avaliação dos resultados usando diversas ferramentas. No caso dos métodos quantitativos, podemos ter uma análise de quantificação absoluta e quantificação relativa. Para além desta, podemos também fazer uma avaliação no fim do PCR das curvas de temperaturas através da análise de curvas de desnaturação ou, até mesmo, genotipagem através do uso de sondas.



**Figura 50** – Base de dados do Roche LightCycler. Esta ferramenta permite-nos escolher o tipo de análise pretendemos.

## Pesquisa de H1N1 2009

### **A. Introdução**

Nos dias de hoje, uma das maiores causas de morte a nível mundial continuam a ser as doenças infecciosas. O aparecimento dos antibióticos e vacinas fez diminuir o seu impacto, mas continuam a ser a maior causa de morte. As doenças infecciosas emergentes, um dos maiores problemas da actualidade, podem ser novas doenças infecciosas, infecções raras que reemergem ocasionalmente, ou podem ser ressurgimentos de infecções comuns devido a problemas sociais ou aumentos de resistências antimicrobianas. De todas as patologias, a gripe merece uma atenção especial devido à sua alta taxa de alteração antigénica dando origem a novas estirpes de vírus Influenza para as quais a população não tem imunidade. Temos também de considerar a ausência de intervenções terapêuticas preventivas e rápidas.<sup>3</sup>

O vírus da gripe de pelo menos 3 subtipos de hemaglutininas diferentes (H1, H2 e H3) emergiram como patógenos significativos e são objecto de uma precaução acrescida a nível global.<sup>3</sup>

As primeiras referências do vírus Influenza A H1N1 surgem em 1918, quando o vírus de origem aviária passou a complexa barreira inter-espécies. Nesse ano, surgiu então, a pandemia de gripe na qual pereceram entre 50 a 100 milhões de pessoas, mais mortes do que qualquer outra pandemia global. Durante a segunda vaga da pandemia, mais grave do que a primeira, foi reportado uma doença respiratória semelhante à gripe humana nos porcos. Colocou-se a hipótese de correlação entre ambas as doenças e determinou-se que a gripe poderia ter origem suína. A partir de 1918, os vírus influenza humano e suíno divergiram antígenicamente e o H1N1 continuou a infectar humanos sazonalmente.

Em 1957, o H1N1 foi substituído por uma nova estirpe, designada por H2N2, a qual combinava material genético do H1N1 predecessor e um vírus influenza de origem aviária. Contudo, o vírus Influenza A/H1N1 ressurgiu em 1976 entre um grupo de soldados americanos. No entanto, não houve passagem para a população civil. Um ano mais tarde, outra estirpe H1N1 surgiu na China, Hong Kong e União Soviética. Este ressurgimento foi atribuído a uma libertação acidental de uma experiência laboratorial e causou uma sintomatologia ligeira em população jovem.

Desde 1977, o Influenza H1N1 tem persistido contribuindo para gripes sazonais em conjunto com a estirpe dominante H3N2 mais resistente.

Em 2009, o vírus H1N1 ressurgiu com 6 segmentos genéticos de um vírus de origem suína e 2 segmentos da linhagem do Influenza A Euro-asiática do H1N1 suíno.<sup>4</sup>

### **A1. Virologia do Vírus Influenza**

O vírus Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae*. Este vírus contém um genoma constituído por 8 segmentos de RNA que descodificam 11 proteínas. A classificação do vírus em 3 grupos específicos (A, B e C) é feita a partir do antígeno RNP:

- **Influenza A** – causam epidemias e ocasionalmente pandemias, existem num reservatório animal, nomeadamente pássaros.
- **Influenza B** – causam apenas epidemias e não envolvem hospedeiros animais.
- **Influenza C** – não causam epidemias e provocam apenas doenças respiratórias brandas.

19

A classificação do vírus Influenza A é baseada em dois antígenos específicos do vírus. Estes antígenos são duas glicoproteínas de superfície: hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Até hoje, foram identificados 16 subtipos HA (H1-H16) e 9 subtipos de NA's (N1-N9). A

nomenclatura das estirpes virais inclui a localização e o ano de isolamento (ex.: A/Filipinas/82/H3N2).<sup>19</sup>

Dentro das proteínas virais, a Hemaglutinina (HA) tem sido sujeita a vários estudos devido ao seu papel como antigénio e contra a qual a resposta imunitária de protecção é dirigida. A HA facilita a ligação do vírus aos receptores celulares do hospedeiro e a sua subsequente fusão endossomal. As unidades da polimerase e nucleoproteínas activam a replicação e transcrição do RNA viral. A libertação viral a partir da célula é facilitada pela proteína NA.<sup>5</sup>

Os vírus Influenza sofrem alterações genéticas à medida que invadem o hospedeiro. Temos 2 tipos de alterações:

- **Deriva antigénica** – pequenas mutações que ocorrem constantemente afectando os antigénios H e N. Quando as alterações destes antigénios permitem ao vírus uma multiplicação significativa em indivíduos imunes a estirpes precedentes, o novo subtipo pode reinfectar a comunidade. A deriva antigénica é um evento observado com todos os tipos de vírus influenza.
- **Inversão antigénica** – menos comum, e surge apenas com o Influenza A, ocorre uma troca repentina importante na antigenicidade dos antigénios H ou N. Este processo decorre intracelularmente quando diferentes estirpes invadem a mesma célula. Esta substituição em H ou N pode significar que a nova estirpe pode disseminar pela população imune a estirpe pré-existent, estabelecendo o caminho para uma nova pandemia. Associadas a estas alterações em H e N existem outras alterações genéticas que podem conferir um aumento na patogenicidade ou alteração na capacidade de disseminação rápida de pessoa para pessoa.<sup>19</sup>

A emergência do H1N1 de 2009 é algo sem precedentes na virologia moderna. O vírus H1N1 2009 não se enquadra na definição clássica de um novo subtipo para a qual a maioria da população não tinha experiência prévia de infecção. No H1N1 2009 não podemos associar a existência de uma deriva antigénica porque não há relação directa com o vírus H1N1 humano.<sup>5</sup>

## **A2. Epidemiologia**

A gripe sazonal é causada por uma grande variedade de estirpes de vírus, que variam de ano para ano, podendo desaparecer ou causar potenciais pandemias.

O período de incubação do vírus é, em geral, de 1-4 dias, sendo em média 2 dias. Os adultos transmitem o vírus da gripe em dia antes do começo dos sintomas e 5 dias após o aparecimento dos mesmos. As crianças transmitem o vírus durante 10 dias ou mais. Os grupos de risco do vírus influenza sazonal e que podem padecer de agravamento da doença são:

- Indivíduos com mais de 50 anos;
- Crianças entre 6-23 meses de idade;
- Mulheres grávidas durante a época da gripe;
- Residentes em lares;
- Crianças dos 6 meses ao 18 anos de idade e que têm aspirina como terapêutica durante um período alongado;
- Qualquer pessoa com mais de 6 meses com doença crónica.<sup>1</sup>

Tal como a Gripe Sazonal, o H1N1 é transmitido pelos seguintes vias: contacto directo (mão contaminada) e exposição a gotículas e aerossóis. A contribuição relativa destas vias de transmissão é desconhecida e está dependente da humidade e temperatura. Sabe-se, no entanto, que a contribuição destas vias de transmissão depende da concentração do vírus na saliva.

O período de incubação para o H1N1 é semelhante ao vírus sazonal, e dados recentes indicam que 80% dos indivíduos transmite o vírus até 5 dias depois do surgimento dos primeiros sintomas, 40% durante 7 dias e 10% durante 10 dias.<sup>4</sup>

A maioria dos casos reportados ocorreu em doentes com uma média de idades de 12 a 17 anos. Contudo, casos graves ocorreram em populações envelhecidas. Os relatórios mais recentes da pandemia indicam, contudo, que a idade média destes casos pode aumentar à medida que a gripe se espalha entre a população.<sup>6</sup>

A pandemia H1N1 surgiu na Primavera de 2009. Em Março e Abril de 2009, no México, foram registados 2155 casos de pneumonia, 821 hospitalizações e 100 mortes.<sup>6</sup> Em 11 de Junho de 2009, havia 30000 casos de H1N1 em 74 países, levando a OMS a decretar o nível 6 e, assim declarando oficialmente a pandemia H1N1 2009.<sup>4</sup>

Em Julho de 2009, o número de casos a nível mundial excedeu o milhão, com mais de 400 mortes. Concluindo-se que 10% das mortes declaradas de mulheres eram referentes a grávidas.<sup>6</sup>

### **A3. Manifestações clínicas e sintomatologia**

A sintomatologia do vírus Influenza H1N1 2009 e o vírus da gripe sazonal é similar. Um estudo realizado numa escola de Nova Iorque revelou que as manifestações mais comuns eram: tosse (98%), febre (96%), dor de cabeça (82%), dor de garganta (82%), rinorreia (82%), tremores e arrepios de frio (80%) e dores musculares (80%). Com uma menor percentagem, temos outros doentes que apresentavam náuseas (55%), diarreia (48%), dispneia (48%), dores articulares (46%) e dores gástricas (36%).<sup>4</sup>

Os doentes necessitando de hospitalização têm, na sua maioria, outras patologias associadas, tais como: asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, imunossupressão, diabetes, obesidade ou patologias cardíacas crónicas. Estes pacientes que apresentavam febre, tosse, dispneia, vômitos e/ou radiografias torácicas anormais, tinham altas hospitalares pouco após o início do internamento. Os doentes requerendo internamento nos cuidados intensivos apresentavam hipóxia e radiografias torácicas consistentes com síndrome respiratório agudo. As vítimas mortais do vírus apresentaram uma hipóxia e disfunção orgânica severa.

Estudos realizados demonstraram que doentes infectados com H1N1 tinham achados radiográficos torácicos anormais, em que uma larga maioria apresentava opacidade alveolar em 3 dos 4 quadrantes. Concluiu-se também que um terço dos doentes requerendo cuidados intensivos eram obesos.

Nos estudos *post mortem*, verificou-se a existência de co-infecção bacteriana (29%). Uma grande parte dos casos implicava uma co-infecção com *Streptococcus pneumoniae*. Contudo foram encontrados também *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis* e *Haemophilus influenzae*. A infecção bacteriana faz agravar a gripe por H1N1 entre 4 a 10 dias após a definição dos sintomas e, apresenta como sintomas tosse produtiva, febre, dispneia e achados radiológicos anormais.<sup>4</sup>

### **A4. Diagnóstico laboratorial**

De acordo com o divulgado pela OMS, o nº de mortes causada pela pandemia são mortes confirmada laboratorialmente como sendo causadas pelo vírus H1N1 e não estimativas. Por diversas razões, os números divulgados não mostram a mortalidade real durante a pandemia, a qual é superior ao indicado pelos casos confirmados laboratorialmente.

Como a gripe A mimetiza a maioria dos sinais e sintomas de muitas doenças infecciosas, o pessoal médico, por vezes, não suspeita habitualmente do H1N1 e não procede ao diagnóstico laboratorial. Esta é a realidade em países desenvolvidos onde as mortes por doenças respiratórias são ocorrências frequentes. Para além do mais, a análise para a pesquisa do H1N1 é cara e exige meios técnicos fora do alcance de muitos países.<sup>4</sup>

As guidelines da OMS recomendam, como amostra um exsudado nasofaríngeo, um exsudado orofaríngeo, um aspirado nasal ou a combinação de um nasofaríngeo e orofaríngeo. As zaragatoas devem de ser de materiais inertes. O transporte deve de ser realizado num meio de transporte viral, refrigerado e armazenado a 4°C por períodos não superiores a 4 dias.

A técnica recomendada pela OMS é o Real Time RT-PCR para a confirmação de infecção com o vírus influenza H1N1. Uma forte reactividade nesta técnica é indicativo da presença do vírus. No entanto, existem outras técnicas menos usuais e menos adequadas para a pandemia, mas que são usadas para o caso do vírus influenza sazonal:

- **Cultura Viral** – os protocolos com incubação em ovos podem ser usados, mas a sensibilidade ainda está por determinar.
- **Inibição por hemaglutinação** – eritrócitos de peru, galinha e humano aglutinam na presença de H1N1 2009. Contudo os anticorpos monoclonais existentes para o subtipo H1 não reagem por esta técnica.
- **Testes rápidos ou imunofluorescência** – a sensibilidade e especificidade dos testes rápidos ou imunofluorescência desenhados para o vírus da Influenza A ainda estão a ser avaliados. Contudo a sensibilidade registada é baixa e não diferencia a gripe sazonal da pandémica.

Assim sendo, conclui-se que os métodos de biologia molecular são os métodos de escolha para a detecção do H1N1. Os alvos usados para a detecção do vírus são os genes da matriz do vírus influenza tipo A e a hemaglutinina específica do H1N1 2009.<sup>5</sup>

## **B. Materiais e Métodos**

### **B1. Colheita**

Tal como já foi descrito anteriormente, a amostra recomendada é um exsudado nasofaríngeo, orofaríngeo, aspirado nasal ou uma combinação dos anteriores.

No entanto, e uma vez que se trata de um procedimento de risco, seguimos as recomendações da Direcção Geral de Saúde emitidas no seu site. Um dos procedimentos básicos é o uso de máscara cirúrgica no contacto com os doentes e a higienização de todas as zonas onde os doentes suspeitos possam ter tocado. Uma das recomendações é usar uma sala de colheitas própria para o efeito. O Técnico de Colheitas deverá ter uma bata de protecção completamente abotoada, luvas descartáveis e máscara cirúrgica resistente a líquidos.

Após a colheita, os tubos do meio de transporte deverão ser desinfectados com lixívia ou álcool a 70°. As batas descartáveis e a máscara deverão ser colocados no lixo contaminado.

Caso as amostras sejam colhidas fora do laboratório deverão ser transportadas a 4°, e o meio ou embalagem deverá ser bem confinada para não quebrar. O tempo máximo entre a colheita e o processamento da amostra é de 4 dias.

### **B2. Extracção e purificação**

O kit usado para a extracção e purificação de material genético do H1N1 é o Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit.

O High Pure Viral Nucleic Acid Kit serve para o isolamento de material genético viral a partir de amostras biológicas.

O princípio deste kit baseia-se no facto dos vírus, quando lisados por um detergente e Proteinase K, libertam os ácidos nucleicos virais. A seguir, na presença de um sal caotrópico, os ácidos nucleicos virais ligam-se selectivamente à fibra de vidro num tubo de centrífuga apropriado. Os ácidos nucleicos continuam ligados, enquanto se executa uma série de lavagens e spins de centrífuga para remover os contaminantes celulares. Finalmente, uma eluição com sais remove os ácidos nucleicos da fibra de vidro para um tubo. No caso do H1N1, resultou numa extracção e purificação de RNA viral.

Este processo não requer precipitação de material genético, extracção com solventes orgânicos ou um manuseamento excessivo da amostra.

A quantidade obtida é de 50 µl e dá para aproximadamente 8-14 reacções de RT-PCR.

O material obtido fica livre de vírus intactos, nucleases, e todos os componentes celulares capazes de interferir com o resultado.<sup>2</sup>

### **B3. qPCR one-step para Detecção de H1N1**

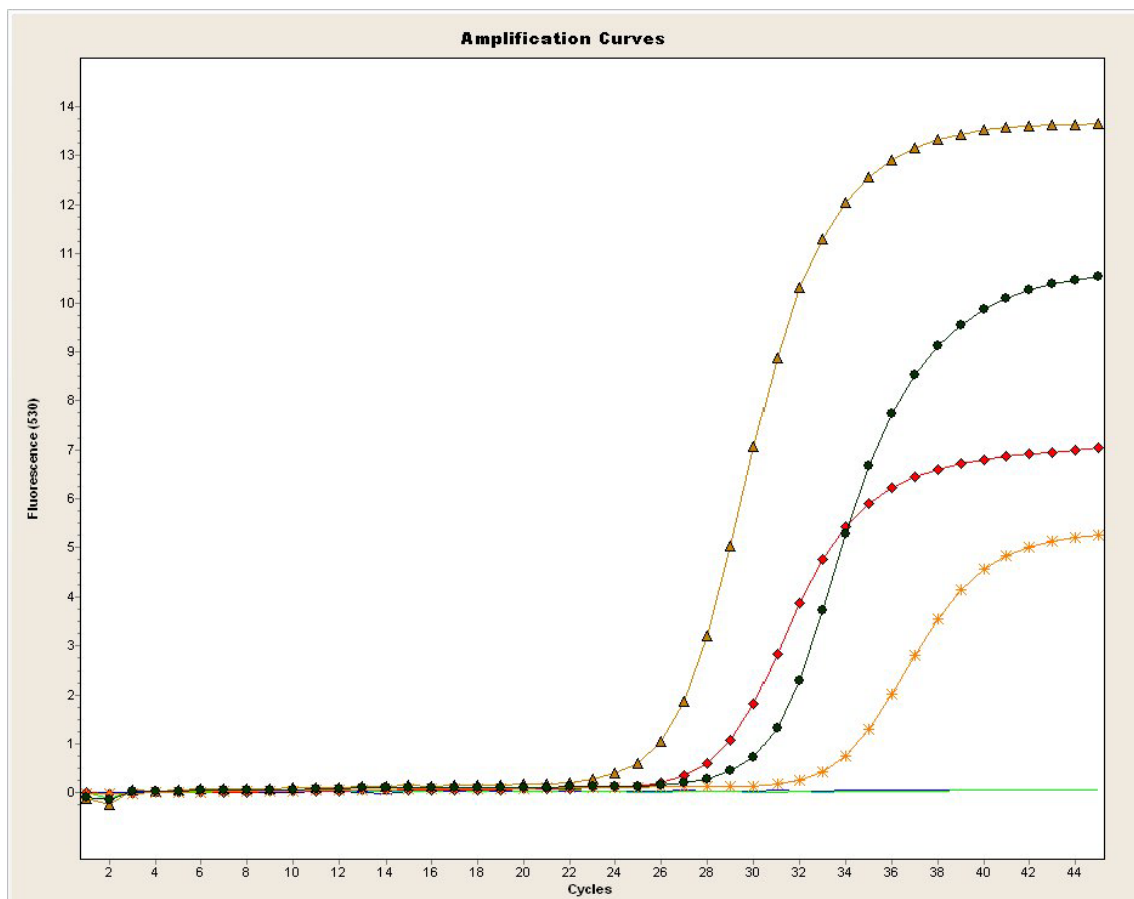
A Pesquisa de H1N1 2009 em Labamaro utiliza o kit Roche RealTime ready Influenza A/H1N1 Detection Set em combinação com RealTime Ready RNA vírus master.

O influenza H1N1 tem um gene da Neuraminidase (NA) similar ao H5N1 e gene de Hemaglutinina (HA) muito específico que pode ser usado na sua identificação. A detecção por RT-PCR do Influenza A é baseado na detecção do gene conservado da proteína de matriz 2 (M2). A respectiva detecção do subtipo é baseada na detecção do gene da Hemaglutinina HA1. Uma rede de virologistas seleccionaram e verificaram as misturas de primers/sondas de hidrólise para detectar os genes de RNA do Influenza H1N1 2009 em amostras clínicas.

O fabricante do kit recomenda um ensaio paralelo tendo como alvo o gene HA1 e o M2. Este vai servir para diferenciar o influenza H1N1 do vírus sazonal.

O par primer/probe para a detecção do gene da HA1 foi recomendado pelo Instituto Robert Koch em Maio de 2009. O Par primer/probe do gene M2 foi recomendado para a detecção da gripe das aves em 2007 pela OMS.

Para confirmar a qualidade da amostra, o sucesso da extracção e a ausência de inibidores de RT-PCR, o kit inclui um par primer/probe usado em combinação com o par A/M2. Isto permite a detecção simultânea de ácido nucleico humano, o qual serve de controlo de extracção.



**Figura 51** – Exemplo de uma curva de quantificação absoluta para o H1N1

As amostras correm sempre com um controlo positivo e um controlo negativo.

Quando se usa o kit pela primeira vez, é obrigatório usar o protocolo de Color Compensation em 530/560 nm, em combinação com um controlo de extracção para ácido nucleico humano. A cor gerada no ficheiro de color compensation é usada para compensar a detecção individual de cor ao executar experiências com dois padrões de cor. Uma calibração de Color Compensation é executada usando um branco (água), e dois capilares contendo um corante cada, seguido da análise de desnaturação.

Em relação ao RNA Vírus Master, foi desenhado contendo uma mistura de Transcriptase e Taq DNA Polimerase e uma mistura contendo tampão e MgCl<sub>2</sub>. Esta formulação é ideal para a detecção de vírus de RNA. O tampão de reacção permite um rápido e conveniente “hot start” sem pré-activação da Taq polimerase. A optimização de MgCl<sub>2</sub> não é necessária.

### **C. Análise de Resultados**

A análise dos resultados da Pesquisa de H1N1 deve ser feita por Quantificação Absoluta.

Na quantificação absoluta, o ciclo a partir do qual a fluorescência de uma amostra sobe acima da linha de base é denominado Ct (*Threshold Cycle*). Num gráfico onde temos a fluorescência vs o número de ciclos, o Ct aparece como uma curva acentuada para cima.

No caso do H1N1, considera-se que um resultado é negativo se o Ct for inferior 40 e positivo se superior ou igual a 40. No entanto, é sempre conveniente a avaliação visual das curvas.

A interpretação de resultados deve de acordo com a seguinte tabela:

| <b>Inf A M2<br/>Canal 530</b> | <b>Controlo<br/>de<br/>Extracção<br/>Canal 560</b> | <b>de<br/>Inf A/H1<br/>Canal 530</b> | <b>Interpretação</b>   |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Positivo                      | Positivo   | Positivo                             | RNA Influenza A: Detectado<br>RNA H1 2009: Detectado         |
|                               |  | Negativo                             | RNA Influenza A: Detectado<br>RNA H1 2009: Não detectado     |
| Positivo                      | Negativo   | Positivo                             | RNA Influenza A: Detectado<br>RNA H1 2009: Detectado         |
|                               |  | Negativo                             | RNA Influenza A: Detectado<br>RNA H1 2009: Não detectado     |
| Negativo                      | Positivo   | Positivo                             | Inválido   |
|                               |  | Negativo                             | RNA Influenza A: Não detectado<br>RNA H1 2009: Não detectado |
| Negativo                      | Negativo   | Positivo                             | Inválido   |
|                               |  | Negativo                             | Inválido   |

### **D. Conclusão**

A análise para pesquisa do H1N1 foi, para nós, uma maneira de começar a trabalhar com regularidade na área da Patologia Molecular. Esta evolução permitiu-nos evoluir no sentido de aplicar esta tecnologia a outras detecções.

## HLA B27

### *A. Caracterização do Antígeno HLA-B27 e fisiopatologia das espondiloartrites*

#### **A1. Classificação das espondiloartrites**

As espondiloartrites incluem a Espondilite Anquilosante, a Artrite Reactiva, artrite/espondilite associada a psoríase, e artrite/espondilite associada à Doença Inflamatória Intestinal.<sup>8</sup>

A espondilite Anquilosante (EA) é uma doença que surge habitualmente na segunda ou terceira década de vida, caracterizando-se pela inflamação da coluna e articulações sacro-ílicas, com erosões e posterior anquilose. O envolvimento de articulações periféricas ocorre em 40% dos casos. O início em idades jovens e o envolvimento sistémico são factores condicionantes de incapacidade, com importante repercussão em termos individuais e sociais.<sup>9</sup>

Os primeiros sintomas da EA surgem habitualmente na adolescência ou no adulto jovem, e consistem em: lombalgias e rigidez da coluna vertebral de carácter inflamatório, melhorando com a actividade física moderada.<sup>11</sup> A prevalência das espondiloartrites foi estudada em diferentes grupos populacionais e admite-se que possa atingir 0,2% a 0,9% em determinadas regiões.<sup>8</sup> Calcula-se que ambos os sexos sejam afectados com uma relação sexo masculino/feminino de aproximadamente de 2:1.

Nos pacientes com EA, o sintoma predominante é a dor na coluna, a qual apresenta tipicamente um aspecto inflamatório caracterizado por rigidez matinal, a qual melhora com exercício físico moderado. Em 90% dos casos a doença começa com inflamação sacro-ílica. Com o decurso da doença, toda a coluna pode ser afectada com espondilite e artrite das pequenas articulações intervertebrais. É também de referir, que nem todos os doentes com EA desenvolveram sindesmófitos. Mesmo em doentes em estado avançado da doença, os sindesmófitos encontram-se em apenas 50% dos casos, e apenas uma pequena percentagem destes doentes desenvolve um quadro clínico de coluna anquilosada.

O termo Espondilite Anquilosante surgiu por volta de 1900, quando o diagnóstico podia ser feito apenas com o recurso à experiência clínica sem ajuda da imagiologia e de resultados laboratoriais.<sup>8</sup>

Actualmente, considera-se a existência de um atraso pouco aceitável de 5 a 10 anos entre os primeiros sintomas e o diagnóstico da doença.<sup>8</sup>

Em geral, a combinação de sintomas clínicos (p.ex. dor na coluna com inflamação, uveíte ou artrite periférica), parâmetros laboratoriais (como a presença de antígeno HLA-B27 ou Proteína C Reactiva) e imagiologia (p. Ex. Ressonância magnética) são essenciais para um diagnóstico precoce.<sup>8</sup>

#### **A2. Genes do MHC e características moleculares do HLA-B27**

O MHC, ou Complexo Major de Histocompatibilidade, é formado por uma região que compreende um *loci* genético envolvido na rejeição ou não de tecidos no nosso organismo.<sup>18</sup> O MHC está localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3) numa região muito densa de genes da resposta imunitária. Aqui encontram-se os genes codificam para as proteínas dos antígenos de histocompatibilidade da Classe I e II. Existe ainda uma região intermédia designada como MHC classe III que contém genes com papel relevante no processo inflamatório.<sup>9</sup>

O HLA-B27 pertence ao grupo das moléculas de Classe I do MHC, as quais são glicoproteínas de múltiplas subunidades formadas no Reticulo Endoplasmático. Os complexos MHC I contêm uma cadeia pesada,  $\beta$ -2-microglobulina, e uma cadeia peptídica pequena (8 a 10 resíduos de aminoácidos). Logo após a sua síntese, a cadeia pesada é glicosilada alcançando assim a sua forma terciária. Posteriormente liga-se à  $\beta$ -2-microglobulina com a ajuda de moléculas chaperones formando um heterodímero. Quando o heterodímero é formado, a molécula chaperone calnexina é libertada, mas a molécula da cadeia pesada continua em interacção com o complexo peptídico de ligação, o qual contêm um antigénio associado ao transporte (oxirredutase). Os complexos formados são exportados para a superfície da célula através do complexo de Golgi, onde os resíduos de carboidratos da cadeia pesada são modificados.<sup>10</sup>

Normalmente, a estrutura terciária das moléculas do MHC I são facilmente formadas através da ajuda de chaperones. Contudo a cadeia pesada do HLA-B27 tem duas características específicas não usuais. Em primeiro lugar, taxa de torção da molecular da cadeia pesada de HLA-B27 é extremamente lenta, a qual leva à formação de cadeias pesadas defeituosas no retículo endoplasmático, mesmo na presença de chaperones,  $\beta$ -2-microglobulina e péptidos. Em segundo lugar, é capaz de formar dímeros com pontes dissulfídicas aberrantes. O *pocket B* é a região molecular MHC I onde se forma um sulco com ligações peptídicas, e o qual tem um papel essencial na selecção da ligação aos receptores.<sup>10</sup> Neste *pocket B* estão presentes os seguintes aminoácidos: histidina na posição 9 (His), treonina na posição 24 (Thr 24), ácido glutâmico na posição 45 e cisteína na posição 67 (Cys 67). Estes aminoácidos determinam a preferência do *pocket B* pela arginina para a posição P2. De facto, verifica-se que a maioria dos péptidos que se une à molécula de HLA-B27 possui uma arginina na posição P2.<sup>11</sup>

Na Base de dados IMGT/HLA são apresentados 35 alelos HLA-B27 (B\*2701-B\*2728; o alelo B\*2722 foi retirado por ser idêntico ao alelo B\*2806) correspondendo-lhes 27 proteínas diferentes. Esta discrepância deve-se à existência de alelos resultantes de mutações silenciosas ou mutações em zonas inexistentes na proteína final (B\*270501-B\*270508, B\*2713). Pensa-se que todos estes alelos evoluíram do subtipo considerado ancestral (B\*2705) por conversões génicas e, menos frequentemente, por mutações pontuais.<sup>11</sup>

Os diferentes subtipos do B27 têm uma distribuição populacional variável encontrando-se o B\*2705 na população em geral. Os subtipos mais frequentes (HLA-B\*2705, B\*2702, B\*2704 e B\*2707) conferem claramente uma susceptibilidade para a EA. O B\*2706, apenas identificado em algumas populações da Sardenha e em Italianos Continentais, parecem, pelo contrário, estar negativamente associados à EA.<sup>9</sup>

Em Portugal, a avaliação da frequência das especificidades HLA numa população de doentes com EA e numa população controlo de dadores voluntários de medula óssea revelou uma prevalência de B27 em 86% e 9,2%, respectivamente. A distribuição das especificidades alélicas do HLA-B27 parece porém ser similar nos 2 grupos, sendo o alelo B\*2705 o mais frequente.<sup>9</sup>

Tem sido apontado que mais de 95% dos indivíduos caucasianos com Espondilite Anquilosante são HLA-B27 positivos com diferentes subtipos. No entanto, na população em geral, só 1-5% dos indivíduos com HLA-B\*27 positivos desenvolvem a doença e a sua presença não explica a recorrência em termos familiares. O contributo do HLA-B27 para a susceptibilidade à doença parece oscilar apenas entre 20-50%.<sup>9</sup>

### **A3. Poder patogénico do HLA-B27: hipótese explicativas**

A proteína codificada pelo grupo de alelos B\*27 é particularmente eficaz na apresentação de antigénios. Um certo número de estudos sugere que a molécula B27 não se comporta como a maioria das moléculas da Classe I do MHC.<sup>12</sup> Existem vários modelos na tentativa de compreender o mecanismo subjacente à patogenia do mesmo:

#### **1. Mimetismo molecular e Péptido artritogénico**

Este modelo baseia-se na existência de mimetismo molecular entre um péptido de origem bacteriana, ou viral, e um fragmento de uma proteína tecidual. Assim sendo, ao haver mimetismo molecular, o desencadear da resposta imunitária surgiria quando houvesse

partilha de epitopos entre o péptido bacteriano e o péptido do próprio organismo. A apresentação de um péptido bacteriano pela molécula de HLA-B27 iria activar os linfócitos T citotóxicos ocorrendo uma reacção cruzada com as moléculas tecidulares do próprio organismo.<sup>11</sup>

## **2. Alteração estrutural da molécula HLA-B27**

Esta teoria está relacionada com a presença de uma cisteína (Cys67), desemparelhada, existente no domínio extracelular  $\alpha 1$  da maior parte dos subtipos HLA-B27. Foram propostos 3 mecanismos:

- Alteração química da Cys67 sob determinadas condições. Assim, a especificidade antigénica do HLA-B27 seria alterada. Propôs-se que a Cys67 pudesse sofrer oxidação, o que faria variar o epitopo HLA-B27, alterando a especificidade peptídica.
- Uma modificação química semelhante à anterior, a qual faria alterar as propriedades da ligação peptídica do HLA-B27. As cisteínas reactivas da posição 67 podem formar pontes dissulfito com grupos tiol, causando uma alteração conformacional da molécula HLA-B27 que, por sua vez, pode ser reconhecida pelos linfócitos T citotóxicos.
- A presença da Cys67 poderá ser responsável por características invulgares nas propriedades moleculares do HLA-B27, tal como a sua capacidade para formar dímeros. Uma das potenciais capacidades do resíduo Cys67 na molécula de HLA-B27 é a formação de homodímeros entre as cadeias pesadas, sem qualquer associação com a cadeia de  $\beta$ -2-microglobulina. Esta formação sugere uma modificação estrutural da molécula, que vai permitir a acomodação de péptidos mais longos que podem ser reconhecidos tanto por moléculas CD4+ como CD8+. Os homodímeros da molécula HLA-B27 podem, também funcionar como um ligando para os receptores das células NK, ou outros receptores e, podem ainda ser reconhecidos por anticorpos específicos.<sup>11</sup>

## **3. HLA-B27 *Misfolding* – estrutura tridimensional anómala**

Foi recentemente observado que uma molécula de HLA-B27, logo após a sua síntese, obtém a forma tridimensional e associa-se à  $\beta$ -2-microglobulina mais lentamente do que as outras moléculas HLA Classe I. A presença de cadeias pesadas não glicosiladas no citosol, em células que expressam o HLA-B27, indica que estas foram para aí transportadas por possuem estrutura deficiente. Curiosamente a má conformação das moléculas HLA-B27, ocorre mesmo em presença de uma via de estruturação funcional e de um bom processamento de antigénios, diferindo, desta forma, de outras moléculas HLA Classe I cuja deficiente conformação é resultante da insuficiência de cadeias  $\beta$ -2-microglobulina ou de péptidos. A estrutura tridimensional deficiente é menos pronunciada do que a resultante da ausência de moléculas acessórias ( $\beta$ -2-microglobulina ou péptidos), o que faz com que a sua expressão na membrana celular não seja significativamente comprometida.

O stress causado pela acumulação de proteínas com estrutura tridimensional anómala no reticulo endoplasmático pode resultar em dois tipos de respostas:

- Recrutamento de chaperones para proceder a alterações conformacionais nestas moléculas
- Activação do factor de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que, por sua vez estimula a expressão de vários genes, o que poderá resultar, em determinadas células, no momento da produção de citoquinas pro-inflamatórias.

Nesta teoria, a hipótese que se põe é o desencadear, ou o aumento, de uma resposta do sistema imunitário inato, devido ao *misfolding* do HLA-B\*27, que levaria à inflamação, independentemente da sua estrutura antigénica ou das suas propriedades no que respeita a apresentação de péptidos.<sup>11</sup>

É de considerar, no entanto, que apesar o HLA-B\*27 estar intimamente relacionado com a Espondilite Anquilosante, tem havido estudos no sentido de averiguar a relação de outros genes do MHC para o desenvolvimento da doença. O HLA-B\*60 foi indicado como um dos alelos responsáveis pelo aumento de três vezes a probabilidade de vir a desenvolver a EA em indivíduos B27 positivos. Hoje, pensa-se que este alelo ou outro em desequilíbrio possam actuar de forma independente do B27 aumentando a susceptibilidade para a EA.<sup>11</sup>

## **B. Detecção de HLA-B27: avaliação do método**

Actualmente a maioria dos testes realizados em laboratórios para detecção de HLA-B27 são estes de antígenos de superfície. No entanto, verifica-se que existem reacções cruzadas importantes com outros antígenos de superfície, especialmente o B7 ou o B40. A reacção cruzada pode comprometer a precisão dos resultados gerados em ensaios de detecção de antígenos. A técnica de PCR com recurso a curvas de desnaturação específica para o alelo HLA-B27 surge assim como referência para esta análise.<sup>16</sup>

Na selecção do método a usar no laboratório para a detecção deste antígeno, foram tidos em consideração várias variáveis, desde a técnica de PCR, ao tipo de primers a usar. Verificou-se também que para o aparelho LC não existem kits comerciais para detecção deste alelo. No entanto, existem já alguns laboratórios europeus a validar a técnica de acordo com algumas informações contidas nos artigos que vou citar ao longo deste trabalho.

### **B1. Comparação de métodos: avaliação da técnica de PCR vs citometria de fluxo**

O screening do HLA-B27 é realizado inúmeras vezes tendo em conta as suas características serológicas. Um dos métodos usados é a citometria de fluxo, contudo um dos seus maiores problemas são as reacções cruzadas de anticorpos com diferentes antígenos HLA Classe I, os quais têm uma homologia elevada dentro da mesma classe. Tendo em conta o risco potencial de resultados falso positivos, várias alternativas foram tidas em linha de conta. Uma destas alternativas é a análise genética dos antígenos HLA. Esta análise permite a diferenciação entre alelos HLA homólogos e pseudogenes neste locus.<sup>15</sup>

Já em 1995, aquando das primeiras experiências com PCR convencional nesta pesquisa, verificou-se que as técnicas de PCR tinham várias vantagens em relação á citometria de fluxo:

1. As amostras de sangue total podem ser recebidas pelo laboratório a qualquer hora e armazenadas a 4°C durante vários dias antes do DNA ser extraído. Com o método de citometria de fluxo, as amostras têm de ser preparadas para uso assim que entram no laboratório.
2. Cerca de 3% dos resultados de citometria de fluxo não são interpretáveis, principalmente devido à reactividade cruzada dos anticorpos monoclonais. Todas estas amostras necessitam de posterior confirmação por outros métodos. No caso do PCR convencional, apenas 1% tiveram problemas na amplificação do sinal.

Contudo, um dos principais problemas são as potenciais contaminações, o que leva à utilização de salas separadas para a preparação de reagentes, extracção e amplificação.<sup>15</sup>

### **B2. Comparação de métodos: PCR-SSP vs RT-PCR**

A determinação dos níveis de DNA é mais preciso e mais barato comparado com o método de citometria de fluxo. Para além destas vantagens, a tipagem é possível a partir de quase todas as amostras biológicas, mesmo contendo quantidades residuais de ácidos nucleicos.<sup>14</sup>

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a identificação do alelo HLA-B27. Os métodos de tipagem HLA baseados em PCR, incluindo o método standard de PCR com primers de sequência específica (SSP – Sequence Specific Primers), tornaram-se alternativas aos métodos serológicos na prática laboratorial. Contudo, os métodos usados actualmente têm um elevado tempo de processamento e têm tempos de processamento alongados. Os problemas referidos anteriormente têm levado à introdução progressiva do PCR em tempo real.<sup>17</sup>

Entre os procedimentos de pós-PCR incluem-se os passos de identificação, tais como a electroforese em gel e confirmação por análise de hibridação específica, a qual leva tempo e pode estar sujeita a contaminação.<sup>13</sup>

Uma das principais características do método de PCR em Tempo Real é a monitorização continua da formação de produtos de PCR. O uso do SYBR Green I, o qual se liga à dupla cadeia de DNA permite a medição da quantidade de produtos de amplificação em cada ciclo. O

sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green I é proporcional à concentração do recém-sintetizado dsDNA.<sup>14</sup>

No caso do Roche LightCycler, há uma monitorização fluorimétrica da formação de produtos de PCR durante a amplificação com SYBR Green I. Tal como foi dito anteriormente, este corante selectivo da dupla cadeia de DNA proporciona uma maneira conveniente e rápida de quantificar e detectar qualquer produto de PCR, independentemente da sequência. Durante as várias fases de síntese de DNA, o SYBR Green I incluído na mistura de reacção liga-se aos produtos de PCR amplificados, os quais podem ser subsequentemente detectados pela sua fluorescência. A especificidade e sensibilidade da reacção pode ser melhorada combinando a amplificação com identificação de comportamento em curva de desnaturação.<sup>13</sup>

A análise da curva de desnaturação foi descrita como uma das vantagens do método. A temperatura é ligeiramente mais elevada do que o ponto de desnaturação do produto de PCR, sendo medida continuamente. O SYBR Green I é libertado após a desnaturação resultando na diminuição do sinal proveniente dos dados de temperatura de desnaturação para cada fragmento de DNA amplificado. Um pico característico na curva de desnaturação (crossing point) na temperatura de formação de cadeias de ssDNA (T<sub>m</sub>) dá-nos uma identificação precisa do produto amplificado em comparação com produtos de PCR inespecíficos (ex: primer-dimers).<sup>14</sup>

Nos estudos comparativos entre PCR-SSP e Real Time PCR, verificou-se que, apesar do PCR-SSP ser mais preciso que os testes serológicos, o trabalho exigido na identificação do HLA-B27, requerendo múltiplos passos manuais, tais como a electroforese e hibridação reversa consomem tempo e estão associados a um elevado risco de contaminação durante a manipulação dos amplicons. O uso do SYBR Green I como produto de detecção não reduz a especificidade do teste. A combinação de sequências específicas de primers e análise da curva de desnaturação dos produtos de PCR leva a uma determinação precisa do genótipo HLA-B27. A adição de um controlo interno de β-globina, detectável em todas as amostras negativas permite evitar os resultados falso negativos e provar que as condições de PCR foram cumpridas.<sup>14</sup>

A comparação de resultados do protocolo LightCycler com PCR-SSP verificou que há um “match” perfeito entre os ambos. Num estudo realizado por Temann et al, num total de 300 amostras, 63 eram HLA-B27 positivas e 237 eram negativas usando o método de PCR-SSP e real time PCR.<sup>14</sup>

Num outro estudo, em 100 indivíduos, verificou-se a mesma concordância. Os genótipos eram completamente concordantes e a única variação menor foi verificada na obtenção de sinais diferentes em extracções diferentes de DNA para um mesmo indivíduo.

## **C. Estudo da adaptação da técnica para pesquisa de HLA-B27 para Real Time PCR**

Após a avaliação sobre qual a técnica a utilizar, chegou-se à conclusão que a melhor opção seria a aplicação de uma técnica de Real Time PCR, usando o Roche LightCycler.

Nos vários passos da técnica a estudar, temos de considerar a extracção e as condições de amplificação. Todas elas necessitam de posterior acerto das condições de reacção, assim como de validação do método.

### **C1. Extracção**

O passo da extracção é um dos mais importantes para conseguir chegar às condições ideais da técnica de PCR. Tal como foi dito anteriormente, foram verificados sinais diferentes na amplificação com diferentes extracções do mesmo produto.

Uma das condições principais para a realização desta técnica é precisamente o valor máximo de DNA extraído e a optimização da concentração de magnésio, pois este último pode ser quelatado pelo EDTA. Desta maneira vamos evitar a variabilidade na análise de ponto de desnaturação.

### **C2. Amplificação**

Neste momento, a escolha do método recaiu sobre o Real Time PCR sem sondas e com a utilização do SYBR Green I. Os primers usados que irão amplificar os codões 91-136 serão o E91S e o 136AS, os quais produzem um produto de 135pb a partir do DNA genómico. Como controlo interno teremos os primers da  $\beta$ -globina PCO4 e GH20, os quais produzem um produto de 268pb. O tampão de reacção usado com a Taq Polimerase será o LightCycler DNA master SYBR green I da Roche. A concentração final de  $Mg^{2+}$  e dos primers terá de ser ajustada face aos resultados obtidos. Tendo em conta o volume do capilar, a reacção decorrerá em 20  $\mu$ L.

A reacção de PCR aconselhada pela literatura é:

- 1 passo de desnaturação a 95°C por 30s;
- 45 ciclos de amplificação a 95°C/0s, anelling a 57°C/5s e extensão a 72°C/10s;

As temperaturas de transição estarão programadas a 20°C/s. Após a amplificação, a curva de desnaturação será obtida por arrefecimento da mistura a 65°C por 15s e depois o aquecimento a 95°C com uma taxa de 0,1°C de rampa.

As curvas de desnaturações são convertidas a partir da derivada da fluorescência. Os picos de desnaturação do  $\beta$ -globina e HLA-B27 serão aos 87,2°C e 90,2°C.

O tempo máximo de duração da reacção excluindo a extracção é de aproximadamente 45 minutos.

## **D. Conclusão**

A aplicação da técnica da Pesquisa de HLA-B27 ainda está sujeita a algumas alterações, em especial no que concerne à extracção. Uma vez que existem no mercado diversos kits de extracção de DNA genómico, esta avaliação ainda está a decorrer. A padronização da metodologia de PCR será sujeita a validação e experimentação, uma vez que as condições variam de laboratório para laboratório. Neste momento, existem já alguns kits vendidos a nível internacional, mas não comercializados em Portugal. Por essa razão, é necessário proceder a uma escolha rigorosa dos reagentes a usar, assim como manter a os custos dentro do economicamente aceitável.

## Bibliografia

### **PARTE 1**

1. Sónia Raquel Mota Faria. Relatório da Especialidade em Análises Clínicas, Ordem dos Farmacêuticos, Dezembro 2006

### **PARTE 2**

1. Roche Pack Inserts. In: Roche Applied Science. Disponíveis em [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
2. PCR Applications Manual. In: Roche Applied Science. 3<sup>rd</sup> Ed. Frankfurt. Disponível em: [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
3. Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan V K. Emerging influenza virus: A global threat.. J. Biosci. 2008; November: 475-482
4. Sullivan S T, Jacobson R M, Dowdle W R, Poland G A. 2009 H1N1 Influenza. Mayo Clin Proc. 2010; 85(1): 64-76
5. Shaw M W, Arden N H, MaassabH F. New aspects of influenza virus. Clin Microbiol Rev. 1992, January: 74-92
6. Gordon S M. Update on 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. Cleve Clin J Med. 2009 Oct; 76(10): 577-82
7. Mims, Playfair, Roitt, Wakelin, Williams. Microbiologia Médica. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole Lta.; 1999
8. Sieper J. Developments in the scientific and clinical understanding of the spondyloarthritides. Arthritis Res Ther. 2009, 11:208
9. Santos F M P, Bastos E, Ligeiro D, Mourão A F, Chaves R, Trindade H, Guedes-pinto, H, Branco J C. Espondilite Anquilosante e sua base genética. Acta Reum Port. 2007, 32: 243-252
10. Vahamiko S, Penttinen M A, Granfors K. Aetiology and pathogenesis of reactive arthritis: role of non-antigen-presenting effects of HLA-B27. Arthritis Res Ther. 2005, 7:136-141
11. Peixoto M J, Gonzales T, Spinola A R C, Mora M G, Brehm A, Santos M R. Polimorfismo do alelo HLA-B27 no desenvolvimento das espondiloartropatias. Acta med Port, 18:283-294
12. McMichael A, Bowness P. HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondiloarthritis. Arthritis Res. 2002, 4 (suppl 3): S153-S158
13. Bon M A M, Oeveren-Dybicz A, van den Berg F A J T M. Genotyping of HLA-B27 by Real-Time PCR without Hybridization Sondas. Clin Chem. 2000,46:1000-1002
14. Tiemann C, Vogel A, Dufaux b, Zimmer M, Krone JR, Hagedorn HJ. Rapid DNA Typing of HLA-B27 Allele By Real-Time PCR using LightCycler Technology. Clin Lab. 2001, 47:131-134
15. Steffens-nakken H M, Zwart G, Bergh F A J T M. Validation of Allele-Specific polymerase Chain Reaction for DNA Typing of HLA-B27. Clin Chem. 1995, 41/5: 687-692
16. Seipp M T, Erali M, Wies R L, Wittwer C. HLA-B27 Typing: Evaluation of an allele-specific PCR Melting assay and Two Flow Cytometric Antigen Assays. Clin Cyto. 2005, 63B: 10-15
17. Cho E H, Lee s G, Seok J H, Park B Y N, Lee E H. Evaluation of two commercil HLA-B27 Real Time PCR Kits. Korean J Lab Med. 2009; 29:589-93
18. Roit, Brostoff, Male. Immunology. 5<sup>th</sup> Ed. London: Mosby; 1998