

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



# O PAPEL DO LABORATÓRIO NO DIAGNÓSTICO E NA CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS NEUROTROPICO *WEST NILE*

ANA ISABEL PORFÍRIO SOARES

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

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

2017



# *Parte I*



*“There should be no boundaries to human endeavor. We are all different. However bad life may seem, there is always something you can do, and succeed at. While there's life, there is hope.”*

Stephen Hawking



## PREFÁCIO

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, foi realizado o Estágio Curricular, como parte fundamental para persecução e conclusão dos estudos académicos. O mesmo decorreu no Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Miraflores, e o presente relatório descreve as atividades desenvolvidas no decorrer do estágio ao longo de cerca de 1 ano curricular.

O relatório em causa intitulado “*O papel do laboratório no diagnóstico e na caracterização do vírus neurotrópico West Nile*” apresenta-se dividido em quatro partes essenciais:

A Parte I, apresenta o prefácio, os resumos em Português e Inglês, a lista de siglas e abreviaturas e os índices de figuras e tabelas;

A Parte II, corresponde à descrição sumária de todas as atividades desenvolvidas nas valências laboratoriais do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, nomeadamente, Hematologia, Bioquímica, Química Clínica, Imunologia e Microbiologia. Todos as técnicas e sistemas automatizados apresentados neste relatório dizem respeito aos existentes e utilizados durante o período em que o estágio foi realizado.

Na Parte III, expõe-se a monografia desenvolvida paralelamente ao estágio curricular, denominada “*O papel do laboratório no diagnóstico e na caracterização do vírus neurotrópico West Nile*”.

Por último, na Parte IV, apresentam-se as conclusões e perspetivas futuras.

Este relatório encontra-se redigido de acordo com o disposto no Artigo 37.º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, nº 134/2016, DR, 2.ª série — N.º 26, de 8 de fevereiro de 2016.

## RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas no decorrer do Estágio Curricular Laboratorial realizado no Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Miraflores, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio desenvolveu-se nos seguintes sectores laboratoriais: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Química Analítica e Microbiologia.

O estágio profissional revela-se parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, assumindo como principais pressupostos:

1. Promover a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde.
2. Integrar os conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho.
3. Desenvolver no aluno a capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa.
4. Promover o contacto com os doentes aplicando princípios éticos e deontológicos.

**Palavras-chave:** Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Química Analítica e Microbiologia, Faculdade de Farmácia

## ABSTRACT

This work aims to describe the most important activities developed during the academic traineeship at Laboratory Dr. Joaquim Chaves in Miraflores, associated with my Master's degree at Análises Clínicas. The traineeship has been developed in the following laboratory sectors: Hematology, Biochemistry, Immunology, Analytical Chemistry and Microbiology.

This academic traineeship it's must necessary to conclude the Master Degree in Análises Clínicas at Faculdade de Farmácia of Universidade of Lisboa and that takes the following assumptions:

1. Promote integration in the middle professional and contact with other health professionals.
2. Integrate the knowledge acquired in a work context.
3. Develop any student to multidisciplinary work and capacity team.
4. Promote the contact with patients applying the ethical and deontological principles.

**Keywords:** Hematology, Biochemistry, Immunology, Clinical Chemistry, Microbiology, Faculdade de Farmácia.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### Parte II

*Relatório de Estágio – Laboratório Dr. Joaquim Chaves*

Ac - Anticorpo

ACTH - Adrenocorticoestimulina

ADP - Adenosina Difosfato

AD - Doença de Alzheimer

AFP - Alfa-Fetoproteína

Ag - Antígeno

ALT - Alanina aminotransferase

aPTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

AT - Antitrombina Funcional

AST - Aspartato aminotransferase

AVC – Acidente Vascular Cerebral

Baso – Basófilos

CBC - Contagens completas de sangue

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

CHGM - Concentração de hemoglobina globular média

CMI - Concentração mínima inibitória

CMV – Citomegalovírus

CSF - *Cerebrospinal fluid*

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

ECLIA - Tecnologia de eletroquimioluminescência

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIA - Imunoensaio Enzimático

FA - Fosfatase alcalina  
Fem – Força eletromotriz  
fL - Fentolitros  
FSH - Hormona folículo-estimulante  
GB - Glóbulos brancos  
GC - Cromatografia Gasosa  
GGT - Gama glutamil transpeptidase  
GN - Gram negativo  
GV - Glóbulos Vermelhos  
HAV - Vírus da hepatite A  
Hb - Hemoglobina  
HbA1c - Hemoglobina Glicada  
hCG - Gonadotrofina coriônica humana  
HCV - Vírus da hepatite C  
HDL - *High-density lipoprotein*  
HDW - *Hemoglobin concentration Distribution Width*  
HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Definição  
Ht - Hematócrito  
G6P - Glicose-6-fosfato  
IgA - Imunoglobulina A  
IgG - Imunoglobulina G  
IgE - Imunoglobulina E  
IgM - Imunoglobulina M  
INSA - Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge  
INR - Razão Normalizada Internacional  
ISE - Eléttodos seletivos de iões  
IV - Infravermelho  
LCR - Líquido cefalorraquidiano  
LDL - *Low-density lipoprotein*

LJC - Laboratório Dr. Joaquim Chaves  
LH - Hormona luteínica  
MCHC - *Mean Cell Hemoglobin Concentration*  
MCV - Mean cell volume  
MO – Medula Óssea  
nm – nanómetros  
NK - *natural killer*  
OD - *Outside diamentar*  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PAI – Pesquisa de Anticorpos Irregulares  
PLT - Plaquetas  
Perox - Peroxidase  
PTOG - Prova de Tolerância Oral á Glucose  
RBC - Eritrócitos  
RDW - Red cell volume Distribution Width  
RE – Retículo Endoplasmático  
Retic – Reticulócitos  
SPE - Solid Phase Extration  
SPR - Recetáculo de Fase Sólida  
T3 - Triiodotironina  
T4 – Tiroxina  
TFPI - Inibidor do Fator Tissula  
TP - Tempo de Protrombina  
TRAP+ - Fosfatase ácida resistente ao tartarato  
TSA - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos  
TSH - Hormona estimulante da tiróide  
TT - Tempo de Trombina  
UFC – Unidades Formadoras de Colónias / *Unified Fluids Circuit*  
UK – NEQAS *United Kingdom External Quality Assessment Schemes*  
VDRL - *Veneral Disease Research Laboratory*

VGM - Volume globular médio

VS - Velocidade de sedimentação

VWF - Fator de von Willebrand

## Parte III

### *O papel do laboratório no diagnóstico e na caracterização do vírus neurotrópico West Nile*

AC – Alterações Climáticas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

CEVDI - Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

DEET - N,N-dietil-m-toluamida

DNI - Doença Neuroinvasiva

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECP - Efeito Citopatogénico

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EUA - Estados Unidos da América

IFA - *Indirect Fluorescent Antibody*

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Definição

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

MNO - Meningite do Nilo Ocidental

NCR - Regiões Não Codificantes

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PFA - Paralisia Flácida Aguda

PRNT - *Plaque-Reduction Neutralizing Test*

RE - Retículo Endoplasmático

RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

REVIVE - REde de Vigilância de VEtores

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SIAM - *Scenarios, Impacts and Adaptation Measures*

SNC - Sistema Nervoso Central

TBEV - *Tick-Borne Encephalitis Virus*

UE - União Europeia

VBORNET - *European Centre for Disease Prevention and Control no Programme on emerging and vector-borne diseases*

WNV - *West Nile Virus (Vírus West Nile)*

WN - *West Nile*

WNE - Encefalite do *West Nile*

# ÍNDICE GERAL

<b>PARTE I.....</b>	
Prefácio.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	ix
Índice Geral .....	xv
Índice de Figuras .....	xvii
Índice de Tabelas .....	xxii
<b>PARTE II.....</b>	
I. Introdução .....	3
II. Áreas Laboratoriais .....	11
A. Core Laboratorial – Hematologia e Imunohematologia .....	11
B. Core Laboratorial – Bioquímica e Imunologia .....	58
C. Química Analítica .....	85
D. Imunologia .....	93
E. Microbiologia .....	115
III. Bibliografia .....	147
<b>PARTE III.....</b>	
I. Resumo .....	153
II. Abstract .....	154
III. Material e Métodos .....	155
IV. Introdução .....	156
V. Infecções Transmitidas por Vetores e Alterações Climáticas .....	158
A. Caracterização e Taxonomia dos Culicídeos .....	165
B. Bioecologia e ciclo de vida dos mosquitos.....	167
VI. O Vírus <i>West Nile</i> .....	169
A. Ação Patogénica dos Vírus em Geral .....	169
B. Caracterização do Vírus <i>West Nile</i> .....	172

C. Dados Epidemiológicos .....	176
D. Transmissão e Patogénese do Vírus <i>West Nile</i> .....	180
E. Fisiopatologia da Infecção .....	186
F. Manifestações Clínicas .....	189
G. Tratamento Clínico .....	191
H. Vacina.....	192
VII. Diagnóstico Laboratorial do Vírus <i>West Nile</i> .....	194
VIII. Controlo e Prevenção do Vírus <i>West Nile</i> .....	202
IX. Conclusão .....	210
X. Bibliografia .....	211
<b>PARTE IV</b> .....	
Conclusões e perspetivas futuras .....	219

# ÍNDICE DE FIGURAS

## PARTE II

### *Relatório de Estágio – Laboratório Dr. Joaquim Chaves*

Figura 1 – Esfregaços Sanguíneos - inadequado e adequado .....	17
Figura 2 – Anisocitose, macrocitose e microcitose .....	20
Figura 3 - Hipocromia .....	20
Figura 4 - Hiperchromia.....	20
Figura 5 - Anisocromia .....	20
Figura 6 - Policromatofilia.....	20
Figura 7 - Dimorfismo .....	21
Figura 8 - Poiquilocitose .....	21
Figura 9 - Eliptócitos.....	21
Figura 10 - Esferócitos .....	21
Figura 11 - Estomatócitos.....	21
Figura 12 - Dianócitos .....	21
Figura 13 - Drepanócitos .....	22
Figura 14 - Equinócitos.....	22
Figura 15 - Pontuado Basófilo .....	22
Figura 16 - Corpos de Howell Jolly .....	22
Figura 17 - Rouleaux.....	22
Figura 18 - Corpos de Heinz.....	23
Figura 19 – Representação de Esfregaço Sanguíneo .....	26
Figura 20 - Leucócitos: (a) Neutrófilo hipersegmentado (b) Eosinófilo (c) Basófilo .....	27
Figura 21 – Teste de Coombs .....	34
Figura 22 - Cascata da Coagulação (McFarlane) .....	39

Figura 23 - ADVIA 2120 Hematology System.....	45
Figura 24 - ADVIA Autoslide Slide Maker Stainer .....	46
Figura 25 - ADVIA 2120 Câmaras de reação .....	46
Figura 26 - Citograma Perox ADVIA 2120 Hematology System .....	48
Figura 27 - Canal Baso ADVIA 2120 Hematology System.....	49
Figura 28 - ADVIA AutoSlide Maker .....	50
Figura 29 - VES Matic Cube 80 .....	50
Figura 30- Bio-Rad Variant II.....	51
Figura 31 - Ortho AutoVue®.....	52
Figura 32 - Sistema de Cassetes .....	52
Figura 33 - Constituintes e reação no interior da câmara .....	52
Figura 34 – Resultados Possíveis .....	53
Figura 35 - BCS® XP System .....	53
Figura 36 - Kit AVITEX-SLE® OMEGA.....	55
Figura 37 - Chrono-log ® 700 Aggregometer.....	57
Figura 38 - Clinitek Atlas®.....	59
Figura 39 - SYSMEX UF-1000I™ .....	63
Figura 40 - Citometria de Fluxo Fluorescente.....	63
Figura 41 - Células epiteliais de descamação .....	65
Figura 42 - Células epiteliais de “transição” na urina .....	66
Figura 43 - Células tubulares renais na urina .....	66
Figura 44 - Eritrócitos na urina .....	67
Figura 45 - Leucócitos na urina .....	67
Figura 46 - Cilindros na urina .....	68
Figura 47 - Cristais na urina .....	68
Figura 48 - Advia ® 2400 Chemistry System.....	69
Figura 49 - Advia ® Centaur CP Chemistry System .....	76

Figura 50 - Immulite 2000 Immunoassay System.....	77
Figura 51 - Capillarys 2 Sebia .....	78
Figura 52 – Perfil Eletroforético .....	79
Figura 53 - Perfil Eletroforético Cirrose Hepática.....	80
Figura 54 - Perfil Eletroforético Síndrome Nefrótico.....	80
Figura 55 - Perfil Eletroforético Inflamação Aguda.....	80
Figura 56 - Perfil Eletroforético Inflamação Crónica.....	80
Figura 57 - Perfil Eletroforético Deficiência em alfa-1-antitripsina.....	81
Figura 58 - Perfil Eletroforético Imunodeficiência.....	81
Figura 59 - Perfil Eletroforético Gamopatia Monoclonal.....	81
Figura 60 - Hydrasys® Sebia .....	82
Figura 61 - Cobas ® e411 Roche .....	83
Figura 62 - Tecnologia ECLIA .....	84
Figura 63 - Principais Métodos Instrumentais em Química Analítica .....	85
Figura 64 - GFA – 7000A Shimadzu® .....	86
Figura 65 - Varian Vista MPX – ICP/OES.....	87
Figura 66 - Espectro de Infravermelhos.....	88
Figura 67 - Esquema simplificado de um equipamento de feixe .....	89
Figura 68- Componentes básicos de um instrumento para cromatografia em fase gasosa ..	91
Figura 69 - Componentes básicos de um sistema de HPPLC .....	92
Figura 70 - HPLC Shimadzu® .....	92
Figura 71 - BN ProSpec® Siemens .....	99
Figura 72 - Princípio do teste INNOTEST hTau Ag .....	103
Figura 73 – Tira do Teste Deciscan HCV Plus .....	109
Figura 74 - Vidas ® Biomerieux.....	112
Figura 75 – Procedimentos para a deteção de C. difficile.....	114
Figura 76 - Meios CPS3 com crescimento de E.Coli .....	117

Figura 77 - BacT/ALERT® 3D 60 bioMérieux e meios/frascos de cultura .....	135
Figura 78 - Ilustração do funcionamento do BacT/ALERT® .....	136
Figura 79 - Colorações dos frascos de cultura .....	136
Figura 80 - GENbag Anaer bioMérieux® .....	137
Figura 81 - Vitek 2® BioMérieux.....	143

### PARTE III

#### *O papel do laboratório no diagnóstico e na caracterização do vírus neurotrópico West Nile*

Figura 1 - As viagens, trocas comerciais e as alterações climáticas influenciam a distribuição das doenças transmitidas por mosquitos vetores. ....	160
Figura 2 - Principais espécies de mosquitos transmissores de doença presentes na Europa. ....	163
Figura 3 - Representações das diferentes fases do Ciclo de Vida do Mosquito.....	167
Figura 4 - Genoma Viral e Estrutura do Virião de WNV .....	173
Figura 5 - Representação do ciclo de vida do vírus <i>West Nile</i> no interior da célula do hospedeiro .....	175
Figura 6 - Distribuição de casos de febre do vírus WN por áreas afetadas, Europa e Bacia do Mediterrâneo a 1 de Dezembro de 2016 .....	179
Figura 7 - Ciclo de Transmissão do Vírus <i>West Nile</i> .....	181
Figura 8 - Incubação extrínseca e intrínseca do vírus <i>West Nile</i> .....	182
Figura 9 - Ciclo de Vida do Mosquito da espécie <i>Culex</i> .....	183
Figura 10 - Patogénese do Vírus <i>West Nile</i> em humanos .....	188
Figura 11 - Cinética de início de virémia e resposta imunológica de arbovírus.....	198
Figura 12 - Concelhos com colheitas de mosquitos adultos e imaturos no âmbito do REVIVE (2011-2016).....	207
Figura 13 - Distribuição geográfica de <i>Culex pipiens</i> .....	208
Figura 14 - Situação atual da vigilância de vetores de espécies invasivos na Europa .....	209

## ÍNDICE DE TABELAS

### PARTE II

#### *Relatório de Estágio – Laboratório Dr. Joaquim Chaves*

Tabela 1- Eritrograma .....	12
Tabela 2 – Índices Globulares .....	13
Tabela 3 - Alterações Qualitativas nos glóbulos vermelhos .....	19
Tabela 4 – Classificação Geral das Anemias .....	24
Tabela 5 – Alterações Quantitativas nos Glóbulos Brancos .....	29
Tabela 6 – Alterações Morfológicas dos Glóbulos Brancos .....	30
Tabela 7 – Sistema Sanguíneo ABO .....	33
Tabela 8 – Resumo Proteínas da Coagulação .....	38
Tabela 9 - Avaliação de alterações hemostáticas com três testes globais.....	44
Tabela 10 - Classificação fenotípica das hiperlipidemias (Fredrickson) .....	73
Tabela 11 - Classificação etiológica das Hiperlipidémias Primárias – bases genéticas e metabólicas .....	74
Tabela 12 – Avaliação Quantitativa do Teste Anti- Campylobacter jejuni IIFT .....	101
Tabela 13 – Interpretação do Resultados Teste Deciscan HCV Plus .....	111
Tabela 14 – Exemplos de interpretação de resultados Teste Deciscan HCV Plus.....	111
Tabela 15 - Tabela Resumo Meios de Cultura .....	139
Tabela 16 - Mecanismos de Resistência Intrínseca de algumas bactérias na presença de certos antibióticos.....	146



# *Parte II*

RELATÓRIO DE ESTÁGIO - LABORATÓRIO DR. JOAQUIM CHAVES

ESTÁGIO COORIENTADO PELO DR. CARLOS CARDOSO



# RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO

LABORATÓRIO DR. JOAQUIM CHAVES - MIRAFLORES

## I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular decorreu no Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Miraflores, em regime pós-laboral, tendo iniciado no dia 2 de Fevereiro de 2015 e terminado no dia 1 de Março de 2016. Ao longo desses meses foi possível conhecer as atividades práticas laboratoriais e aprofundar conhecimentos nas diversas áreas que compõem as Análises Clínicas e a Saúde Pública, designadamente, Hematologia, Bioquímica, Química Analítica, Imunologia e Microbiologia.

Neste documento serão apresentadas as principais técnicas (quer manuais quer automatizadas) desenvolvidas ao longo do estágio laboratorial, bem como a identificação de alguns sistemas automatizados disponíveis no laboratório na altura da realização do estágio, acompanhadas de algumas fundamentações teóricas relativas aos achados laboratoriais com valor patológico e semiológico, que se julga com maior interesse face aos pressupostos do Mestrado em Análises Clínicas. Deste modo, o presente trabalho encontra-se dividido em capítulos que correspondem às diferentes valências laboratoriais com as quais pude contactar.

As áreas onde permaneci durante mais tempo ao longo do período de estágio serão, naturalmente, aquelas que irei desenvolver mais aprofundadamente neste relatório (Hematologia, Bioquímica e Imunologia).

As imagens mostradas na Parte II do presente documento foram obtidas a partir da bibliografia indicada nas unidades curriculares de Hematologia I e II, Bioquímica Clínica I e II, Metodologias Analíticas e Imunologia do Mestrado de Análises Clínicas, bem como dos folhetos informativos e *datasheets* das técnicas e equipamentos disponibilizadas pelo próprio Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

## APRESENTAÇÃO INSTITUCIONAL

*“Com uma capacidade de resposta multidisciplinar disponibiliza mais de 4200 parâmetros analíticos, garantindo uma cobertura de 24 horas e resultados em tempo útil, contribuindo para um diagnóstico fundamentado, rigoroso e de elevada qualidade.”*

(in <http://www.joaquimchaves.pt/analises-clinicas/apresentacao>)

O Laboratório Dr. Joaquim Chaves (LJC) desenvolve a sua atividade no âmbito do diagnóstico laboratorial. O Laboratório sediado em Miraflores recebe amostras biológicas das Clínicas que integram o Grupo Joaquim Chaves, de diversos postos de colheitas pertencentes ao mesmo Grupo, de outros laboratórios privados e de hospitais. A Direção Técnica do Laboratório encontra-se a cargo do Dr. Carlos Cardoso, Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas.

O LJC encontra-se dividido nas áreas Pré-Analítica (que inclui a receção de utentes, colheita de amostras biológicas e triagem), Analítica (processamento e execução das técnicas de análises clínicas) e Pós-Analítica (validação biopatológica, emissão do boletim de resultados e entrega do mesmo ao utente).

A área Pré-Analítica assume extrema importância já que dela depende a obtenção correta das amostras que serão posteriormente processadas no laboratório e portanto, obrigatoriamente, tem de ser executada com o máximo rigor e cautela. Deste modo, os técnicos de colheitas devem conhecer profundamente o Manual de Colheitas para garantir a obtenção de amostras biológicas fiáveis e com valor semiológico fidedigno.

A área da Triagem reveste-se de enorme importância para o controlo da fase pré-analítica no laboratório, passando pela verificação da identificação e testes pedidos, tratamento, e manipulação das amostras biológicas e registo de eventuais falhas que conduzem à rejeição das amostras. Os critérios de rejeição das amostras são estabelecidos com fundamento na observação critério, nomeadamente, nos casos em que as amostras apresentem coágulos evidentes, amostras em tubos inadequados relativamente ao teste a executar ou quando a relação entre o anticoagulante e a amostra recolhida não é respeitado. Para além disso, há que ter especial atenção às amostras que apresentem volume insuficiente para os parâmetros a analisar ou que possam ter sido armazenadas inadequadamente.

Na fase Análítica é cumprida uma sequência de procedimentos, que têm por objetivo, a partir de amostras biológicas, obter resultados ou valores de um ou vários analitos nelas presentes (Ex: Urina tipo II, Exames bacteriológicos, Pesquisa eosinófilos, Colesterol, etc.). Inicia-se com a chegada das amostras biológicas aos vários setores analíticos (desde a triagem ou das salas de colheitas), decorre enquanto as amostras biológicas estão a ser processadas nos vários sistemas analítico e termina quando se obtêm todos os resultados analíticos e estes são validados por um técnico superior competente.

No que diz respeito à área Analítica, o LJC apresenta-se dividido nas seguintes valências:

- Core Laboratorial: Hematologia; Imunologia e Bioquímica
- Química Analítica
- Microbiologia
- Radioimunoensaio
- Química Analítica
- Biologia Molecular
- Genética Humana

Sendo o objetivo principal do Laboratório de Análises Clínicas fornecer informação clinicamente relevante e útil aos seus utentes, deve portanto fornecer dados com qualidade, obtidos em tempo útil e de forma perceptível e interpretável por parte do doente. Assim, a fase Pós-Analítica, isto é, a validação dos resultados obtidos nas diferentes práticas laboratoriais, revela-se de igual modo crucial para a garantia da qualidade em Laboratório.

Esta última etapa é, essencialmente, da responsabilidade dos Farmacêuticos e Patologistas Clínicos e materializa-se na validação analítica, que pode ser realizada pelo pessoal que executou a análise sobre supervisão do especialista, e uma validação biopatológica, que é da competência exclusiva do especialista. A validação analítica das análises deve ser feita segundo procedimentos escritos e pressupõe a verificação dos indicadores de bom funcionamento dos instrumentos e o conhecimento dos resultados do controlo da qualidade interno. A validação biopatológica deve assegurar sempre que possível a compatibilidade dos resultados no mesmo doente ao longo do tempo, tendo em consideração quando aplicáveis, as variações do seu estado clínico e a terapêutica efetuada.

No Laboratório Joaquim Chaves, encontra-se instituído o serviço interno de segurança e saúde no trabalho, de acordo com a Lei n.º102/2009 (regulamenta o Regime Jurídico da promoção da segurança e saúde no trabalho).

A atividade do serviço de segurança e de saúde no trabalho visa, e de acordo com tal Lei:

- a) Assegurar as condições de trabalho que salvaguardem a segurança e a saúde física e mental dos trabalhadores;*
- b) Desenvolver as condições técnicas que assegurem a aplicação das medidas de prevenção;*
- c) Informar e formar os trabalhadores no domínio da segurança e saúde no trabalho;*
- d) Informar e consultar os representantes dos trabalhadores para a segurança e saúde no trabalho ou, na sua falta, os próprios trabalhadores.*

O serviço de segurança e de saúde no trabalho deve tomar as medidas necessárias para prevenir os riscos profissionais e promover a segurança e a saúde dos trabalhadores, nomeadamente:

- a) Planear a prevenção, integrando a todos os níveis e, para o conjunto das atividades da empresa, a avaliação dos riscos e as respetivas medidas de prevenção;*
- b) Proceder a avaliação dos riscos, elaborando os respetivos relatórios;*
- c) Participar na elaboração do plano de emergência interno, incluindo os planos específicos de combate a incêndios, evacuação de instalações e primeiros socorros;*
- d) Colaborar na conceção de locais, métodos e organização do trabalho, bem como na escolha e na manutenção de equipamentos de trabalho;*
- e) Supervisionar o aprovisionamento, a validade e a conservação dos equipamentos de proteção individual, bem como a instalação e a manutenção da sinalização de segurança;*
- f) Realizar exames de vigilância da saúde, elaborando os relatórios e as fichas, bem como organizar e manter atualizados os registos clínicos e outros elementos informativos relativos ao trabalhador;*
- g) Conceber e desenvolver o programa de formação para a promoção da segurança e saúde no trabalho;*
- h) Analisar as causas de acidentes de trabalho ou da ocorrência de doenças profissionais, elaborando os respetivos relatórios.*

A segurança no trabalho diz respeito a todo o pessoal do laboratório de análises clínicas, sendo que os procedimentos de segurança e as precauções devem ser parte da rotina laboratorial, devendo ser cuidadosamente planejados e descritos. De acordo com a Portaria nº166/2014, de 21 de agosto – que *estabelece os requisitos mínimos relativos à organização e funcionamento, recursos humanos e instalações técnicas dos laboratórios de patologia clínica/análises clínicas e, bem assim dos respectivos postos de colheitas, os laboratórios de patologia clínica/análises clínicas* garantir as exigências e boas práticas de Segurança e Saúde no Trabalho, devendo elaborar e conservar entre outros o Manual de Higiene e Segurança do próprio Laboratório.

É da responsabilidade do diretor técnico, entre outras funções, colaborar no estabelecimento das normas referentes à proteção da saúde e à segurança do pessoal, bem como respeitar as especificações referentes à proteção do ambiente e da saúde pública e velar pelo seu cumprimento. Desta forma, o cumprimento das Regras e Procedimentos de Segurança no Trabalho instituídas no laboratório, durante todas as fases de atividades (desde a recepção de material, às práticas laboratórias até à limpeza das instalações), devem ser assumidas como fundamentais por todos os trabalhadores. Estas regras abrangem os requisitos técnicos, requisitos de higiene e limpeza e a Segurança Biológica. No Laboratório Clínico é essencial ter em especial atenção, a própria construção espacial e estrutural do edifício, os equipamentos e meios nele instalados (que englobam a segurança contra incêndos em edifícios), a gestão e tratamento de resíduos, a qualidade do ar interior, a avaliação dos riscos de exposição a agentes biológicos e químicos e à radiação no local de trabalho, bem como a escolha e garantia de utilização de Equipamentos de Proteção Individual por parte dos colaboradores.

## **CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE**

*O laboratório clínico deve melhorar continuamente a eficácia do sistema de gestão da qualidade e, conseqüentemente, a realização de todas as atividades com influência na qualidade dos serviços prestados pelo laboratório. Para isso o laboratório deve constantemente perscrutar oportunidades e riscos e, quando aplicável, iniciar ações de melhoria e ações corretivas e preventivas, estas duas segundo metodologia bem definida, escrita, com ênfase na análise das causas.*

*(in Normas para o Laboratório Clínico - Sistema de Gestão da Qualidade para os Laboratórios Clínicos, 3ª Edição Janeiro 2016)*

Todos os laboratórios que executam exames laboratoriais devem ter em funcionamento um sistema de garantia da qualidade baseado nas recomendações do Manual de Boas Práticas Laboratoriais e traduzido em procedimentos escritos, abrangendo toda a organização do laboratório, as diferentes etapas das análises e sua execução, bem como a formação e qualificação dos diversos tipos de pessoal técnico e administrativo. O sistema de garantia da qualidade deve ser dinâmico e contínuo, englobando 3 atividades principais:

1. Responsável da Garantia de Qualidade - o sistema de garantia da qualidade do laboratório tem de ter como responsável um especialista. Este responsável tem que ter a formação adequada e a competência necessária para executar esta tarefa.
2. Controlo da Qualidade Interno - o controlo da qualidade interno é indispensável para a deteção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correção. É organizado pelo responsável pelo programa de garantia da qualidade.
3. Avaliação Externa da Qualidade - o laboratório deve participar em programas de Avaliação Externa da Qualidade de preferência nacionais, organizados quer por Sociedades Científicas, Associações Profissionais, ou por outras entidades de idoneidade reconhecida pela Comissão Técnica Nacional. Estes programas têm de ser desenvolvidos num clima de confiança recíproca, sendo confidenciais os resultados individuais neles obtidos.

Uma das principais preocupações do Laboratório Dr. Joaquim Chaves é manter a qualidade dos serviços laboratoriais que presta, garantindo a obtenção de resultados analíticos fidedignos e conseqüentemente a satisfação do utente. De acordo com o próprio site do Laboratório ([http://www.jcs.pt/pt/conheca\\_a\\_joaquim\\_chaves\\_saude/ver/14](http://www.jcs.pt/pt/conheca_a_joaquim_chaves_saude/ver/14), consultado em Dezembro 2016) em meados da década de 1990, lançaram-se as bases do sistema de gestão da qualidade do Laboratório Dr. Joaquim Chaves. O processo culminou em 2001 com a acreditação do laboratório nas suas principais valências. Os anos seguintes consolidaram critérios de desempenho técnico com o alargamento do âmbito acreditado. Em 2006, o Laboratório Dr. Joaquim Chaves já tinha sob acreditação 700 técnicas abrangendo mais de 90% do trabalho laboratorial.

Paralelamente, e de forma a sublinhar o compromisso no que aos indicadores de qualidade e conformidade legal dizem respeito, o Laboratório cumpre a certificação na ISO 9001, bem como a ISO 17025, referencial de relevo na área dos laboratórios.

O Laboratório tem implementado **Programas de Controlo Interno e Avaliação Externa da Qualidade** que, atempadamente monitorizam e fazem a aferição do seu desempenho analítico, de acordo com a informação disponibilizada no site:

*Hoje em dia, a norma ISO 9001 está consolidada na maior parte das unidades da Joaquim Chaves Saúde com auditorias externas anuais a todas as unidades certificadas: Laboratórios de Análises Clínicas e de Anatomia Patológica, Clínicas de Ambulatório e de Radioncologia.*

*O Planeamento da Qualidade cumpre mais de 100 auditorias internas por ano.*

*A Política da Qualidade, desde a primeira hora implementada, defende orientações tão importantes como sejam a focalização no serviço prestado ao utente, a monitorização de funções críticas, a aposta na formação e qualificação das equipas, o desenvolvimento de relações de parceria, a organização preventiva e a optimização dos recursos num caminho de incontornável Boa Prática e Conformidade Legal.*

([http://www.jcs.pt/pt/conheca\\_a\\_joaquim\\_chaves\\_saude/ver/14](http://www.jcs.pt/pt/conheca_a_joaquim_chaves_saude/ver/14), consultado em Dezembro 2016)

No início de cada dia de trabalho no Laboratório são efetuadas as manutenções necessárias nos equipamentos (reposição de reagentes, recolha de resíduos líquidos, substituição/reforço de consumíveis dos próprios equipamentos, etc.) e são efetuados os controlos e as calibrações necessárias para cada parâmetro em cada um dos equipamentos automatizados. Através do terminal informático com o *software* Centralink é possível ver o estado de cada parâmetro e avaliar a necessidade de adequar possíveis vieses.

## II. ÁREAS LABORATORIAIS

### A. CORE LABORATORIAL – HEMATOLOGIA E IMUNOHEMATOLOGIA

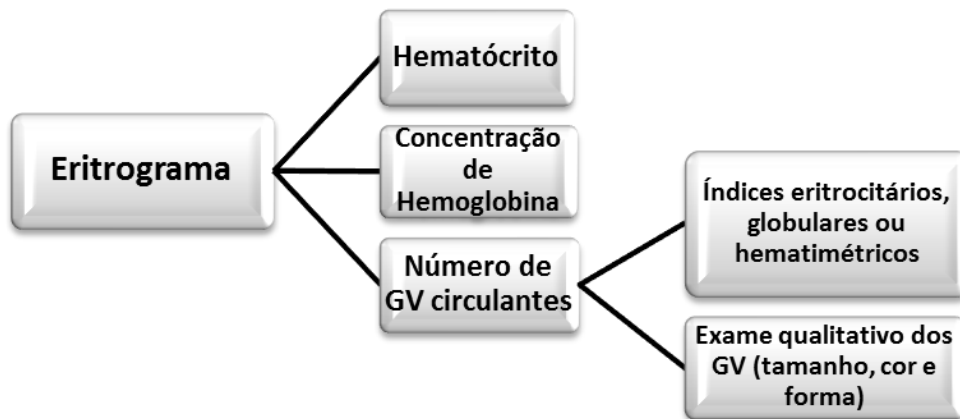
A Hematologia é a especialidade biomédica que estuda o sangue e os órgãos hematopoiéticos em situações fisiológicas e patológicas, bem como os mecanismos de hemostase. Mais particularmente estuda os elementos figurados do sangue: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, como são formados e os órgãos onde são produzidos – órgãos hematopoiéticos e linfáticos: medula óssea, timo, gânglios linfáticos, baço, amígdalas. Estuda-os no estado fisiológico, mas também as doenças com eles relacionados (hemopatias).

Na hematologia processada no Laboratório executam-se os hemogramas, a determinação da velocidade de sedimentação (VS), determinação da Hemoglobina Glicada (HbA1c), análise da Resistência Osmótica Globular (ROG), determinação de grupos sanguíneos e a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), pesquisa de Células LE, avaliação da função hemostática e da coagulação e o estudo dos fatores de coagulação.

#### **a) Hemograma**

O hemograma é parte essencial da avaliação hematológica da avaliação funcional do sangue, sendo este o ponto de partida em grande parte das análises executadas no Core Laboratorial. A realização do hemograma engloba a avaliação exame quantitativo dos elementos figurados (com quantificação dos mesmos e determinação dos índices eritrocitários), e um exame morfológico dessas células.

Tabela 1- Eritrograma



## • HEMATÓCRITO (Ht)

**Definição:** Volume relativo ocupado pelos GV, num dado volume de sangue total, o qual foi centrifugado em condições padronizadas.

### Métodos diretos (manuais):

- Microhematócrito (utiliza tubos capilares)
- Macrohematócrito (utiliza tubos de *Wintrobe*)

### Valores de referência:

Homem adulto 47% ± 7%  
Mulher adulta 42% ± 5%  
Criança 1 ano 40% ± 4%  
Recém-Nascido 53% ± 9%

### Interesse da determinação:

- Detecção de anemias e poliglobulias
- Informação sobre o aspeto do plasma
- Determinação dos índices globulares

## • CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (HB)

Método de referência – Cianometahemoglobina

Baseia-se no facto de todas as hemoglobinas com exceção da sulfohemoglobina (SHb), em presença do reagente de Drabkin (solução de ferricianeto de potássio e cianeto de potássio) se converterem em cianometahemoglobina (HiCN), que é estável e doseável espectrofotometricamente.

**Interesse do doseamento:**

- Detecção de anemias
- Avaliação do grau de anemia
- Apreciação do efeito do tratamento da anemia

**Valores de referência:**  
 Homem adulto 16 ± 2 g/dL  
 Mulher adulta 14 ± 2 g/dL  
 Criança 1 ano 13 ± 2 g/dL  
 Recém-Nascido 19 ± 2 g/dL

• **CONTAGEM DE GLÓBULOS VERMELHOS (GV; RBC)**

Os resultados exatos e precisos são obtidos em sistemas automáticos (contadores hematológicos). O método manual (contagem em câmara) apresenta pouca exatidão e pouca precisão.

**Valores de referência:**  
 Homem adulto 5,0 ± 0,5x10<sup>12</sup>/L  
 Mulher adulta 4,5 ± 0,5x10<sup>12</sup>/L  
 Recém-nascido 6,0 ± 1,0x10<sup>12</sup>/L  
 Criança 1 ano 4.5 ± 0,6x10<sup>12</sup>/L

A contagem dos glóbulos vermelhos revela-se um parâmetro importante para o **cálculo dos índices globulares**.

Tabela 2 – Índices Globulares

PARÂMETRO	CÁLCULO	VALOR DE REFERÊNCIA	ALTERAÇÃO
Volume Globular Médio (VGM)	$\frac{Ht}{GV \times (10^{12}/L)}$	80 - 96 fL	Microcitose Macrocitose Anisocitose (micrócitos + macrócitos)
Hemoglobina Globular Média (HGM)	$\frac{Hb}{GV \times (10^{12}/L)} \times 10$	27 - 32 pg	Microcitose Macrocitose
Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)	$\frac{Hb}{Ht}$	32 - 36 g/dL	Hipocromia Normocromia Esferocitose
Coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW)	/	11,5 - 14%	> 15% Anisocitose

### **b) Velocidade de Sedimentação (VS)**

Velocidade de queda espontânea dos elementos figurados do sangue (GV são os mais numerosos) em suspensão no plasma. A VS resulta:

- ✓ da diferença de gravidade específica existente entre os GV (mais densos) e o plasma;
- ✓ da atração eletrostática que se gera entre as cargas elétricas negativas presentes na membrana dos GV e as cargas elétricas positivas de certas proteínas plasmáticas → formação de *rouleaux*;
- ✓ da contra-corrente plasmática.

**Valores de referência:**

Homens – até 10 mm na 1ª hora  
Mulheres – até 13 mm na 1ª hora

A elevação da VS pode estar relacionada com situações patológicas, nomeadamente em casos de infeção ativa e processos inflamatórios, anemias, hemólises e leucemias. Em alguns estados fisiológicos, como, gravidez e período menstrual, verifica-se igualmente uma elevação deste parâmetro. Quando existem alterações na forma dos glóbulos vermelhos os valores da VS diminuem.

### **c) Hemoglobina Glicada – HbA1c**

A Direção-Geral da Saúde publicou na sua Norma 002/2011 – *Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus* os critérios/parâmetros a assumir para o diagnóstico da diabetes:

- a) *Glicemia de jejum*  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7,0$  mmol/l); ou
- b) *Sintomas clássicos + glicémia ocasional*  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l); ou
- c) *Glicemia*  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou
- d) **Hemoglobina glicada A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ .**

(<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022011-de-14012011.aspx>, consultado em Novembro 2016)

Em 2009 vários comités internacionais recomendaram o uso da determinação da Hemoglobina glicada no diagnóstico da diabetes. O *cut-off* reconhecido é de um teor  $\geq 6,5\%$ , determinado através de um método certificado pelo “*National Glycohemoglobin Standardization Program*”. Desde então este parâmetro tornou-se um valioso controlo para doentes com Diabetes Mellitus

A Hemoglobina do adulto é constituída por:

- 97 a 98% de Hb A
- 2,5% de Hb A2
- 0,5% de Hb F

A Hb A é composta por 4 cadeias polipeptídicas, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ . A análise cromatográfica da HbA permitiu a identificação de várias hemoglobinas menores HbA1a, HbA1b e HbA1c coletivamente denominadas HbA1, hemoglobinas rápidas, glicohemoglobinas ou Hemoglobinas “Glicosiladas”.

A formação da Hb glicada é irreversível, e está dependente da concentração de glucose no sangue bem como da vida média dos glóbulos vermelhos (120 dias). E porque a taxa de formação da Hb glicada é diretamente proporcional à permeabilidade completa do eritrócito à glucose, esta representa os valores integrados da glicémia, para as 6 a 8 semanas que antecedem a determinação, o que representa uma grande vantagem no controlo dos doentes diabéticos.

A determinação da Hb glicada é aplicada como:

- Teste de rotina para Diabéticos
  - ✓ de 3 em 3 meses, para a monitorização dos diabéticos tratados com Insulina.
  - ✓ de 4 em 4 semanas, na diabetes gestacional ou numa alteração importante do tratamento

Possibilita assim a informação sobre a glicemia num passado recente, tendo como utilidade clínica a informação sobre o valor integrado da glicemia sendo certo que o controlo da mesma pela terapia, diminui o risco de retinopatia, nefropatia e neuropatia em cerca de 40%. Outras avaliações possíveis do metabolismo dos hidratos de carbono serão apresentadas mais à frente neste documento.

• **EXAME QUALITATIVO DOS GV (TAMANHO, COR E FORMA) E GB**

Sempre que os resultados obtidos, no que aos parâmetros hematológicos dizem respeito, indicarem possíveis alterações na série vermelha ou branca, o Médico Especialista solicita a realização de um esfregaço sanguíneo. Este pode ser definido como sendo uma preparação de uma fina camada de células sanguíneas sobre uma lâmina de vidro, para um exame microscópico.

As principais finalidades do esfregaço de sangue são:

- Observar a morfologia dos glóbulos vermelhos;
- Observar a morfologia dos glóbulos brancos e estabelecer a fórmula leucocitária, ou seja, identificar os diferentes tipos de leucócitos e estabelecer a percentagem de cada um;
- Observar e contar as plaquetas

Para garantir a exatidão do exame microscópico das células sanguíneas é fundamental que o esfregaço de sangue (técnica manual) seja corretamente executado, de acordo com o seguinte procedimento:

- Depositar 1 gota de sangue perto da extremidade de uma lâmina;
- Segurar a lâmina com a mão esquerda, de forma que a gota fique mais próxima do dedo indicador;
- Com a mão direita, segurar uma lamela que se apoia na lâmina à esquerda da gota, de forma que ambas façam um ângulo de 30° a 45°;
- Deslocar a lamela (sempre apoiada na lâmina) até encontrar a gota, deixando que esta difunda ao longo da lamela;
- Com um movimento uniforme, deslizar a lamela no sentido da extremidade livre (dedo polegar) até que o sangue se esgote;
- Depois de seco identificar a amostra marcando a cabeça do esfregaço com lápis de carvão.

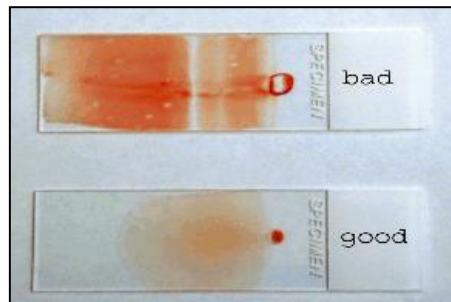


Figura 1 – Esfregaços Sanguíneos - inadequado e adequado

### Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Para a execução da técnica manual de coloração de um esfregaço de sangue é necessário proceder da seguinte forma:

1. Colocar as lâminas com os esfregaços em suporte apropriado;
2. Mergulhar o suporte na tina contendo a solução de May-Grünwald durante 3 - 5 min. Escorrer o excesso de corante;
3. Mudar o suporte com as lâminas para uma 2ª tina contendo May-Grünwald e tampão de fosfatos em partes iguais durante 3 - 5 min. Escorrer muito bem o excesso de corante;
4. Mergulhar o suporte numa 3ª tina contendo solução de Giemsa diluída durante 15 min. Escorrer;
5. Lavar com água corrente;
6. Limpar a face da lâmina oposta ao esfregaço;
7. Deixar secar ao ar.

Relativamente ao fundamento do método descrito anteriormente destacam-se de seguida as funções de cada elemento aplicado:

**Fixação do esfregaço:** efetuada pelo metanol presente na solução de de May-Grünwald (solução metanólica de eosinato de azul de metileno);

**Dissociação do corante de May-Grünwald:** efetuada pelo tampão de fosfatos (o eosinato de azul de metileno, ao pH conferido pelo tampão  $\square$  eosina + azul de metileno);

**Ação individual dos corantes:** eosina (corante ácido) e azul de metileno (corante básico);

**Ação da solução de Giemsa diluída:** o eosinato de azul de metileno e o eosinato de azul de metileno presentes no Giemsa são dissociados pelo tampão de fosfatos e os corantes individuais → eosina + azul de metileno + azul de metileno exercem a sua ação.

Cada corante aplicado possui uma ação diferente que será responsável pela leitura diferenciada das células observadas:

- **Eosina (corante ácido)** - Cora os componentes citoplasmáticos básicos da célula (eosinófilos ou acidófilos) de rosa-alaranjado.
- **Azul de metileno (corante básico)** - Cora o núcleo e componentes citoplasmáticos ácidos (basófilos) de azul-arroxeadado.
- **Azur de metileno** - Cora granulações (azurófilas) de vermelho-púrpura.

Tanto a eosina como o azul de metileno coram as granulações (neutrófilas) de rosa.

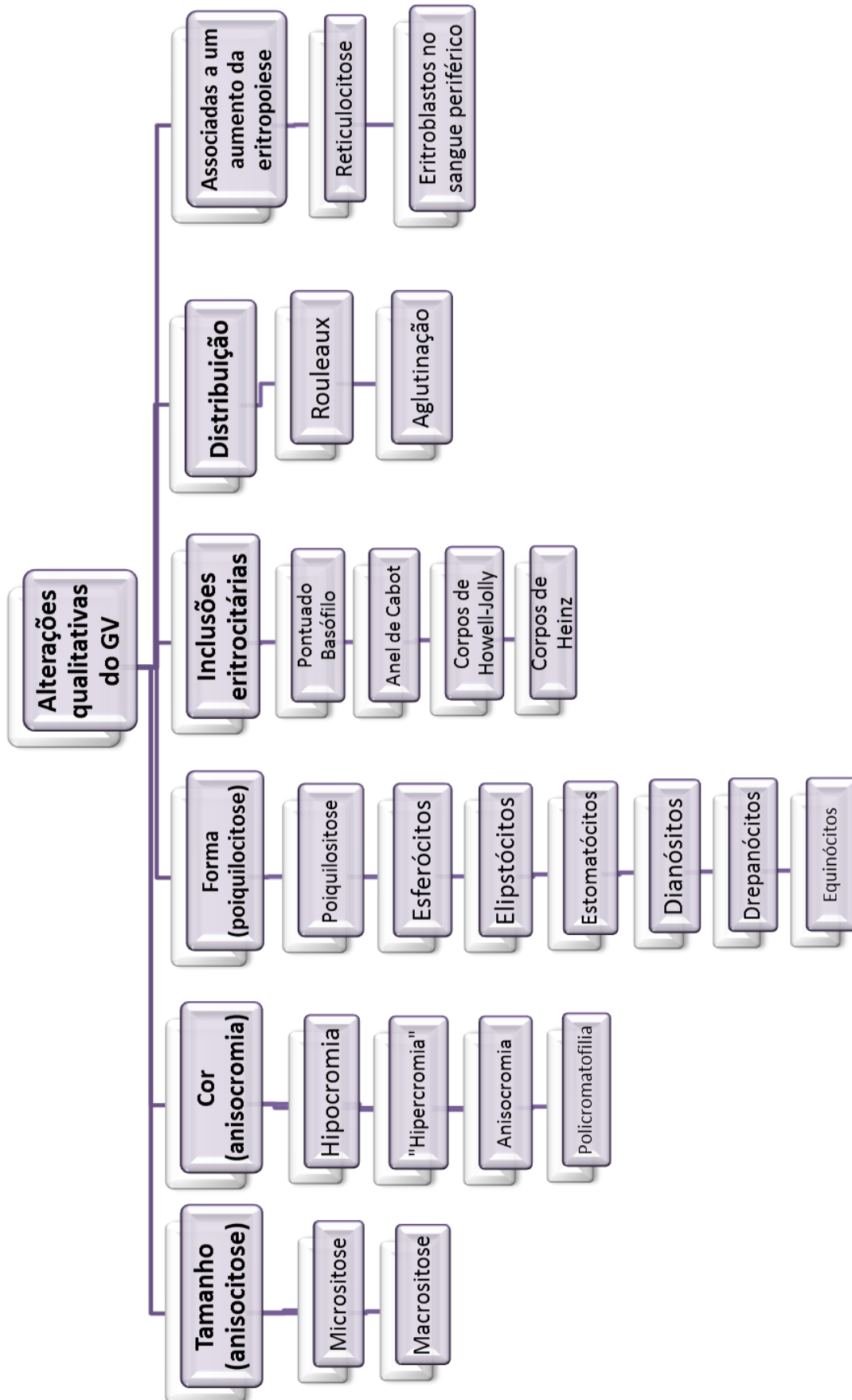
A policromatofilia é a coloração acinzentada das células e ocorre devido à presença de proporções idênticas de componentes ácidos e básicos. Sendo que a metacromasia surge quando os componentes celulares que fixam eosina ou o azul de metileno mas não adquirem as cores características destes corantes.

A obtenção de um bom esfregaço sanguíneo exige particular atenção nas fases de preparação e coloração do mesmo e requerem consequente familiaridade, por parte do analista, com os aspetos morfológicos das células normais e dos achados considerados patológicos.

#### **d) Alterações Qualitativas nos glóbulos vermelhos**

Existem alterações morfológicas dos glóbulos vermelhos que podem ser identificadas durante a observação de um esfregaço sanguíneo. Apresenta-se abaixo um esquema identificativo das possíveis alterações que podem surgir ao nível dos glóbulos vermelhos.

Tabela 3 - Alterações Qualitativas nos glóbulos vermelhos



- **Microcitose:** diminuição do tamanho dos GV (redução do diâmetro celular). Situações clínicas: anemia por deficiência em ferro, talassémias, anemia sideroblástica, anemia da doença crónica, intoxicação pelo Pb, deficiência em vitamina B6.

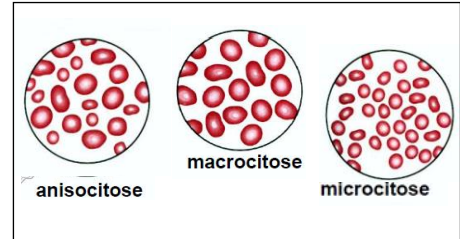


Figura 2 – Anisocitose, macrocitose e microcitose

- **Macrositose:** aumento do tamanho dos GV (aumento do diâmetro celular). Situações clínicas: alcoolismo crónico, doenças hepáticas (ex cirrose), anemias megaloblásticas, síndromes mielodisplásicas.

- **Anisocitose:** macrócitos e micrócitos

- **Hipocromia:** diminuição da coloração dos GV (redução do conteúdo em Hb). Ocorre devido a deficiência em ferro, talassémias e anemia da doença crónica.

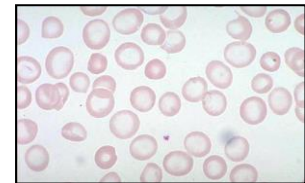


Figura 3 - Hipocromia

- **Hipercromia:** aumento da intensidade coloração dos GV por perda do halo central claro. Normalmente ocorre por erro técnico ou hemólise da amostra.



Figura 4 - Hipercromia

- **Anisocromia:** presença de GV hipocrómicos e normocrómicos. Surge na anemia por deficiência em ferro a responder ao tratamento, anemia sideroblástica e doenças inflamatórias em desenvolvimento ou em regressão.

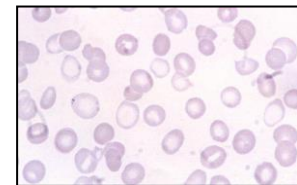


Figura 5 - Anisocromia

- **Policromatofilia:** aumento do nº de reticulócitos (eritropoiese aumentada). Pode surgir em: anemias regenerativas, anemias hemolíticas, rápida regeneração sanguínea, decurso do tratamento de anemias por deficiência em ferro, vitamina B12 ou ácido fólico.

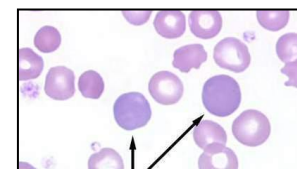


Figura 6 - Policromatofilia

- Dimorfismo: GV dimórficos, duas populações distintas de GV: GV normocíticos e GV microcíticos; GV normocrômicos e GV hipocrômicos. Verifica-se após transfusão sanguínea, anemias hemolíticas, no decurso do tratamento de anemias ferropénicas e megaloblásticas e anemia sideroblástica.

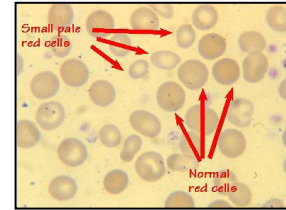


Figura 7 - Dimorfismo

- Poiquilocitose: eritrócitos de formas variadas, sem predomínio de uma forma. Podem surgir associados a anemias ferropénicas, megaloblásticas, hemolíticas, talassémias ou mielofibroses.

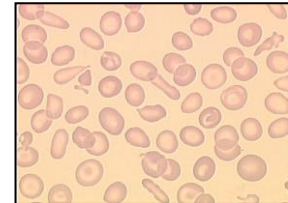


Figura 8 - Poiquilocitose

- Eliptócitos: GV alongados (forma charuto) ou ovalados. Aparecem na eliptocitose hereditária (defeito genético nas proteínas da membrana do GV), anemia megaloblástica, anemia ferropénica e talassémias.

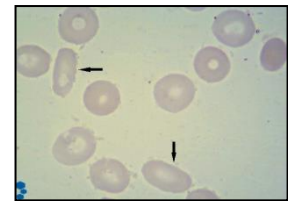


Figura 9 - Eliptócitos

- Esferócitos: GV esféricos (perda do halo central), microcíticos (diâmetro <math><6 \mu\text{m}</math>) e “hipercrômicos”. Ocorre esferocitose hereditária (defeito genético nas proteínas da membrana do GV). Podem surgir na doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade ABO, reações a transfusões sanguíneas, anemias hemolíticas autoimunes, queimaduras graves.

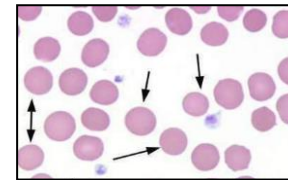


Figura 10 - Esferócitos

- Estomatócitos: GV unicôncavos, com a zona central em fenda, assemelhando-se a uma “boca” ou um estoma. Podem surgir associados a estomatocitose hereditária, alcoolismo e cirrose alcoólica ou doença

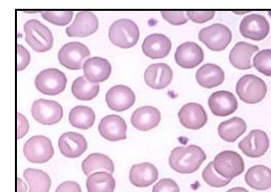


Figura 11 - Estomatócitos

- Dianócitos (“Target Cells”): GV com coloração mais intensa no centro, rodeada por zona mais clara (com forma de alvo). Podem surgir associados a anemias ferropénicas, hemolíticas, doenças hepáticas, hemoglobinopatias.

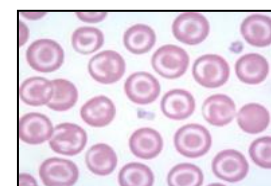


Figura 12 - Dianócitos

- Drepanócitos: eritrócitos com forma de foice, que resulta de uma mutação *missence* no gene  $\beta$  globina, determinando a substituição de aminoácidos que dão origem à síntese de Hb S. Em situações de hipoxigenação esta Hb polimeriza no interior do eritrócito, conferindo-lhe a forma de foice. Podem surgir associadas a drepanocitose, ou outras hemoglobinopatias.

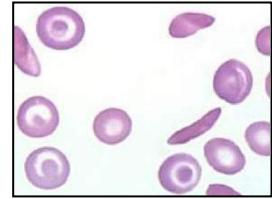


Figura 13 - Drepanócitos

- Equinócitos: GV crenados, com numerosas projeções (até 50) dispostas regularmente na membrana celular. Verifica-se em situações de urémia, insuficiência renal, deficiência em piruvato-quinase, carcinoma do estômago e queimaduras graves.

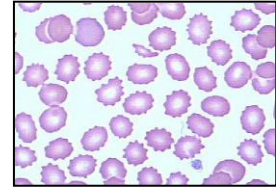


Figura 14 - Equinócitos

- Pontuado Basófilo: grânulos finos de restos de ribossomas, RNA, mitocôndrias que precipitam, distribuídos por todo o eritrócito e que coram de azul-arroxado. Podem surgir associados a alterações da eritropoiese, da síntese de hemoglobina, intoxicações por metais pesados, talassémias, anemias, alcoolismo.

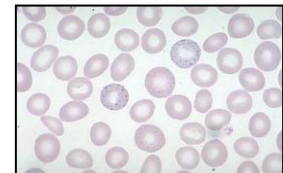


Figura 15 - Pontuado Basófilo

- Corpos de *Howell Jolly*: inclusões redondas de restos de DNA nuclear que coram de azul escuro-púrpura. Podem surgir associados a atrofia esplênica, após esplenectomia, anemias megaloblástica ou hemolíticas.

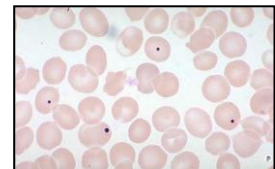


Figura 16 - Corpos de *Howell Jolly*

- *Rouleaux*: fenómeno que ocorre quando os eritrócitos se empilham, por modificação do seu potencial de membrana. Surge associado a aumentos de proteínas plasmáticas de elevado peso molecular, durante a gravidez, inflamações, infeções, mielomas.



Figura 17 - *Rouleaux*

- **Corpos de *Heinz*:** Hb desnaturada que precipita, podendo ser visualizados em microscopia de contraste de fase ou utilizando colorações supravitais. Surgem inclusões de 1-3  $\mu\text{m}$  de diâmetro que se acumulam junto à membrana do GV, podendo rompê-la (hemólise). Deficiência em G6PD e outras enzimopatias do GV. Estão associados a anemias hemolíticas secundárias a intoxicações com drogas oxidantes (fenacetina) algumas hemoglobinopatias ( $\beta$ -talassémias).

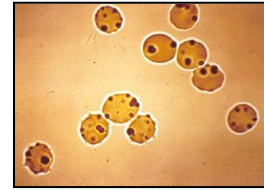


Figura 18 - Corpos de *Heinz*

### ➤ **Anemias**

A Anemia pode ser definida pela redução significativa da massa de eritrócitos e, desta forma, da capacidade sanguínea de transporte de oxigênio. Normalmente, o volume sanguíneo mantém-se constante. Assim, a anemia corresponde a uma redução da concentração de glóbulos vermelhos ou da Hb no sangue periférico abaixo do limite inferior dos valores normais. A anemia pode ser ainda definida como uma redução de mais de 10% abaixo dos valores médios de Hb consoante ao género masculino ou feminino. As anemias são as alterações hematológicas mais frequentes no homem, representando aproximadamente a 50% das alterações dos hemogramas. De um modo geral, as anemias podem ser causadas por fatores genéticos (alteração na síntese de Hb; alterações na composição da membrana e defeitos enzimáticos), nutricionais (por defeito na produção resultante da carência de ferro, vitamina B12 ou ácido fólico) ou devido a perdas de sangue (hemorragias crónicas ou agudas).

Apresenta-se abaixo um quadro resumo relativo à classificação das Anemias.

Tabela 4 – Classificação Geral das Anemias

TIPO	EXEMPLOS	CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	CAUSAS PRINCIPAIS
<b>Por Perda de Sangue</b>	Hemorragias crônicas	Microcitose Hipocromia ↓ Ferro e ferritina	Acidentes graves/traumas Parto Cirurgia
	Hemorragias agudas	↓ Ht ↓ Hb	Perdas menstruais excessivas Neoplasias digestivas
<b>Por Defeito na Produção ou Mau Funcionamento da MO</b>			
<b>Anemia por deficiência em ferro</b> (tipo de anemia mais frequente)		Microcitose Hipocromia ↓ Ferro e ferritina Reação de Perls negativa	Capacidade limitada do organismo para absorver o ferro: - Perdas fisiológicas (menstruação, gravidez) - Perdas patológicas (hemorragia digestiva, hemólise intravascular) - Diminuição na ingestão (dieta pobre em ferro)
<b>Anemia Sideroblástica</b> (O ferro está sequestrado nas mitocôndrias do eritrócito, tornando-o indisponível para a síntese do heme)		Hipocromia ↑ Ferro e ferritina ↑ Ferro medular Presença de sideroblastos na MO → Reação de Perls positiva	Deficiência na síntese do heme podendo ser: - Hereditária (deficiência congênita da síntese do ácido δ-aminolevulínico) - Adquirida (mielodisplasia, tóxicos, quimioterapia, neoplasias)
<b>Por Defeito na Produção</b>			
<b>Talassémias</b> (Diminuição da síntese de cadeias de globina resultando em desequilíbrios de emparelhamento)		Microcitose Hipocromia Alteração anômala na Eletroforese da Hb	Redução na taxa de síntese de cadeias α e β da Hb (anomalia qualitativa). As cadeias α e β dos doentes têm uma estrutura normal mas são produzidas em quantidades reduzidas ou indetetáveis.

TIPO	EXEMPLOS	CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	CAUSAS PRINCIPAIS
<b>Por Defeito na Produção</b>			
<b>Deficiência de vitamina B12 e de ácido fólico</b> (A sua escassez leva a uma síntese deficiente de DNA, a alterações de maturação dos GV e ao aparecimento de anemia megaloblástica)	Macrocitose Reticulopenia Leucopenia e trombocitopenia moderadas Neutrófilos hipersegmentados Megaloblastos na MO	- Dieta inadequada - Má absorção (por deficiência de fator intrínseco de <i>Castle</i> que pode originar a anemia perniciosa) - Transtornos do íleo terminal - Necessidades aumentadas (gravidez, diálise) - Metabolismo alterado - Fármacos	
<b>Hemolíticas (<i>Anemias Normocrômicas, Normocítica ou macrocíticas</i>)</b>			
<b>Destrução aumentada de eritrócitos</b>	↑ bilirrubina não conjugada no soro ↑ urobilinogénio na urina ↓ ou ausência da haptoglobina sérica	• Anomalias da Hb: - Drepanositose - Talassemias • Enzimopatias: - Deficiência de piruvato cinase - Deficiência G6P desidrogenase	
<b>Aumento da eritropoiese</b>	Reticulositose Hiperplasia eritroide da MO	• Anomalias da Membrana • Imunitárias • Tóxicas (drogas, saturnismo) • Bacterianas e parasitárias	
<b>Lesão dos eritrócitos</b>	Esferócitos Eliptócitos Fragmentos celulares Fragilidade osmótica		

Para além da identificação dos glóbulos vermelhos é igualmente possível observar os glóbulos brancos num esfregaço sanguíneo. A distribuição dos leucócitos num esfregaço de sangue não é uniforme, sendo possível identificar 3 zonas distintas, devendo-se efetuar as contagens na zona central do mesmo:

- os leucócitos mais pequenos (pequenos linfócitos) encontram-se sobretudo no centro do esfregaço;
- os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) predominam nos bordos.
- os leucócitos mais volumosas (monócitos) encontram-se nos bordos e nas franjas do esfregaço.

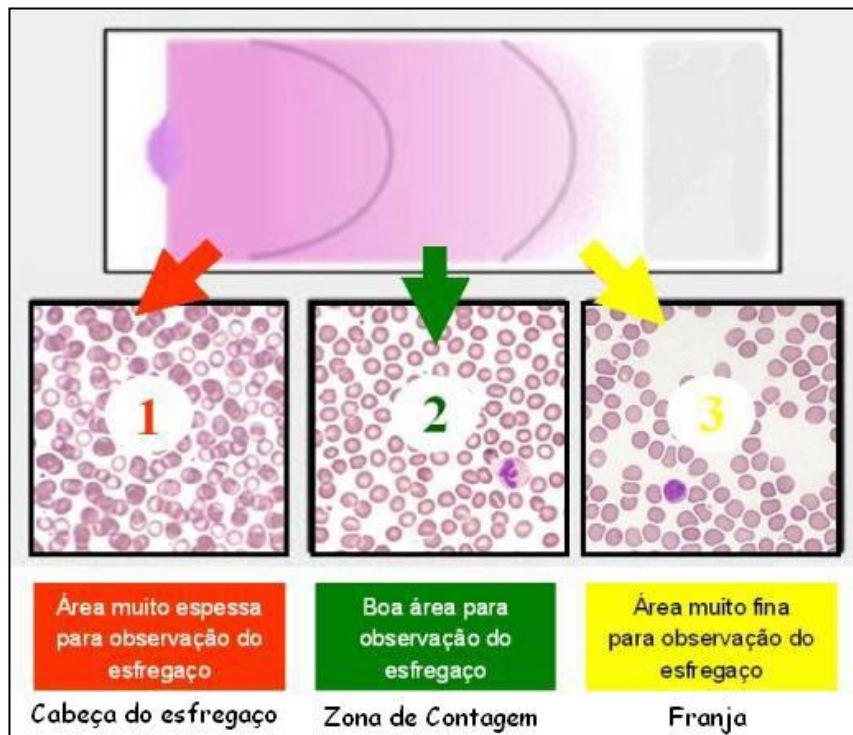
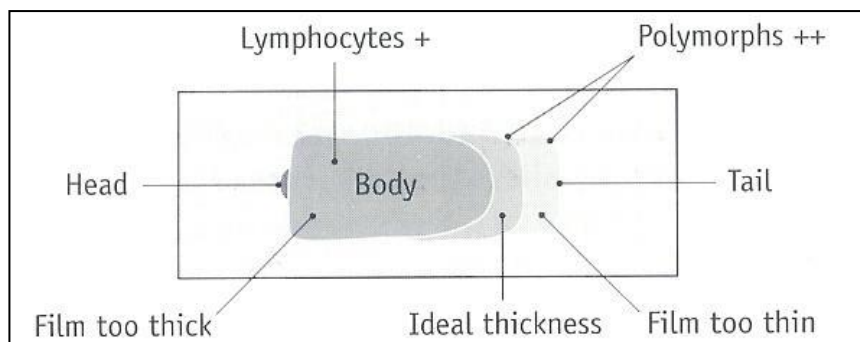


Figura 19 – Representação de Esfregaço Sanguíneo

Os glóbulos brancos ou leucócitos são células efectoras do sistema imunitário, formados na Medula Óssea (com exceção de algumas etapas da linfocitopoiese que ocorrem no tecido linfoide), e encontram-se presentes no sangue, linfa, órgãos linfoides e no tecido conjuntivo. Os leucócitos podem ser divididos em dois grupos principais: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (monócitos e linfócitos), de acordo com a presença de granulações ou inexistência destas no seu citoplasma. Apesar da função principal de todos os tipos de glóbulos brancos ser de defesa do organismo, as suas funções diferem consoante os grupos (granulócitos e agranulócitos).

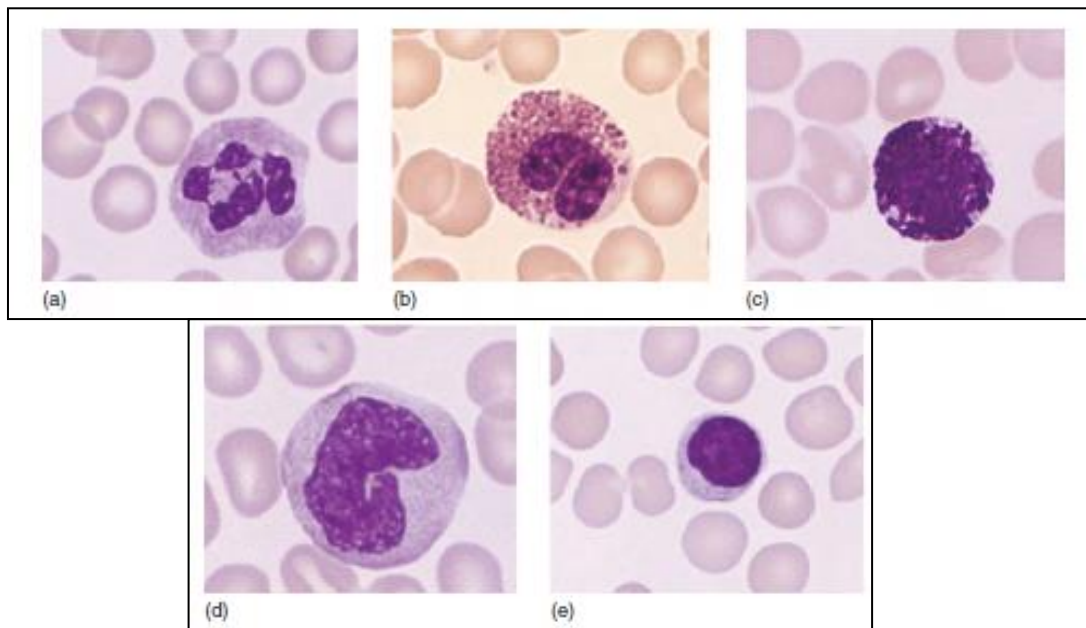


Figura 20 - Leucócitos: (a) Neutrófilo hipersegmentado (b) Eosinófilo (c) Basófilo  
(d) Monócito (e) Linfócito

- **Neutrófilos:** apresentam um metabolismo elevado e realizam fagocitose, constituído a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. Limitam o desenvolvimento dos microrganismos, até que GB mais eficientes (linfócitos e macrófagos) os removam.
- **Eosinófilos:** realizam fagocitose de forma mais lenta que os neutrófilos, mas são, geralmente, mais seletivos. A sua ação dirige-se especialmente em situações de alergias e contra parasitas (colocando-se junto à sua parede, libertam enzimas que os destroem).
- **Basófilos:** o seu citoplasma apresenta muitos grânulos que contêm substâncias que intervêm na resposta imunitária, como a histamina e a heparina. Podem atuar também contra processos alérgicos.
- **Monócitos:** são capazes de abandonar os vasos, migrando para os tecidos, nos quais se diferenciam em células fagocitárias de grandes dimensões – macrófagos.

- **Linfócitos:** a maioria dos linfócitos pertence a um dos seguintes grupos: linfócitos T ou B. Os linfócitos B podem diferenciar-se em plasmócitos que produzem anticorpos, enquanto que os linfócitos T não libertam anticorpos, mas reconhecem e ajudam a destruir agentes patogénicos. Considera-se ainda a existência de um terceiro grupo de linfócitos – as células NK (*natural killer cells*) que têm atividade contra células tumorais e células infetadas por certos tipos de vírus.

### e) Alterações nos Glóbulos Brancos

Na avaliação laboratorial dos leucócitos faz-se a contagem total, a avaliação da sua morfologia, e ainda a contagem diferencial, estabelecendo o valor relativo e absoluto dos vários tipos de leucócitos.

Perante a avaliação efetuada é possível associar algumas patologias que dizem respeito aos leucócitos.

De uma forma geral, o estudo da série branca permite demonstrar estados infecciosos e leucémicos. As características morfológicas do núcleo e citoplasma definem a sua população e o seu nível de maturação. A percentagem relativa permite avaliar as condições patológicas do utente e os valores absolutos dos diferentes tipos de células podem indicar distúrbios mieloide primário ou de origem secundária.

No quadro seguinte evidenciam-se as diferentes causas que podem conduzir a alterações quantitativas de cada uma das séries celulares da linhagem leucocitária. Será de referir que quando a concentração absoluta de cada célula se encontra aumentada, a terminologia empregue é -citose ou -filia; e quando está diminuída termina em -penia.

#### Leucograma

##### Valores de referência:

Leucócitos:  $4-11 \times 10^9/L$

Neutrófilos:  $2,5-7,5 \times 10^9/L$  (45-70%)

Eosinófilos:  $0,04-0,4 \times 10^9/L$  (1-5%)

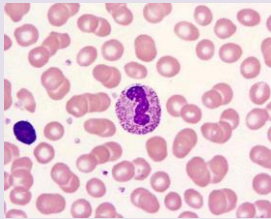
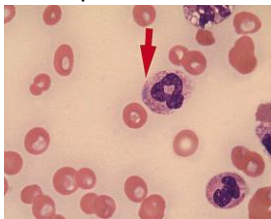
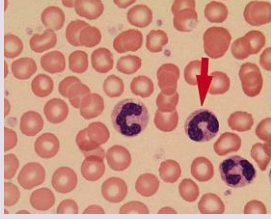
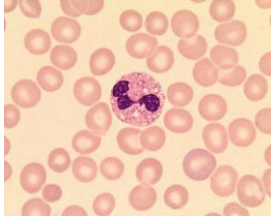
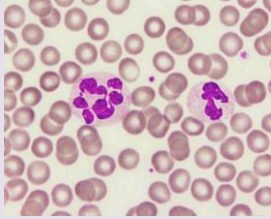
Basófilos:  $0,01-0,1 \times 10^9/L$  (0-1%)

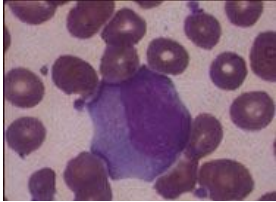
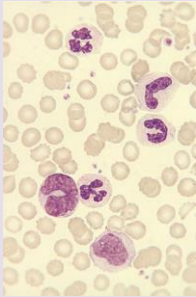
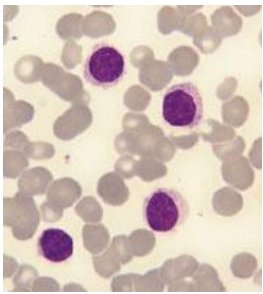
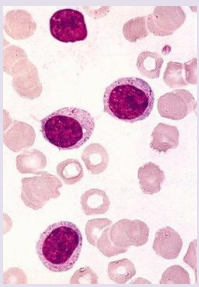
Linfócitos:  $1,0-3,5 \times 10^9/L$  (20-40%)

Tabela 5 – Alterações Quantitativas nos Glóbulos Brancos

ALTERAÇÃO NO GB	SIGNIFICADO	CAUSAS POSSÍVEIS
Neutrofilia	↑ Número de neutrófilos ( $> 7,5 \times 10^9/L$ )	Infeções bacterianas Alterações Metabólicas Dano tecidual <i>Stress</i>
Neutropenia	↓ Número de neutrófilos ( $< 2,5 \times 10^9/L$ )	Doenças alérgicas Doenças parasitárias Certas doenças de pele (psoríase)
Eosinofilia	↑ Número de eosinófilos $> 0,4 \times 10^9/L$	Vírus Brucelose Malária, Leucemia Mielomonocítica Crónica
Monocitose	↑ Número de monócitos circulantes ( $> 0,8 \times 10^9/L$ )	Infeção bacteriana Apendicite Leucemia Gravidez Reações Leucemóides
Leucocitose	↑ Número de leucócitos ( $> 11 \times 10^9/L$ )	Infeção viral Sarampo Citomegalovírus
Leucopenia	↓ Número de leucócitos ( $> 4 \times 10^9/L$ )	Mononucleose infecciosa Citomegalovírus Toxoplasmose Leucemia Linfocítica Crónica

Tabela 6 – Alterações Morfológicas dos Glóbulos Brancos

NEUTRÓFILOS		
TIPO DE ALTERAÇÃO		SIGNIFICADO
<p>Granulações tóxicas</p> 	<p>Granulação azurófila intensa (peroxidase positiva) nos neutrófilos com origem nos lisossomas</p>	<p>Resposta medular acelerada a uma infecção, inflamação, queimadura, etc., com provável redução do número de mitoses nas células jovens</p>
<p>Corpos de <i>Döhle</i></p> 	<p>Granulação grosseira, basófila, na borda do citoplasma dos segmentos neutrófilos com origem no RE rugoso (RNA) não-lisossômico (peroxidase negativa)</p>	<p>Incerto. Comum em infecções graves (como a escarlatina), queimaduras e após o uso de citotóxicos</p>
<p>Pseudo <i>Pelguer-Hüet</i></p> 	<p>Núcleo não-segmentado ou com apenas dois lóbulos</p>	<p>Assincronismo de maturação núcleo/citoplasma. Comum em leucemia após uso de quimioterápicos e mixedema</p>
<p>Vacuolização tóxica</p> 	<p>Vacúolos citoplasmáticos com origem fagolisossomas</p>	<p>Fagocitose de bactérias com grande atividade lisossômica</p>
<p>Hipersegmentação e gigantismo celular</p> 	<p>Núcleo com mais de quatro lóbulos e células de grande tamanho</p>	<p>Alteração na maturação celular por várias causas, deficiência de vitamina B12, de ácido fólico ou após o uso de citotóxicos que interferem na síntese de DNA.</p>

LINFÓCITOS		
TIPO DE ALTERAÇÃO		SIGNIFICADO
<p>Linfócitos Reativos</p> 	<p>Os linfócitos têm maior tamanho que o linfócito normal, com moderada relação núcleo-citoplasma, um núcleo de perfil arredondado de cromatina pouco condensada e um citoplasma intensamente basófilo</p>	<p>Infeções de etiologia vírica (Vírus Epstein-Barr, Citomegalovírus, Vírus da hepatite)</p> <p>Etiologia parasitária como a Toxoplasmose</p>
<p>Reação Leucemóide</p> 	<p>Anormalidade hematológica que simula e pode ser confundida com leucemia, mas que, de facto, é reacional a outra doença.</p>	<p>Infeção bacteriana séria</p> <p>Tuberculose</p> <p>Algumas viroses,</p> <p>Hemorragia</p> <p>Carcinoma ou outra doença oncológica</p>
<p>Hairy cells</p> 	<p>Com projeções citoplasmáticas em forma de cabelo e com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP+).</p> <p>São derivadas dos linfócitos B de memória, com expressão alterada para quimiocinas e receptores de adesão celular. Normalmente, migram para o sangue por ativação dos recetores das integrinas.</p>	<p>Neoplasia</p> <p>Leucemia a tricoleucocitos</p>
<p>Linfócitos Grandes Granulares</p> 	<p>Os linfócitos grandes granulares (LGL), com citoplasma fino e grânulos azurófilos, contêm proteínas citolíticas (perforina, granzima B...) e são as células predominantes no sangue periférico e na medula óssea.</p>	<p>Leucemia linfocítica a grandes células T granulares</p>

## **f) Imunohematologia**

A Imunohematologia ou serologia dos grupos sanguíneos estuda os antígenos presentes nos vários componentes do sangue total (células, plaquetas, eritrócitos, leucócitos e componentes do plasma); os anticorpos que reconhecem esses antígenos e as interações antígeno-anticorpo.

### **i. GRUPOS SANGUÍNEOS**

















O grupo sanguíneo consiste em um ou mais antígenos, localizados à superfície das células ou plaquetas, definidos por anticorpos específicos e geneticamente determinados (marcadores alotípicos de membrana). O grupo sanguíneo humano ABO é determinado por um gene para o qual existem três variantes de alelos (alelo I<sup>A</sup>, alelo I<sup>B</sup> e alelo i), estes determinam a produção de antígenos existentes na superfície da dos eritrócitos – aglutinogénios. Assim, o alelo I<sup>A</sup> conduz à produção de aglutinogénios do tipo A e o alelo I<sup>B</sup> determina a produção de aglutinogénios do tipo B, sendo que o alelo i não determina a produção de qualquer aglutinogénio. O grupo sanguíneo de um indivíduo pode ser A, B, AB ou O, ou seja, na superfície dos seus eritrócitos existem aglutinogénios A e B ou não existem aglutinogénios nem A nem B, respetivamente. Os genes A, B e O são herdados segundo as leis de Mendel, e portanto, indivíduos do tipo A poderão ter genótipo AA ou AO, o qual também acontece com o tipo B.

O Sistema ABO é o mais importante em Imunohematologia devido à sua imunogenicidade, pelo que a qualidade e segurança dos testes realizados devem ser estritamente asseguradas. Posto isto, o conhecimento do grupo sanguíneo é fundamental quando se procedem a transfusões sanguíneas com sucesso. De um modo explicativo, cada indivíduo produz anticorpos contra aglutinogénios de grupos sanguíneos diferentes do seu, assim:

- um indivíduo que seja do grupo sanguíneo A terá anticorpos anti-B;
- um indivíduo que seja do grupo sanguíneo B terá anticorpos anti-A;
- um indivíduo que seja do grupo sanguíneo AB não terá anticorpos anti-A nem anti-B;
- um indivíduo que seja do grupo sanguíneo O terá anticorpos anti-A e anti-B.

A reação antígeno-anticorpo conduz à aglutinação e precipitação dos glóbulos vermelhos, podendo causar a morte do indivíduo que recebeu a transfusão. Conclui-se portanto que os indivíduos do grupo sanguíneo O são doadores universais e os indivíduos do grupo sanguíneo AB são recetores universais.

Tabela 7 – Sistema Sanguíneo ABO

Fenótipo (grupo sanguíneo)	Genótipo	Anticorpos presentes no soro	Resultados da adição dos GV dos diferentes grupos sanguíneos com diferentes anticorpos			
			A	B	AB	O
<b>A</b>	$I^A I^A$ $I^A i$	Anti- B				
<b>B</b>	$I^B I^B$ $I^B i$	Anti-A				
<b>AB</b>	$I^A I^B$	/				
<b>O</b>	ii	Anti-A Anti-B				

A fenotipagem no sistema ABO é composta pela prova globular ou direta e pela prova sérica ou reversa. Na prova globular, é testada uma suspensão eritrocitária do doente com soros comerciais anti-A e anti-B, não sendo obrigatória a utilização de soro anti-AB. Os soros de origem humana podem reagir com o antígeno B adquirido, pelo que o seu uso deve ser evitado. A tecnologia utilizada no Laboratório para a fenotipagem sanguínea ABO/Rh é a aglutinação em coluna (CAT) que será abordada mais a frente neste capítulo.

## ii. PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES (PAI)

A PAI tem por objetivo a detecção de anticorpos anti-eritrocitários clinicamente significativos no soro/plasma. Isto é, anticorpos potencialmente causadores de reações transfusionais hemolíticas, de diminuição da sobrevivência eritrocitária pós-transfusional ou de doença hemolítica do recém-nascido. A PAI inclui, obrigatoriamente, a realização de um teste de antiglobulina humana indireto, independentemente de vir a ser necessária a utilização de outros meios e/ou técnicas, se a situação clínica o justificar.

A utilização de outros meios e/ou outras técnicas (meios enzimáticos, por exemplo) não é aconselhável em rotina, devido ao número de resultados positivos sem qualquer importância clínica que podem ser obtidos. Na PAI utilizam-se suspensões eritrocitárias de doadores selecionados do grupo O, com fenótipo conhecido, devendo estas suspensões possuir os antígenos que originam a formação de anticorpos com significado clínico.

Devem utilizar-se suspensões de eritrócitos no mínimo de três doadores. Estas suspensões nunca devem ser misturadas, devendo utilizar-se separadamente, devido ao risco de ocorrer diminuição da sensibilidade da técnica. Sempre que a PAI é positiva, deve proceder-se à identificação da especificidade do(s) anticorpo(s) irregulares encontrado(s) no soro/plasma, para determinação da sua especificidade do seu significado clínico. A identificação de anticorpos irregulares deve incluir, obrigatoriamente, o meio no qual a PAI foi reativa.

### Teste da antiglobulina humana (Teste de Coombs)

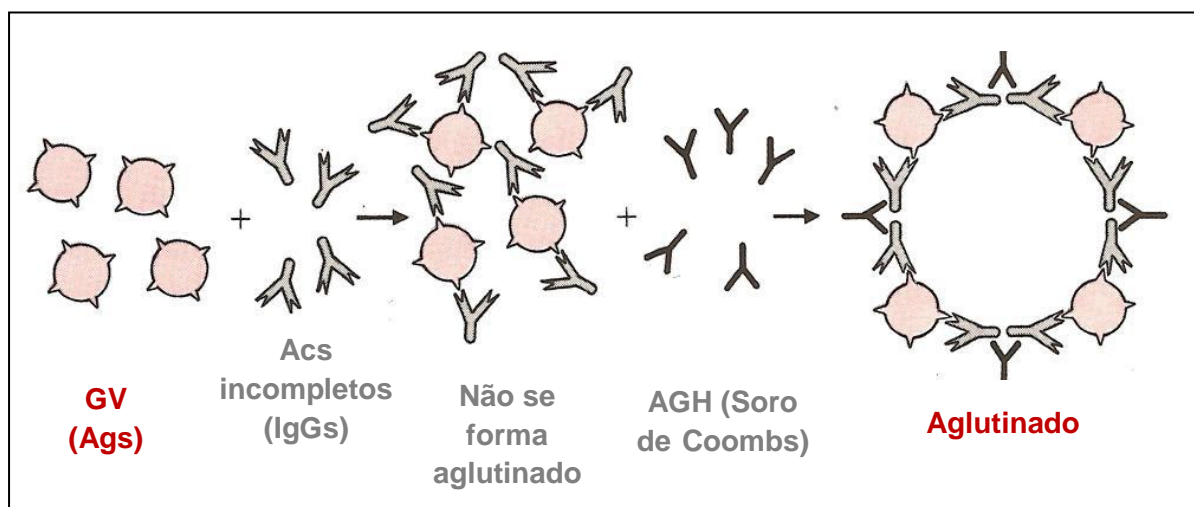


Figura 21 – Teste de Coombs

### **Teste de Coombs Direto**

A prova consiste na deteção de proteínas humanas (Imunoglobulinas e Complemento) fixadas *in vivo* sobre os glóbulos vermelhos do doente, através da adição de soro antiimunoglobulinas (soro de Coombs). Os anticorpos incompletos, quando em contacto com o antigénio à superfície dos eritrócitos, fixam-se à membrana dos mesmos bloqueando o antigénio, não tendo assim, capacidade para os aglutinarem. Se existirem anticorpos fixados aos eritrócitos a reação torna-se visível pela ação do soro de Coombs que serve de ligação entre anticorpos fixados provocando aglutinação dos eritrócitos.

Este teste é usado no estudo da doença hemolítica do recém-nascido, no diagnóstico das anemias hemolíticas autoimunes e nas reações transfusionais devidas a incompatibilidades sanguíneas.

### **Teste de Coombs Indireto**

Este teste tem como objetivo detetar anticorpos anti-eritrocitários presentes no soro do doente. A prova consiste em incubar o soro suspeito na presença de eritrócitos Rh+ suspensos em solução fisiológica a 37°C. Baseia-se na aglutinação de eritrócitos humanos sensibilizados *in vitro*, pelos anticorpos presentes no soro, após a adição da antiglobulina humana. Também é utilizado, no âmbito das transfusões, na prova de compatibilidade, para detetar anticorpos presentes no soro do recetor, que reconhecem antigénios presentes nos eritrócitos do dador.

### **g) Hemóstase e Coagulação**

O sangue deve-se manter-se fluído para que possa circular no interior dos vasos sanguíneos. A hemostase pode ser definida como o processo fisiológico que mantém o equilíbrio entre o risco de uma hemorragia e o risco de uma trombose. Combina assim, mecanismos celulares e bioquímicos de modo a manter o sangue fluído no seio das veias e artérias. Tem como principais funções prevenir hemorragias, após lesão de vasos sanguíneos; prevenir tromboses, restabelecendo o fluxo sanguíneo, uma vez colmatada a lesão do vaso.

Em situações normais quando a rutura ocorre em vasos de menor calibre, a paragem da hemorragia é feita pelo processo de Hemostase Primária (*constricção do vaso lesado e formação do tampão plaquetário*). Caso ocorra em vasos de calibre médio a formação de um rolhão plaquetário, não é suficiente e é necessário que haja Hemostase Secundária - Coagulação (*formação da fibrina*). O processo termina com a Hemostase Terciária – Fibrinólise (*destruição do coágulo de fibrina e manutenção da permeabilidade do vaso*).

Os fatores envolvidos na hemostase são:

- Vasos
- Plaquetas
- Iões cálcio
- Fator de von Willebrand (vWF; VWF)
- Fosfolípidos de origem plaquetária
- Proteínas da coagulação
- Trombina
- Inibidores da coagulação
- Fatores do sistema fibrinolítico

Uma **hemostase primária** eficaz requer três eventos primordiais: adesão plaquetária, libertação de grânulos e agregação plaquetária. Ao fim de alguns segundos após a lesão, as plaquetas aderem às fibrilhas do colagénio se endotelial através de um recetor plaquetar específico para o colagénio (glicoproteína Ia e IIa). Esta interação é estabilizada pelo fator de von Willebrand, que permite às plaquetas manterem-se aderentes à parede vascular apesar da corrente sanguínea. Seguidamente, as plaquetas sofrem um processo de ativação e são libertados os grânulos citoplasmáticos. A desgranulação é um fenómeno ativo que envolve a contração do microesqueleto plaquetar e termina com a libertação de vários mediadores (ADP, seretonina, cálcio, entre outros).

Após a ativação e desgranulação é libertada ADP que modifica a superfície plaquetar, permitindo ao fibrinogénio ligar-se às glicoproteínas IIb e IIIa das plaquetas, unindo assim plaquetas adjacentes e formando o tampão plaquetar no local da lesão vascular. O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) estimula o crescimento dos fibroblastos e das fibras musculares lisas da parede muscular, que constituem uma parte importante no processo de cicatrização.

Ao mesmo tempo que se forma o tampão primário, as proteínas plasmáticas da coagulação são ativadas para iniciar a **hemostase secundária**. A coagulação é um processo multifatorial e dinâmico com proteólise limitada que inicia com a ativação de duas vias enzimáticas (em que uma pequena quantidade de substâncias iniciadoras é capaz de ativar uma cascata sequencial de proteínas circulantes) e culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para conversão do fibrinogénio em fibrina (que estabiliza o tampão plaquetário). Estas reações de superfície, ocorrem no colagénio exposto, envolvendo fosfolípidos plaquetares e o fator tecidual. Com exceção do fibrinogénio, os fatores de coagulação são precursores enzimáticos ou cofatores.

Tabela 8 – Resumo Proteínas da Coagulação

Nomenclatura actual	Nome tradicional	Local de síntese	Semi-vida	Dependente da vitamina K
Factor I	Fibrinogénio	Fígado	90h	Não
Factor II	Protrombina	Fígado	65h	Sim
Factor III	Factor tissular	Tecidos	-	Não
Factor IV	Cálcio	-	-	Não
Factor V	Pró-acelerina	Fígado	15h	Não
Factor VII	Pró-convertina	Fígado	5h	Sim
Factor VIII	Globulina anti-hemofílica (AHG)	Endotélio Fígado	10h	Não
Factor IX	Factor Christmas	Fígado	25h	Sim
Factor X	Factor Stuart-Power	Fígado	40h	Sim
Factor XI	Antecedente Tromboplastínico plasmático	Fígado	45h	Não
Factor XII	Factor Hageman	Fígado	50h	Não
Factor XIII	Factor estabilizador da fibrina	Fígado	120h	Não
Pré-caliceína	Factor Fletcher	Fígado?	35h	Não

Ao conjunto das reações proteicas designa-se cascata da coagulação, sendo possível identificar duas vias geradas, a intrínseca e a via extrínseca. A síntese dos fatores envolvidos na cascata ocorre a nível hepático, sendo que a maior parte dos fatores estão presentes na forma inativa ou precursora. A forma ativa que participa na sequência é designada pela letra “a” após o numeral romano.

Na via intrínseca é considerado que o colagénio subendotelial exposto causa a ativação do fator XII e que, por sua vez, ativa o fator XI. A reação seguinte envolve a ativação do fator IX pelo fator XI ativado. Em associação com o cálcio e com o fator VIII, o fator IX ativado vai, por sua vez, ativar o fator X na superfície membranar em presença dos fosfolípidos plaquetares (fator plaquetar 3). A ativação do fator IX *in vivo* é desencadeada pelo fator VII, ativado pelo fator tissular. O fator XI, *in vivo*, é ativado pela trombina e apenas se torna importante em locais de grande traumatismo ou cirurgia. A deficiência congênita de fator VIII é denominada de hemofilia A e deficiência de fator IX é conhecida como hemofilia B.

Na via extrínseca, o fator tissular da superfície das células perivasculares liga-se ao fator VII, que, por sua vez, ativa o fator X. Neste processo, o fator VII é ele próprio ativado. Considera-se atualmente que o principal papel do fator VII, *in vivo*, é ativar o fator IX, mais do que ativar o fator X diretamente. A deficiência de fator VII, por si só, é muito rara, mas pode causar sangramento grave. A diástese hemorrágica por deficiência dos fatores VIII e IX, no entanto, é muito mais grave. Ambas as vias, convergem para formar a via comum, sendo que o fator X ativado em associação com o fator V, na superfície fosfolipídica e na presença de cálcio, converte a protrombina em trombina. Esta, por seu turno, hidrolisa o fibrinogénio, libertando os fibrinopéptidos A e B, com formação de monómeros de fibrina que se ligam espontaneamente por pontes de hidrogénio formando um polímero instável de fibrina. O fator XIII, ativado pela trombina e pelo cálcio, estabiliza este polímero pela formação de ligações covalentes.

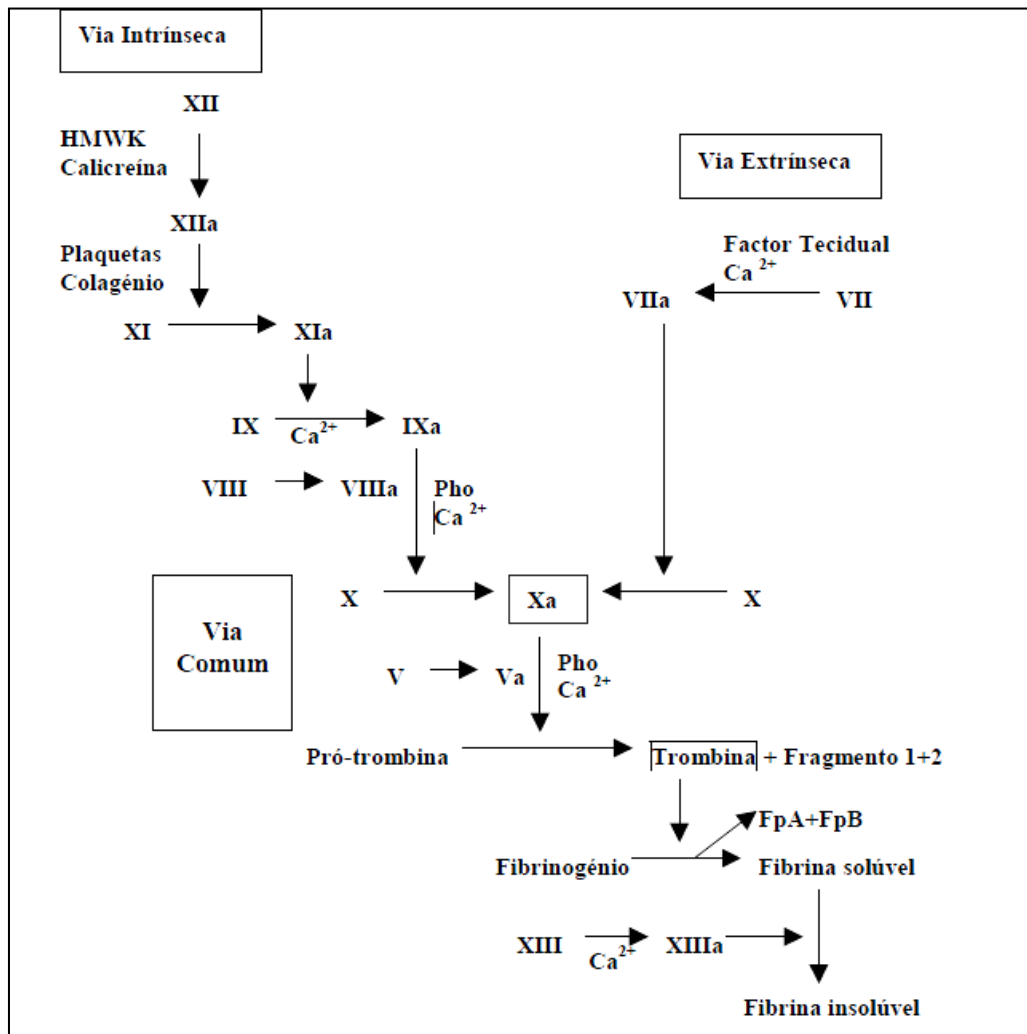


Figura 22 - Cascata da Coagulação (McFarlane)

### Anticoagulantes Naturais

1. **Antitrombina** - glicoproteína plasmática de síntese hepática que inibe a trombina e os fatores Xa, IXa e XIa. A inativação dos fatores de coagulação ativados é acelerada, em grande parte, pela heparina. Este reagente serve para a determinação rápida da AT fisiologicamente ativa e permite o diagnóstico da deficiência hereditária e adquirida de AT que representa um risco elevado de trombose.
2. **Proteína C** - glicoproteína plasmática de síntese hepática dependente da Vitamina K. A sua ativação devido à formação do complexo trombomodulina + trombina. Inibe os fatores Va e VIIa na presença da proteína S, fosfolípidos e cálcio.
3. **Proteína S** - glicoproteína plasmática sintetizada no fígado, no endotélio e megacariócitos. Atua como Cofator da Proteína C ativada na degradação dos fatores Va e VIIIa.
4. **Inibidor do Fator Tissular (TFPI)**

## **AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASE**

A avaliação laboratorial da hemostase é possível através de testes simples, suficientemente sensíveis e reprodutíveis, escolhidos de maneira a explorar as distintas fases. A nível laboratorial são efetuados testes de “*screening*” que medem o tempo de formação do coágulo até à formação da fibrina. A contagem das plaquetas (valor normal: 150 000 a 450 000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) e a avaliação da função plaquetar devem ser igualmente tidos em conta numa primeira avaliação clínica da hemostase.

Quando se pretende conhecer o funcionamento ou as possíveis alterações de um dos fatores específicos do fenómeno é necessário isolar ao máximo aquele que se pretende estudar de forma a evitar interferências dos outros fatores.

### **CONTAGEM DE PLAQUETAS**

A avaliação das plaquetas é preferencialmente escolhida para a avaliação global do mecanismo da hemostase primária. A contagem das plaquetas é realizada por método automático (o qual será descrito mais à frente neste capítulo), contudo, paralelamente, é importante a observação do esfregaço sanguíneo para verificar a presença de plaquetas gigantes, variações na morfologia e eventualmente agregação, permitindo assim a avaliação da funcionalidade das mesmas.

Importa notar que, dadas a dimensão reduzida das plaquetas e a sua tendência para aderir a superfícies estranhas e a agregarem-se quando ativadas, são de quantificação mais difícil que outros elementos figurados do sangue, originando deste modo, possíveis contagens erróneas. Podem surgir contagens falsamente reduzidas por exemplo pela presença de agregados plaquetários ou de plaquetas gigantes, enquanto que plaquetas falsamente elevadas podem traduzir a presença de fragmentos de hemólise de GV.

V.R.: 150.000 a 450.000/ $\mu$ L

### TEMPO DE PROTROMBINA (TP)

A protrombina é o precursor da trombina e só pode ser convertida por ação dos fatores III, X, V e fibrinogénio. Esta estimula e agregação plaquetária; converte o fibrinogénio em fibrina o plasminogénio em plasmina e a proteína C em proteína C ativada; e para além disso promove a reparação dos tecidos.

Na presença de iões cálcio, a tromboplastina tecidular ativa a via extrínseca da coagulação. Assim, a adição à amostra de plasma de um excesso de tromboplastina e iões cálcio vai desencadear a formação de um coágulo de fibrina; um plasma com deficiência num fator de coagulação da via tecidular levará mais tempo que um plasma normal para formar um coágulo.

O intervalo de coagulação está também aumentado em plasmas cujos fatores dependentes de vitamina K funcional se encontrem diminuídos por administração de anticoagulantes orais.

V.R.: 11-14 segundos

INR (International Normalized Ratio): <1.2 (pessoas saudáveis)

2 - 3 (doentes a tomar anticoagulantes)

$$INR = \left[ \frac{TP (doente)}{TP (normal)} \right]^{ISI}$$

Devido à possibilidade de se utilizarem diferentes reagentes para a determinação do TP, a *World Health Organization* instituiu a utilização do INR de forma a padronizar o método e obter resultados próximos, independentemente da variabilidade dos reagentes usados. Na fórmula acima apresentadas temos que o ISI (*International Sensitivity Index*) é dado pelo fornecedor do *kit*, para cada lote de tromboplastina. O TP dito normal é a média geométrica do valor de PT de pelo menos 20 adultos saudáveis.

Quanto mais elevado for o INR, mais tempo leva o sangue a coagular e maior será o risco de hemorragia. O INR é útil na monitorização da ação de um anticoagulante, como por exemplo, a varfarina, usada com frequência nos doentes com fibrilação auricular, na prevenção da formação de coágulos que posteriormente podem originar trombozes.

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

Avalia a via intrínseca e comum: VIII, IX, XI, XII e também os fatores X,V, Protrombina e fibrinogénio. O reagente fosfolipídico é misturado com o plasma para produzir uma ativação uniforme e otimizada da amostra. Após incubação a 37°C, durante um determinado período de tempo, a reação é iniciada pela adição de iões cálcio, sendo registado o tempo, em segundos, necessário à formação do coágulo de fibrina.

Aspetos importantes a ter em conta na avaliação laboratorial:

- Um plasma com deficiência num fator de coagulação da via intrínseca levará mais tempo que um plasma normal para formar um coágulo;
- Este teste é recomendado para a monitorização da terapêutica com heparina mas não é recomendado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, nem é sensível à disfunção plaquetária. Pode ainda ser aplicado na deteção do anticoagulante lúpico.

V.R.: 25- 35 segundos

## TEMPO DE TROMBINA (TT)

Avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina, medindo-se o tempo necessário até à formação do coágulo. Este teste é efetuado com plasma citratado e trombina bovina diluída. O tempo de coagulação depende da quantidade de fibrinogénio na amostra, sendo inversamente proporcional. É possível encontrar níveis baixos de fibrinogénio nos casos de hipofibrinogénemia ou afibrinogénemia adquiridas ou congénitas. Deste modo, revela-se importante a determinação do TT no rastreio de alterações na formação de fibrina e deficiência de fibrinogénio, bem como na monitorização da terapêutica fibrinolítica.

V.R.: 11 - 18 segundos

## FIBRINOGENIO

O fibrinogénio é uma molécula proteica que sob ação proteolítica da trombina é transformado em monómeros de fibrina, originando o retículo do coágulo. A sua determinação é efetuada com o objetivo de medir o tempo de coagulação de um plasma citratado diluído com um excesso de trombina. O resultado obtido em segundos é inversamente proporcional à sua concentração na amostra. Normalmente, as concentrações de fibrinogénio aumentam em caso de diabetes, síndromes inflamatórias e obesidade.

V.R.: 200 a 400 mg/dl

Tabela 9 - Avaliação de alterações hemostáticas com três testes globais

<b>EXAME DE TRIAGEM</b>	<b>ANOMALIAS INDICADAS PELO ALONGAMENTO</b>	<b>CAUSAS MAIS COMUNS ASSOCIADAS</b>
<b>Tempo de Protrombina (TP)</b>	Deficiência ou inibição de um ou mais dos seguintes fatores de coagulação: VII, X, V, II, fibrinogénio	Doença hepática Tratamento com anticoagulantes orais CID
<b>Tempo de Tromboplastina Ativada (aPTT)</b>	Deficiência ou inibição de um ou mais dos seguintes fatores de coagulação: XII, XI, IX, VIII, X, V, II, fibrinogénio	Tratamento com heparina Hemofilia
<b>Tempo de Trombina (TT)</b>	Deficiência ou anomalia de fibrinogénio ou inibição da trombina por heparina ou FDF	CID Heparina

## ***h) Sistemas Automatizados em Hematologia***

As amostras de sangue são enviadas, a partir da triagem, para o Sistema Modular em Cadeia existente no CORE. De acordo com o código de barras lido no *gate*, as amostras são enviadas para o equipamento correspondente, seguindo uma rota pré-definida com base nos parâmetros a analisar para determinada amostra. A informação recolhida é concomitantemente enviada para o *CentraLink* (*software* inerente à cadeia) e para o E-DEIA (*software* geral onde se encontra a informação relativa ao processo de cada amostra que dá entrada no laboratório). Findo o percurso de cada amostra, as mesmas são enviadas novamente na cadeia para garantir que todos os parâmetros foram devidamente executados.

### **i. ADVIA 2120® HEMATOLOGY SYSTEM**

O sistema Hematológico ADVIA® 2120/2120i é um instrumento totalmente automatizado de diagnóstico com um rendimento de 120 amostras por hora. O analisador utiliza amostras de sangue total para fornecer os seguintes tipos de resultados:

- Contagens completas de sangue (CBC);
- CBC mais contagens diferenciais dos leucócitos (CBC/Diff);
- Contagem absoluta, de percentagem e índices de reticulócitos (Retic);
- CBC/Diff mais Retic (CBC/Diff/Retic);
- CBC/Retic.

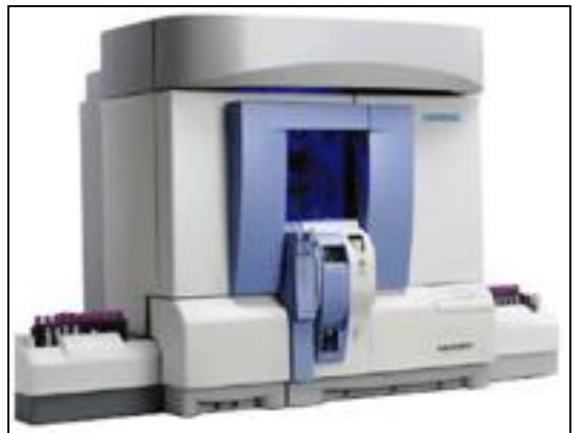


Figura 23 - ADVIA 2120 Hematology System

<https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/systems/advia-120-hematology-system>

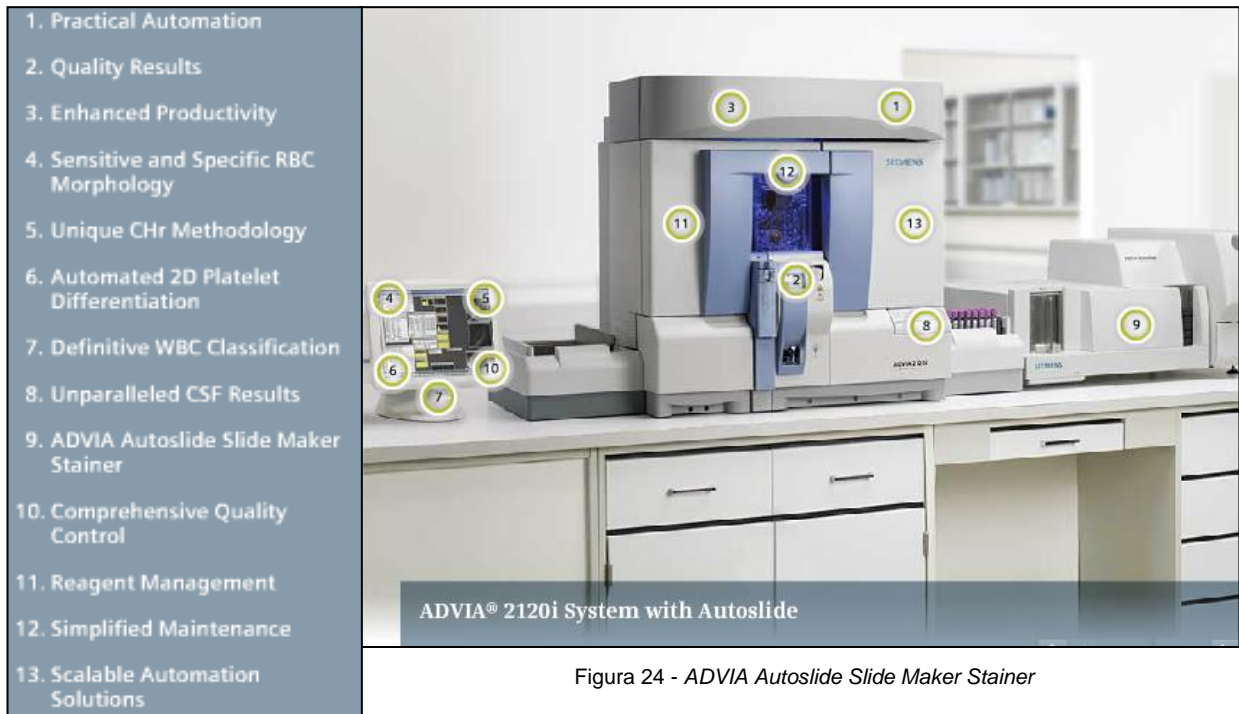


Figura 24 - ADVIA Autoslide Slide Maker Stainer

<https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide>

Este equipamento utiliza o método ótico (Peroxidase e Laser) para as suas determinações. O aparelho funciona com uma tecnologia designada de UFC (“*Unified Fluids Circuit*”), isto é, um circuito fechado com válvulas e bomba de fluídos, em que a junção de várias placas acrílicas origina diferentes câmaras /canais onde a amostra e os reagentes são misturados originando assim uma reação citoquímica.

As 5 câmaras de reação/ canais são:

1. A câmara de reação/canal de HGB
2. A câmara de reação/canal de RBC / Plt.
3. A câmara de reação/canal de Retic
4. A câmara de reação/canal de Perox
5. A câmara de reação/canal de Baso

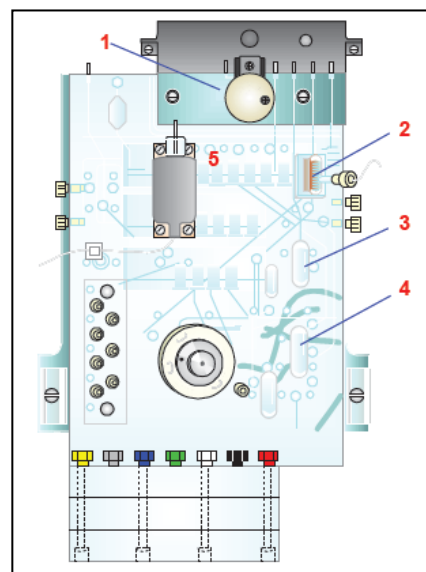


Figura 25 - ADVIA 2120 Câmaras de reação

ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide

## 1. Canal HGB (Hemoglobina)

As reações químicas da hemoglobina consistem em dois passos:

- Os glóbulos vermelhos são lisados libertando Hb;
- O ferro do heme da Hb é oxidado, passando do estado ferroso para o estado férrico, sendo depois combinado com o cianeto para formar o produto da reação.

As leituras óticas são obtidas colorimetricamente a 546 nm. Após a leitura, os dados óticos são marcados na curva de taxa de hemoglobina, onde, tempo, em segundos, é representado graficamente ao longo do eixo x, e a percentagem de transmissão de luz é marcada ao longo do eixo y, formando assim o histograma de transmissão de hemoglobina.

## 2. Canal RBC/Plt (Eritrócitos e Plaquetas)

As reações citoquímicas RBC / plaquetas consistem em dois passos:

- O reagente ADVIA contém dodecilsulfato de sódio (SDS) e glutaraldeído que provocam a forma esférica dos glóbulos vermelhos e das plaquetas. Quando os glóbulos vermelhos e as plaquetas são isovolumetricamente esferificados, o fator de variabilidade é eliminado.
- Os glóbulos vermelhos e plaquetas são fixados.

## 3. Canal Retic. (Reticulócitos)

As reações citoquímicas dos reticulócitos consistem em dois passos:

Etapa 1 – os glóbulos vermelhos e as plaquetas são esferificados isovolumetricamente usando o reagente ADVIA 2120 / 2120i autoRETIC.

Etapa 2 – os reticulócitos são corados diferencialmente com base no seu conteúdo de RNA, utilizando para tal um corante vital, oxazine 750.

#### 4. Canal PEROX (Peroxidase)

As reações citoquímicas da peroxidase são compostas por três etapas:

Etapa 1 – Os glóbulos vermelhos são lisados através da adição do reagente ADVIA 2120 / 2120i Perox 1 e da alta temperatura da câmara de reação.

Etapa 2 – Os glóbulos brancos são fixos usando o reagente ADVIA 2120 / 2120i Perox 1. Este reagente contém formaldeído que fixa os leucócitos. O meio hipertônico causa alguma contração e crenação dos leucócitos incrementando o índice de refração das células melhorando a detecção dos linfócitos.

Etapa 3 – Os glóbulos brancos são coradas usando os reagentes ADVIA 2120 / 2120i Perox 2 e ADVIA 2120 / 2120i Perox 3.

Os glóbulos brancos são identificados com base no tamanho e nas diferentes intensidades de reação da peroxidase (coloração). Os neutrófilos, eosinófilos e monócitos são corados com base nos seus níveis de atividade da peroxidase. Uma vez que os linfócitos, basófilos e as células não coradas grandes não contêm peroxidase, estas permanecem sem coloração. No citograma Perox as células absorvem a luz proporcionalmente à quantidade de coloração da peroxidase presente (eixo x). As células dispersam a luz proporcionalmente ao seu tamanho (eixo y). Quando os dados de dispersão da luz e de absorção são traçados, formam-se *clusters* distintos. A análise de *clusters* identifica cada população com base na sua posição, área e densidade, a seguir, é processado o número de células de cada população.

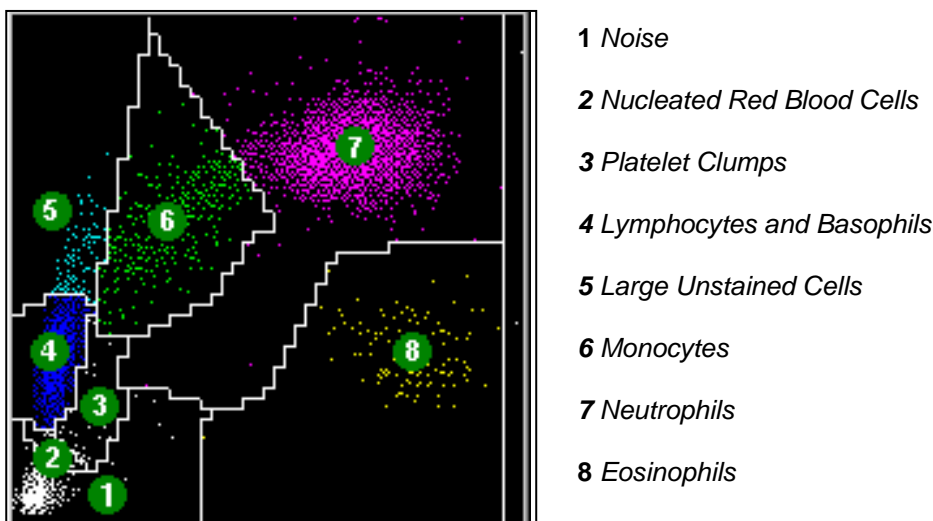


Figura 26 - Citograma Perox ADVIA 2120 Hematology System

ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide

## 5. Canal BASO

As reações citoquímicas dos Basófilos dividem-se em duas etapas:

Etapa 1 – O reagente ADVIA 120 BASO vai lisar os eritrócitos e as plaquetas.

Etapa 2 – Todos os leucócitos exceto os basófilos são separadas do seu citoplasma através da utilização do reagente ADVIA 120 BASO e do aumento da temperatura na câmara de reação. A medição é feita através de um volume constante da suspensão celular da câmara de reação de basófilos, que passa através da célula de fluxo.

Quando a dispersão de luz de alto ângulo (configuração nuclear) é representada no eixo x, e a difusão da luz de baixo ângulo (tamanho da célula) é representada no eixo y, populações ou grupos distintos são formados. A análise de agrupamento identifica cada população com base na sua posição, área, densidade e, em seguida, conta o número de células / núcleos em cada população.

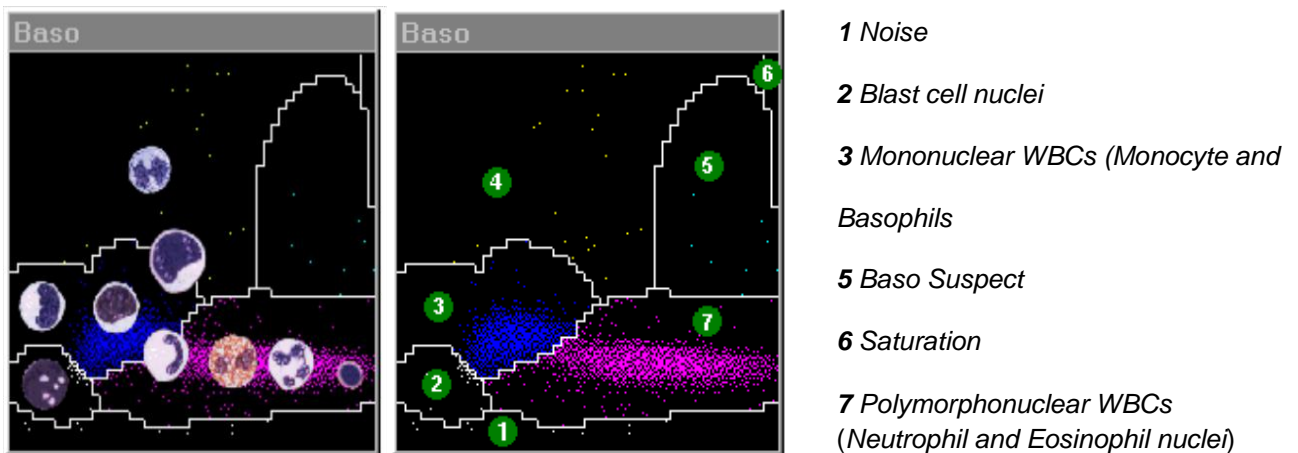


Figura 27 - Canal Baso ADVIA 2120 Hematology System

ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide

## ii. ADVIA® AUTOSLIDE

O Laboratório JCS, dada a dimensão de análises que realiza e processa, dispõe de um equipamento automatizado destinado à execução de esfregaços e coloração automática de lâminas - o ADVIA® AutoSlide Maker. Este equipamento utiliza a coloração de May-Grunwald-Giemsa, descrita anteriormente neste capítulo, e que se aplica de igual modo a um sistema automatizado, para a diferenciação dos diferentes componentes sanguíneos e consequente observação/leitura microscópica.

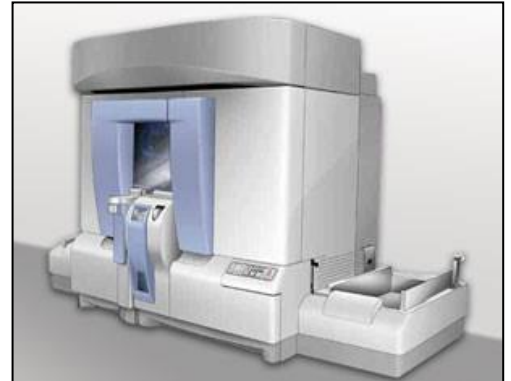


Figura 28 - ADVIA AutoSlide Maker

<https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide>

## iii. VES MATIC CUBE®

Este sistema permite a determinação direta da velocidade de sedimentação globular em amostras de sangue em EDTA. A VS é determinada diretamente no mesmo tubo primário utilizado para o hemograma sem necessidade de tudo dedicado para a colheita em Citrato. A capacidade do sistema é de 30 amostras por corrida que inclui a homogeneização automática e padronizada e a própria leitura.



Figura 29 - VES Matic Cube 80

<http://www.diesse.it/en/Instruments/id:48/>

A velocidade de sedimentação depende da concentração plasmática de proteínas tais como o fibrinogénio e as imunoglobulinas. No caso de valores elevados pode-se associar a formação marcada de *rouleaux* de eritrócitos no sangue periférico ou em caso de anemia severa devido à baixa concentração de eritrócitos. Os valores mais baixos estão normalmente associados a policitemia vera devido à elevada concentração de eritrócitos. No caso do volume da amostra a analisar ser bastante reduzido ou em casos de necessidade de confirmação de valores muito elevados recorre-se à técnica manual da determinação da Velocidade de Sedimentação Eritrocitária, ou seja, através do **Método de Westergren** modificado com recurso a sistemas fechados descartáveis.

Neste caso são utilizados tubos de plástico, contendo anticoagulante onde se colhe a amostra. O enchimento do tubo graduado fechado é feito até à marca de 0 mm, através de uma diferença de pressões e após perfuração da rolha do tubo onde se encontrava a amostra. Após 1 hora efetua-se a leitura em milímetros, ao nível da coluna dos glóbulos que se separam do plasma.

#### iv. **BIO-RAD VARIANT II™**

É um analisador automático que avalia os índices de Hemoglobina Glicada (HbA1c) numa amostra de plasma venoso. Os aparelhos Bio-Rad são analisadores de Cromatografia Líquida de Alta Definição (HPLC), completamente automatizados, que não requerem preparação prévia de amostra e demandam pouco manuseio prático por parte do operador.

As estações de amostras aceitam tubos primários com código de barras. Os equipamentos efetuam a leitura do código de barras das amostras do tubo fechado, diluem e injetam a amostra na estação cromatográfica para análise. A amostra é hemolisada pelo autosampler depois é transferida para a coluna onde as frações da hemoglobina da amostra são separadas. As frações eluidas passam por um fotómetro sendo os resultados de absorvância transmitidos para um microprocessador que identifica e integra as frações eluidas.

Os resultados são processados pelo Software CDM (*Bio-Rad Clinical Data Management*). O CDM está ligado com o sistema interno de informação do próprio laboratório para transmissão de dados em tempo real bem como a gestão superior de dados, de forma a garantir a transmissão em tempo real dos dados clínicos obtidos. Para a diluição da amostra são necessários *kits* fornecidos pela própria casa comercial, que contêm reagentes e solução de lavagem.

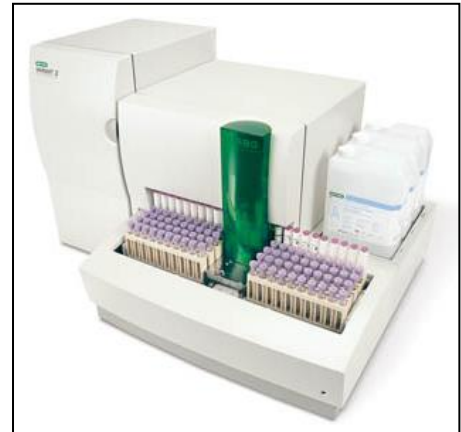


Figura 30- *Bio-Rad Variant II*

<http://www.bio-rad.com/enmx/product/hemoglobinopathies/variant-ii-instrumentation>

## V. ORTHO AUTOVUE® INNOVA SYSTEM

O objetivo deste equipamento é realizar de forma automatizada testes de imunohematologia através da execução de reações de aglutinação Ag-Ac - tecnologia de aglutinação em coluna (CAT). O equipamento dispõe de um sistema de cassetes com 6 microcolunas, sendo que cada coluna contém uma câmara de reação, uma zona de ar e o reagente com esferas de vidro. As reações de hemaglutinação correspondem ao reconhecimento dos Ag's eritrocitários pelos Ac's presentes no soro - reação de sensibilização. As moléculas de Ag e Ac mantêm-se unidas à custa de forças intermoleculares não covalentes, que apenas são eficazes quando é possível um contacto próximo entre eles, formando-se assim uma estrutura de ligação entre as células adjacentes (e que permitem que a reação se torne visível) – reação de aglutinação.



Figura 31 - Ortho AutoVue®

<https://www.orthoclinical.com/en-nz/solutions-products/transfusion-medicine/immunohematology/ortho-autovue-innova-system>

As amostras de sangue são introduzidas na câmara reação localizada na parte superior da coluna. Cada coluna possui no seu interior uma matriz filtrante formando uma rede de poros. Após centrifugação os eritrócitos sofrem um processo de filtração e os eritrócitos aglutinados são retidos por esta rede, sendo que os não aglutinados são deslocados para o fundo do tubo, onde forma um *pellet*.

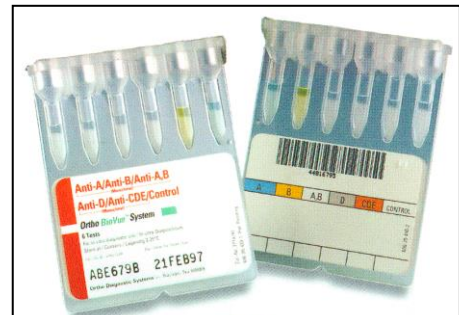


Figura 32 - Sistema de Cassetes

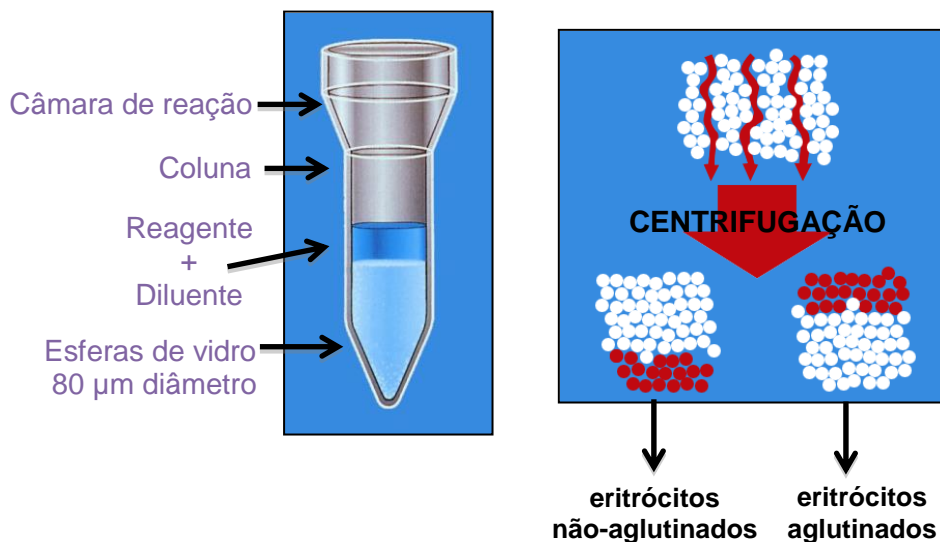


Figura 33 - Constituintes e reação no interior da câmara

Para interpretar o resultado é necessário observar as cassetes e registrar a existência ou não de aglutinação. Portanto, o resultado revela-se *negativo* quando os eritrócitos atravessam a coluna e se depositam no fundo desta. O resultado é *positivo* quando se forma uma aglutinação que fica no topo do reagente e não atravessa as esferas de vidro.

### Interpretação dos Resultados

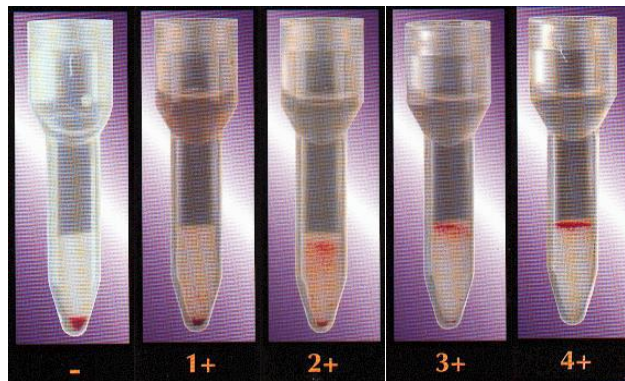


Figura 34 – Resultados Possíveis

### vi. **BCS® XP SYSTEM**

Este equipamento, baseado nos princípios da fotometria e turbidimetria, permite avaliar a hemostase de forma automatizada, efetuando testes funcionais para aferir a formação de coágulo. O analisador dispõe de uma fonte de luz intermitente de Xenon com emissão de banda larga, em que um filtro de interferência é utilizado para obter luz com o comprimento de onda desejado. A luminância transmitida é canalizada em partes iguais através de um canal de medição e um canal de referência. Utiliza-se o plasma obtido em tubo de citrato (por mistura de 1 parte de solução de citrato de sódio a 3,2% com 9 partes de sangue) como amostra. O citrato trissódico atua por remoção do Cálcio, sendo o anticoagulante mais utilizado na avaliação da hemostase e coagulação. São adicionados os reagentes de acordo com os parâmetros e os fatores de coagulação pretendidos (TP, INR, aPTT, etc.), juntamente com a amostra e os controlos respetivos para cada reagente. Com base no tipo de reagente (s) adicionado (s) assim será avaliada a resposta do plasma citratado do doente no que ao processo de coagulação diz respeito.



Figura 35 - BCS® XP System

<https://www.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/bcs-xp-system>

Alguns dos parâmetros não se efetuam diariamente como rotina no LJC, sendo as amostras imediatamente congeladas e só se descongelam num banho-maria a 37°C, imediatamente antes de colocar no equipamento para realizar a análise requerida.

## **i) Técnicas Manuais em Hematologia**

### **i. RESISTÊNCIA OSMÓTICA GLOBULAR**

A resistência osmótica globular avalia a capacidade dos glóbulos vermelhos em absorver certa quantidade de água no seu interior antes que ocorra a lise da célula. A resistência depende da forma, volume, tamanho, conteúdo de hemoglobina e vida média dos eritrócitos, e pode ser alterada por vários fatores fisiológicos ou patológicos. Numa situação normal, e dada a forma bicôncava do glóbulo vermelho, permite aumentar o volume até 70% antes da hemólise.

Quando diminui a fragilidade osmótica aumenta a resistência osmótica, o que indica a presença de eritrócitos anormalmente achatados em que se encontra diminuída a relação volume/superfície e portanto existe uma menor capacidade de absorver água tornando-se mais suscetíveis à lise.

Os esferócitos apresentam resistência osmótica diminuída, como no caso das esferocitoses hereditárias e esferocitoses associadas a anemias hemolíticas auto-imunes; os micrócitos hipocrômicos e as "*target cells*", por outro lado, apresentam resistência globular aumentada, como ocorre nas anemias ferropénicas e talassemia, por exemplo.

#### **Princípio da técnica:**

Na técnica realizada os glóbulos vermelhos são submetidos a concentrações crescentes de cloreto de sódio em 12 tubos distintos. Quando é atingido um certo volume intracelular, os poros da membrana da célula permitem a saída da hemoglobina. As células hemolisadas são removidas pela centrifugação (2000 rpm / 10min.) e utiliza-se um espectrofotómetro para determinar o grau de hemólise de cada tubo, através da quantidade de hemoglobina livre na solução.

Valores de Referência:

Hemólise inicial (resistência mínima): 0,45 a 0,55 mg% NaCl

Hemólise total (resistência máxima): 0,20 a 0,30 mg% NaCl

## ii. PESQUISA DE CÉLULAS LE

Esta técnica pretende avaliar as doenças autoimunes, especialmente Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Esta patologia pode ser definida como uma doença autoimune prototípica caracterizada por anticorpos para DNA, afetando 50 em cada 100.000 pessoas com uma taxa de incidência de 9:1 entre mulheres e homens. O grupo de idade prevalente é de mulheres jovens com idades entre 25 e 35 anos.

Um dos diagnóstico possíveis do LES é a detecção do anticorpo antiDNA contra o DNA nativo. O teste rápido AVITEX-SLE® OMEGA Diagnostics é realizado na área de Hematologia (embora seja uma técnica de serologia) e tem como finalidade a demonstração indireta de Ac antinucleares, sendo que os núcleos celulares são separados do citoplasma e incubados com o soro do indivíduo.

### Procedimento e Princípio da Técnica:

Deixar o reagente, controlos e o soro do paciente atingirem a temperatura ambiente. Efetuar primeiramente os controlos e só depois proceder ao teste. As partículas de látex do AVITEX-SLE® são revestidas com DNA de filamento duplo. Quando a suspensão de látex é misturada com o soro contendo anticorpos anti-DNA de filamento duplo, observa-se uma nítida aglutinação dentro de 3 minutos.



Figura 36 - Kit AVITEX-SLE® OMEGA

<http://www.masterdiagnostica.com.br/img/produtos%7C139422140713942214077946577372.jpg>

1. Transferir uma gota de soro do paciente (50 µL) para o círculo de teste no cartão.
2. Homogeneizar vigorosamente o reagente látex e então, utilizando o conta-gotas fornecido, adicione uma gota da suspensão no círculo de teste.
3. Misturar as gotas usando um bastão descartável cobrindo toda a área do círculo com a mistura.
4. Homogeneizar suavemente com movimentos circulares na horizontal o cartão de teste por 3 minutos, observando a formação ou não de aglutinação.
5. Os resultados são dados como *Negativo* caso não se verifique aglutinação e *Positivo* caso se observe aglutinação.

### **iii. REAÇÃO DE PERLS**

O número de siderócitos está elevado nos doentes esplenectomizados e nas anemias sideroblásticas e hemolíticas, e nos doentes com síndromes mielodisplásicas. A concentração de ferritina sérica correlaciona-se melhor com as reservas totais de ferro do organismo do que os dados obtidos com a coloração de *Perls*, não obstante, esta última revela-se mais vantajosa na obtenção de informação clínica sobre a eficácia do aporte de ferro para os eritroblastos. A hemossideriúria ocorre em doentes com insuficiência venosa periférica crónica por sobrecarga circulatória, permitindo avaliar a sua gravidade sendo que surge 2 a 4 dias após episódios hemolíticos agudos (anemia hemolítica).

A coloração de *Perls* baseia-se na reação entre o ferrocianeto ácido e o ião férrico ( $Fe^{3+}$ ) da hemossiderina, com conseqüente formação de ferrocianeto férrico que se cora com azul intenso (azul-da-Prússia). A ferritina, solúvel, não origina uma reação positiva.

Valores de Referência:

Nº Siderócitos por 100 eritrócitos: 0,3% adulto | 0,3-1,7% recém-nascido

Urina: Ausentes

### **iv. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA (POR TURBIDIMETRIA)**

A adesão de plaquetas nas paredes dos vasos sanguíneos e subsequente agregação são eventos cruciais tanto na hemorragia quanto na trombose. Quaisquer alterações funcionais ao nível das plaquetas e, concomitantemente, das suas funções (adesão, secreção, agregação e Atividade pró-coagulante) poderão afetar a hemostase e originar desequilíbrios. A agregação excessiva das plaquetas pode causar a formação de um trombo e a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando a um processo isquémico. A terapia anti-plaquetária com ácido acetilsalicílico (vulgarmente conhecido como Aspirina) reduz até 25% o risco de enfartes do miocárdio não-fatais, acidentes vasculares cerebrais isquémicos ou mortes de causa vascular em pacientes de alto risco. Para avaliar laboratorialmente a eficácia dessa terapêutica (ou terapêuticas anticoagulantes), ou ainda avaliar a função plaquetária após uma transfusão sanguínea, o método mais utilizado é o teste de agregação plaquetária.

O exame é realizado a partir do sangue total do paciente utilizando seguidamente um instrumento turbidimétrico denominado agregómetro (Chrono-log® 700 Aggregometer). Para ser possível realizar o teste é necessário que o valor das plaquetas do paciente seja superior  $100 \times 10^9/L$  ou o valor do hematócrito se encontre acima dos 20% (a inobservância destes pontos pode interferir com a obtenção de resultados credíveis). São preparados dois plasmas: um rico em plaquetas (através de centrifugação a  $\pm 800$  rpm/15min.) e outro pobre em plaquetas (através de centrifugação a  $\pm 4500$  rpm/20min.) que servirá como branco de amostra.



Figura 37 - Chrono-log® 700  
Aggregometer

<http://www.chronolog.com/Model700.html>

São necessários 6 tubos contendo a amostra mais 6 tubos contendo os controlos, sendo igualmente usados os seguintes reagentes (agonistas), de acordo com o pedido médico:

- ADP (adenosina 5'disfosfato)
- Colagénio
- Ristocetina
- Epinefrina

O plasma rico em plaquetas é colocado em contato com os agonistas. Ocorre, então, a formação crescente de grandes agregados plaquetários, acompanhados de diminuição da absorvância da luz da amostra. A mudança na densidade ótica é transmitida pelo instrumento, em percentagem de agregação, originado num gráfico representativo da respetiva curva de agregação plaquetária.

Valor de Referência: 60-100%

## **B. CORE LABORATORIAL – BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Na secção de Bioquímica Clínica chegam diversas amostras biológicas (soro, urina, fezes, etc.), sendo que na triagem os tubos de gel são, primeiramente, centrifugados a 3500 rpm por 15' e posteriormente dão entrada na cadeia e são distribuídos pelos vários equipamentos, de acordo com os parâmetros a avaliar. Para além das amostras de sangue mais recorrentes, é igualmente realizada a análise de urinas neste sector. As urinas de 24 horas (previamente medidas e vertidas para um frasco de amostra de urina) e amostras de urina que exijam determinação bioquímica (microalbuminúria, ácido úrico, proteínas urinárias, entre outras) são também processadas no Core Laboratorial. Relativamente à urina de 24 horas, é sempre registado o volume de recolha de urina numa lista de trabalho (o valor vem indicado normalmente no próprio frasco) para que o Técnico responsável valide manualmente as determinações destas amostras, consoante o volume de recolha que tem que ser introduzido no sistema informático.

A maioria das técnicas neste departamento é realizada, sobretudo, de forma automatizada, pelo que irei de seguida descrever os principais equipamentos/métodos com os quais tive contacto, bem como algumas técnicas. Neste sector foi ainda possível realizar outros procedimentos que fazem parte da rotina laboratorial dita normal, como trocar reagentes nos equipamentos automatizados, realizar controlos e calibrações, limpeza dos aparelhos, arquivo de amostras, etc.

## a) Equipamentos Automatizados em Bioquímica

### i. CLINITEK ATLAS® AUTOMATED URINE CHEMISTRY ANALYZER

Este equipamento é utilizado para a avaliação físico-química e bioquímica de **Urinas Tipo II**, disponibilizando informação sobre a função renal e hepática, metabolismo dos carboidratos (por exemplo diabetes *mellitus*), bem como possíveis infecções do trato urinário. Contém no seu interior um rolo plástico de 490 tiras reativas convencionais, dispondo cada uma das tiras de 10 áreas impregnadas com reagente, permitindo apurar os seguintes índices:

- Glicose
- Bilirrubina
- Corpos cetônicos
- Hemoglobina
- pH
- Densidade
- Proteínas
- Urobilinogénio
- Nitritos
- Leucócitos



Figura 38 - Clinitek Atlas®

<https://www.healthcare.siemens.pt/urinalysis/systems/clinitek-atlas-auto-urine-chem-analyzer-rack>

#### Especificidades Básicas do Equipamento

- Testes por determinações físicas: gravidade específica pelo método de índice de refração; clareza por medição de luz transmitida e dispersa.
- Medição das tiras reativas: mudança de cor medida por fotometria de refletância. Leituras duplas no comprimento de onda de referência.

Para que a avaliação seja concretizada o aparelho necessita de pelo menos 2 mL de urina. Quando não é possível obter este volume, o teste é efetuado manualmente através da utilização de tiras reativas individuais.

O Clinitek Atlas® combina os princípios da espectrofotometria de refletância com reagentes adequados e altamente eficientes concebidos para obter resultados qualitativos ou semi-quantitativos.

O equipamento analisa eletronicamente e em comprimentos de onda previamente definidos, as amostras quanto à sua coloração e intensidade da luz refletida em cada uma das zonas da tira que contém o reagente apropriado. Também determina a gravidade específica e a clareza da amostra de urina.

Relativamente aos índices avaliados, revela-se essencial explicar a importância em termos fisiológicos e biopatológicos de alguns destes parâmetros:

#### a) PROTEÍNAS

Em condições fisiológicas normais o rim tem um papel crucial na manutenção da homeostase proteica no organismo, sem um mecanismo de conservação eficaz, as reservas proteicas do organismo seriam eliminadas muito rapidamente. A maior parte das proteínas filtradas são reabsorvidas a nível do túbulo proximal retornando à circulação, no entanto, muitas das proteínas plasmáticas são encontradas na urina. Em situações normais não se detecta a presença de proteínas na urina, pelo que a situação fisiopatológica reside no seu aparecimento em concentração suficiente que permita a sua deteção por métodos laboratoriais (> 500mg/dL ou 0,5g/L).

A presença de proteínas na urina pode ser devida a um aumento na sobrecarga de filtração ou na diminuição da capacidade reabsortiva devido a lesão tubular. O perfil das proteínas excretadas pode ser útil na identificação da causa e na classificação da proteinúria:

- Aumento da carga de filtração glomerular devido ao aumento da permeabilidade glomerular (em que há aumento progressivo de excreção de proteínas de maior Massa Molecular à medida que essa permeabilidade aumenta); aumento da concentração plasmática de proteínas livremente filtradas (ex.: proteína de *Bence-Jones*) e diminuição do número de glomérulos.
- Diminuição da capacidade de reabsorção tubular devido a lesão túbulo proximal e diminuição do número de glomérulos.
- Destruição ou secreção post-glomerular devido a hematuria.

No próprio Core Laboratorial é possível identificar as proteínas presentes nas amostras de urina (ou de soro) através do método de imunofixação das proteínas, método este que será apresentado mais à frente ainda neste capítulo.

## b) GLUCOSE

O rim pode excretar, normalmente, pequenas quantidades de glucose (< 30mg/dL). Este é o açúcar mais frequentemente encontrado (quando presente em valores exagerados) na urina, o que pode estar muitas vezes relacionado com hiperglicémia (diabetes *mellitus*), que traz ao filtrado glomerular uma quantidade de glucose superior à capacidade de reabsorção tubular.

Mas é, também, importante referir que existem numerosas situações de glicosúria sem hiperglicémia, provocada por uma anomalia ou uma insuficiência dos processos tubulares (diabetes renal). Devido à sua importância na deteção e monitorização do doente diabético a glucose é o teste químico mais efetuado na urina, não sendo detetado neste produto biológico enquanto a concentração no plasma não ultrapassa o limiar renal (160 – 180 mg/dL).

## c) HEMOGLOBINA

Normalmente não se deteta a presença de sangue na urina, a observação deste poderá indicar a presença de glóbulos vermelhos, hemoglobina ou mioglobina, tendo cada um destes casos origem e conseqüente significado clínico diferente, a saber:

- A presença anormal de eritrócitos (hematúria e hemorragias) está mais relacionada com alterações a nível renal e urogenital. Situações de hemorragias podem estar na origem de cálculos renais, tumores, traumas, etc.
- A hemoglobina (hemoglobinúria) na urina resulta na lise dos glóbulos vermelhos produzidos no trato urinário (urina diluída e alcalina) que poderá estar relacionada com hemólise intravascular e filtração pelo glomérulo, quando há Hb livre no plasma por se ter esgotado a haptoglobina (100 a 140 mg/dl).
- A Mioglobínúria pode surgir devido a dano muscular.

Por outro lado, poderão ser encontrados glóbulos vermelhos na urina de mulheres menstruadas, não sendo neste caso, naturalmente, uma situação patológica.

#### d) LEUCÓCITOS

Numa urina normal geralmente não surgem leucócitos. A presença ou aumento destes (piúria) relaciona-se com quase todas as doenças do trato urinário e renal, podendo ser um bom indicador de infecção. Contudo, a piúria pode estar presente em condições não-infecciosas. Torna-se essencial portanto efetuar o estudo microscópico do sedimento urinário para avaliar as características destes elementos bem como apurar a existência de outros elementos figurados na urina que poderão originar doenças ao nível renal.

#### e) CORPOS CETÓNICOS

Os corpos cetónicos são compostos orgânicos constituídos por Ácido Acetoacético, b-Hidroxi-butírico e Acetona, produzidos pelo fígado, a partir de ácidos gordos livres, como energia alternativa quando a glicose (principal fonte de energia do corpo) não está disponível. Esse fato pode ocorrer quer por falta de insulina em circulação quer por não haver glicose em quantidade suficiente para ser utilizada pelo organismo.

Os corpos cetónicos ( $\pm 10\text{mg/dL}$ ) surgem normalmente nas urinas do diabético descompensado, em casos de jejum prolongado, exercício físico intenso e nas grávidas. Só serão valorizados em termos laboratoriais se existir glicosúrias associadas.

#### f) pH (urinas normais ligeiramente ácido (5,5-6,0))

Juntamente com os pulmões, os rins são os maiores reguladores do conteúdo ácido-base do organismo. Fazem-no através da secreção de iões  $\text{H}^+$  (iões amónio, ácidos orgânicos fracos e hidrogenofosfatos) e pela reabsorção de iões bicarbonato.

O pH de uma urina fresca nunca pode atingir o valor de 9,0 em condições normais ou patológicas (este valor está associado a uma urina mal conservada).

- ❖ Urinas ácidas - dieta rica em proteínas, jejum prolongado, “acidose metabólica” e “respiratória”, bactérias produtoras de ácidos.
- ❖ Urinas alcalinas - dieta vegetariana, “alcalose metabólica” e “respiratória”, bactérias produtoras de amónia que degradam a ureia.

### g) BILIRRUBINA

A bilirrubina é o principal pigmento constituinte da bÍlis e resulta da lise dos glóbulos vermelhos. A urina de adulto contém quantidades aproximadas de 0,02mg/dL de bilirrubina, o que não é detetável pelos equipamentos, inclusive os mais sensíveis. Quando aumentada pode estar associada a hemólise aumentada e em fases iniciais de doença hepática.

Se a Bilirrubina direta for  $\leq 0,60$ mg e o índice de icterícia do soro for  $< 1,0$  negativam-se os resultados.

Para a contagem de elementos figurados presentes na urina, utiliza-se o Citómetro Sysmex UF-1000i™, que utiliza a citometria de fluxo e impedância como tecnologias principais.

### ii. SYSMEX UF-1000i™ AUTOMATED URINE PARTICLE ANALYZER

Este equipamento fornece a contagem de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias, cristais e leveduras, etc. através da medição por Citometria de fluxo fluorescente com laser díodo e foco hidrodinâmico. O equipamento dispõe de dois canais de medição:



Figura 39 - SYSMEX UF-1000i™

- 1) Canal dedicado à contagem de bactérias
- 2) Canal para análise dos elementos formados da urina

[https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/UF1000i\\_PT\\_v02\\_low.pdf](https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/UF1000i_PT_v02_low.pdf)

A citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor fornece resultados de alta qualidade com simplicidade e eficiência, já que permite a diferenciação das populações celulares sem qualquer intervenção por parte dos profissionais de laboratório ou necessidade de identificação microscópica dos elementos formados da urina.

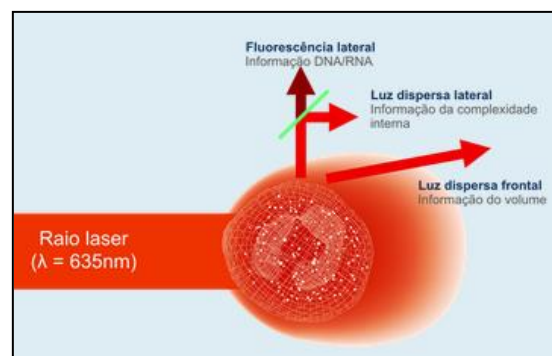


Figura 40 - Citometria de Fluxo Fluorescente

Cada partícula gera um sinal específico de acordo com a sua composição interna ao reagir com os corantes fluorescentes. A combinação de luz dispersa lateral (complexidade interna da célula), luz dispersa frontal (volume celular) e fluorescência das partículas coradas fornece a quantificação específica de cada elemento, garantindo deste modo a padronização e a obtenção de resultados de alta qualidade.

Não obstante, caso surjam valores elevados em alguns dos parâmetros no exame sumário da urina, ou caso o aparelho emita alertas (presença de cilindros patológicos, cristais, células pequenas redondas, etc.) deve-se proceder ao **exame microscópico do sedimento urinário** para confirmar a presença de componentes insolúveis e confirmar, de igual modo, os valores elevados identificados no exame primário. Posto isto, os achados clínicos no exame microscópico do sedimento urinário sobrepõem-se aos resultados obtidos pelo equipamento.

Para efetuar o sedimento urinário é importante ter em conta:

1. Volume de urina analisada (urina tipo II)
2. Velocidade de centrifugação (1500 a 1800 rpm)
3. Ressuspender o sedimento em volume igual (0.5 a 1 ml)
4. Observar ao microscópio, entre lâmina e lamela (no LJC utilizam-se pequenas “cassetes”, contendo 10 poços, onde será colocada uma gota do sedimento do paciente num dos poços). Na observação microscópica, deve-se primeiramente utilizar a pequena ampliação (objetiva de 10) e passar para a objetiva de 40. As contagens são feitas por 10 campos e efetuada consequentemente a média.

O sangue, os rins o trato urogenital inferior e contaminação externa, todos contribuem para os elementos figurados presentes: glóbulos vermelhos e brancos; células epiteliais; cilindros; bactérias, fungos, parasitas; muco; espermatozoides; cristais e artefactos. Como alguns não apresentam significado clínico e outros são considerados normais a não ser que estejam presentes em quantidades elevadas, a avaliação do sedimento urinário inclui não só a identificação mas também a sua quantificação.

## PRINCIPAIS ELEMENTOS FIGURADOS COM IMPORTÂNCIA CLÍNICA NO EXAME MICROSCÓPICO DO SEDIMENTO URINÁRIO

### - Células epiteliais

É relativamente comum a presença de células epiteliais na urina, uma vez que são originárias do sistema genito-urinário. A não ser que estejam presentes em número elevado ou morfologicamente alteradas, refletem a descamação normal das células velhas (renovação celular normal).

Podem observar-se 3 tipos principais de células epiteliais (sendo classificadas de acordo com a localização do tecido de origem):

- de descamação
- células epiteliais de “transição” (uroteliais)
- tubulares renais (ovais)

As mais vulgares, de descamação, mais abundantes na mulher, por contaminação vaginal ou uretral, no homem por contaminação uretral, têm citoplasma abundante, irregular e núcleo de tamanho similar aos glóbulos vermelhos (pequeno e evidente). Podem ser reportadas como: raras, algumas, muitas e incontáveis. A sua identificação é normalmente fácil, podendo, no entanto, aparecer: dobrada, semelhante aos cilindros urinários ou aparecer parcialmente destruída se a urina não for fresca.

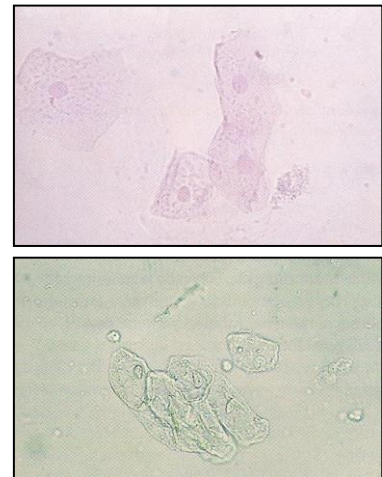


Figura 41 - Células epiteliais de descamação

Numa urina muito rica neste tipo de células pode haver dificuldade na identificação de elementos mais pequenos, como os glóbulos vermelhos ou brancos. Estas células representam a renovação celular normal.

As células epiteliais de transição (uroteliais) são mais pequenas que as de descamação e podem apresentar várias formas: esféricas, poliédricas e caudadas. Estas diferenças são devidas à capacidade destas células de absorverem grandes quantidades de água pelo contacto direto com a urina. Todas as formas têm o seu núcleo localizado no centro da célula, e tal como as células de descamação, podem ser reportadas como: raras, algumas, muitas e incontáveis.

As formas esféricas apresentam alguma dificuldade na distinção das células tubulares renais, sendo a localização do núcleo importante na identificação. Um aumento deste tipo de células, apresentando uma morfologia anormal como vacúolos e núcleo irregular pode ser indicativo de malignidade ou infeção viral.



Figura 42 - Células epiteliais de "transição" na urina

As células tubulares renais variam em tamanho e forma dependendo da zona de origem: retangulares (proximal), redondas ou ovais (distal). Estas células são as que apresentam maior significado clínico, estando presentes como resultado de necrose dos túbulos renais com a possibilidade da função global renal estar afetada.



Figura 43 - Células tubulares renais na urina

As condições que podem levar à necrose tubular incluem:

- exposição a metais pesados
- toxicidade induzida por hemoglobina e mioglobina
- infeções virais (hepatite B)
- pielonefrite
- reações alérgicas
- malignidade
- intoxicação por salicilatos

- **Eritrócitos** (0 a 2 por campo)

São as células mais pequenas (7µm de diâmetro), não nucleadas e com a forma de disco bicôncavo. Podem ser:

- redondas
- crenadas, (numa urina concentrada)
- mais esbatidas, o seu tamanho dependente da densidade da urina
- em urinas diluídas as células absorvem água, lisam, libertando Hb (*ghosts*)

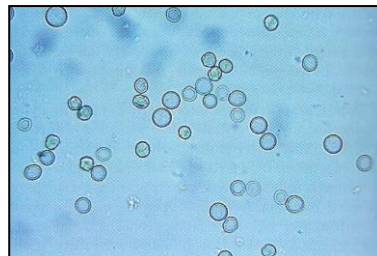


Figura 44 - Eritrócitos na urina

Normalmente são confundidas com leveduras, gotas de gordura e bolhas. A adição de CH<sub>3</sub>COOH pode ajudar a distinguir. Os eritrócitos estão elevados nas doenças renais e do trato urinário (lesão da membrana glomerular e/ou lesão vascular no sistema genito-urinário, doenças glomerulares, reações tóxicas a medicamentos, litíase, etc. Quando o número é elevado e os glóbulos vermelhos 80% normais, na maior parte das vezes são devidas a litíase.

- **Leucócitos** (0 a 3 por campo no Homem / 3 a 5 por campo na M e criança)

São células de maior dimensão do que os eritrócitos, medindo cerca de 12 µm de diâmetro. Os glóbulos brancos mais prevalentes são os neutrófilos, facilmente identificados por conterem grânulos e serem polinucleados. Numa urina diluída e alcalina, os neutrófilos lisam rapidamente, perdendo o seu núcleo.



Figura 45 - Leucócitos na urina

Piúria – número elevado de leucócitos, neutrófilos que aparece em todas as doenças renais e do trato urinário. Quando acompanhados de cilindros são de origem renal

+20 leucócitos - anormal

+30 leucócitos – infeção aguda

Tanto os eritrócitos como os leucócitos devem ser reportados numericamente pela média de contagem por 10 campos.

## - Cilindros

Os cilindros são os únicos elementos encontrados no sedimento urinário exclusivos do rim e são compostos de mucoproteínas - Tamm-Horsefall - presentes na urina na forma solúvel, que em situação de estase urinária precipitam, tomando a forma do local onde se formam, porção distal do nefrônio e nos túbulos coletores

Fatores propícios para o seu aparecimento relacionam sobretudo com o aumento da concentração de proteínas, presença de sais e pH baixo.

Os cilindros urinários podem ser classificados de acordo:

1. com a aparência da matriz:
  - hialina
  - granulosa
  - cerosa
2. pelas inclusões:
  - eritrócitos
  - leucócitos
  - células epiteliais renais
3. pelos materiais embebidos na matriz:
  - finamente divididos
  - grosseiramente
  - fibrinosos

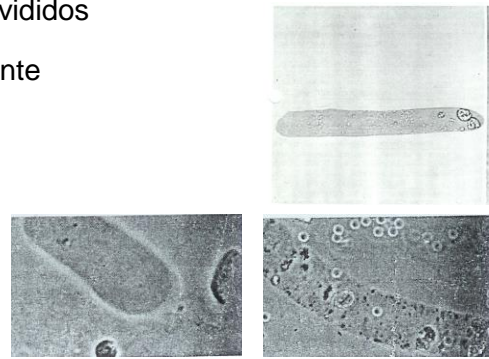


Figura 46 - Cilindros na urina

## - Cristais

Os cristais são formados pela precipitação de solutos urinários, incluindo sais inorgânicos, compostos orgânicos e medicamentos (compostos iatrogênicos).

A precipitação depende de alterações de:

- temperatura
- concentração dos solutos
- pH que afetam a solubilidade

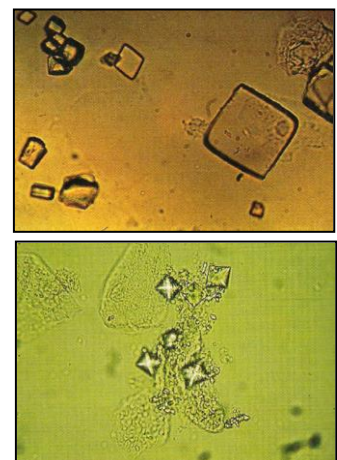


Figura 47 – Cristais de ácido úrico e oxalato de cálcio na urina, respetivamente

Os cristais, frequentemente encontrados na urina, raramente apresentam significado clínico. Podem aparecer como estruturas geométricas bem definidas ou como material amorfo, devendo ser reportados como raros, alguns, muitos e incontáveis; os cristais considerados anormais devem ser quantificados/campo.

Assim, é clinicamente significativo a presença de:

- cristais normais em grande número (ácido úrico ou oxalato de cálcio)
- anormais – basta a identificação de um (cistina, colesterol, etc.)

Em suma e para concluir considera-se um sedimento anormal aquele que apresenta os seguintes achados no exame microscópico:

- Mais de 5 eritrócitos ou leucócitos / campo
- Mais de 2 células tubulares renais / campo
- Mais de 3 cilindros hialinos / campo
- 1 cilindro granuloso / campo
- Mais de 10 bactérias / campo
- presença de fungos
- presença de parasitas (*Trichomonas vaginalis*)
- cristais patológicos
- grandes quantidades de cristais normais

### iii. ADVIA® 2400 CHEMISTRY SYSTEM

Este aparelho permite a determinação de parâmetros bioquímicos em diferentes tipos de amostras biológicas (soro, plasma, derrames das serosas, urina e LCR), por métodos colorimétricos, de turbidimetria e de potenciometria indireta.



Figura 48 - Advia® 2400 Chemistry System

<https://www.healthcare.siemens.pt/clinical-chemistry/systems/advia-2400-chemistry-system>

O equipamento inclui métodos para testar drogas de abuso, drogas terapêuticas (TDM), cistatina C (novos ensaios), bem como proteínas específicas e parâmetros bioquímicos em geral (Cálcio, Magnésio, Fósforo inorgânico, Colesterol Total, HDL, LDL, Ácido Úrico, Bilirrubina direta, Bilirrubina total, Glucose, AST, etc.). O equipamento também permite analisar eletrólitos, medindo as concentrações de sódio, potássio e cloreto nas amostras de soro, plasma ou urina com base no método de potenciometria que utiliza eletrodos ião-seletivos (ISE).

### Princípio do Método de Espectrofotometria

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na absorção e/ou emissão de radiação eletromagnética por muitas moléculas, quando os seus elétrões se movimentam entre níveis de energia diferentes. A Luminiscência corresponde à emissão de luz por uma molécula e ocorre quando o elétron volta ao estado fundamental a partir de um estado excitado e perde o excesso de energia sob a forma de fóton. Este fenómeno engloba 3 técnicas distintas: espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de fosforescência e espectroscopia de quimioluminescência.

Ao expor-se uma molécula à radiação, a molécula vai absorver energia passando a um estado energético superior, mas regressa ao estado fundamental libertando a energia absorvida. Uma molécula excitada pode voltar ao estado fundamental por uma combinação de processos. Dois desses processos são a fluorescência e a fosforescência que envolvem a emissão de fótons (radiação). A fluorescência é medida a um comprimento de onda fixo, enquanto se faz variar o comprimento de onda de excitação; ajustando a intensidade da fonte de radiação e a resposta do detetor este espectro é semelhante a um espectro de absorção.

### Princípio do Método de Turbidimetria

Permite comparar intervalos de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de várias substâncias com o limite de deteção de vários métodos, sendo portanto um método de medição da luz dispersa. A turvação causa atenuação (diminuição) da intensidade de um feixe de luz quando este passa através de uma solução de partículas. A turbidimetria é uma medida da diminuição da intensidade da luz incidente causada pela dispersão, reflexão e absorção do feixe de luz de uma dada intensidade.

A turbidimetria é mais adequada para a leitura de valores médios ou altos de turvação, onde há uma forte dispersão da luz devido ao elevado número de partículas. Neste caso, uma diminuição da intensidade da luz transmitida é mais exata que a medida da luz dispersa a um ângulo de 90°.

### Princípio do Método Potenciometria

Os métodos potenciométricos medem a força eletromotriz (fem) de células galvânicas de tal modo constituídas, que o potencial de um dos componentes do par eletrolítico possa ser tomado como uma resposta às concentrações de espécies iônicas presentes na solução. A potenciometria baseia-se na medição do potencial dum eletrodo indicador em relação a um eletrodo de referência, quando não passa corrente através da solução em que estão mergulhados. Esse potencial depende das atividades das espécies que entram nas reações redox correspondentes, através da equação de Nernst (relaciona a fem de uma célula galvânica e a concentração dos reagentes e produtos numa reação de oxi-redução quando as condições são diferentes das condições-padrão).

### PRINCIPAIS EXAMES/PARÂMETROS EXECUTADOS

#### **i. Ionograma**

O ionograma representa o quadro numérico que indica a quantidade de íons básicos (catiões) e de íons ácidos (aniões) no plasma (ionograma sanguíneo) ou na urina (ionograma urinário). Os catiões do plasma são representados por: sódio, potássio, cálcio e magnésio; os aniões são representados por: cloro, bicarbonato, fosfatos ácidos, sulfatos, ácidos orgânicos e proteínas. As quantidades totais de aniões e de catiões do plasma expressas em miliequivalentes por litro (mEq/l) são normalmente iguais

O equipamento, no módulo de ionograma, permite a execução de 600 testes/hora. Neste caso, mede-se a voltagem do tampão e a voltagem da amostra, utilizando eletrodos seletivos, que dispõem de sensores com capacidade para medir diretamente fluidos biológicos, como sejam, sódio, potássio e cloro. O potencial de cada eletrodo é medido relativamente a um eletrodo de voltagem estável fixa por cloreto de prata, o eletrodo de referência. A diferença entre as voltagens, a voltagem de referência e a temperatura dos líquidos vai permitir determinar a concentração do Na<sup>+</sup>, K e Cl<sup>-</sup> no soro ou plasma.

## ii. Avaliação do Metabolismo dos Hidratos de Carbono

- Glucose e Glucose Pós-Prandial

Um nível de glicose no plasma  $\geq 126$  mg/dL em jejum (8 h no mínimo) e um nível  $\geq 200$  mg/dL pós-prandial, após confirmação, é suficiente para o diagnóstico de Diabetes mellitus.

- Prova de Tolerância Oral à Glucose (PTOG)

Avalia a clearance da glucose em circulação após uma sobrecarga (administração oral de glucose) definida e em condições controladas. Esta prova deve ser realizada em 2 ocasiões diferentes, separadas, para ser considerada patológica.

### Procedimento:

1. Antes da administração da glucose: tempo 0 da prova – colheita de sangue e urina
2. Administração da glucose anidra ou mono-hidratada (dose: 75g no adulto – 40g/m<sup>2</sup>, criança 1,75g/Kg até 75g) dissolvida num volume de água de 250 a 300 mL, sendo a velocidade de ingestão de 5'.
3. Colheitas de 30 em 30 minutos, até aos 120 minutos

Um valor de jejum  $\leq 100$ mg/dl, ou valores durante a prova não superiores a 140 mg/dl, é suficiente para excluir o diagnóstico de Diabetes Mellitus.

## iii. Avaliação do Perfil Lipídico

O perfil lipídico é considerado como potente preditor de doença coronária (estudo de *Framingham*). O doseamento dos lípidos, das apolipoproteínas, bem como lipidograma permitem caracterizar diferentes hiperlipidémias.

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

Os estudos bioquímico-moleculares são especialmente indicados em:

- ✓ Indivíduos com valores de colesterol plasmáticos elevados
- ✓ Indivíduos jovens com história de EAM e/ou AVC e de colesterol plasmático elevados
- ✓ Nos membros das famílias em que exista um diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar para identificação dos indivíduos com risco elevado de aterosclerose.

Tabela 10 - Classificação fenotípica das hiperlipidemias (Fredrickson)

Fenótipo	Soro	Lipoproteínas				Lípidos Séricos	
		Quilomicra	VLDL	IDL	LDL	Colesterol	Triglicéridos
I	Leitoso	++++	N ou ↓		Baixo	200-400	3000-7000
IIa	Claro	0	Normal		+++	300-1000	<160
IIb	Claro ou ligeiramente turvo	0	++	N ou +	++	280-350	200-500
III	Claro ou ligeiramente turvo	0	++	++	++	300-500	200-900
IV	Turvo	±	+++		N ou baixo	<270	200-1000
V	Leitoso	++++	++		Baixo	≤500	<3000

As hiperlipidémias podem ser classificadas de acordo com a sua etiologia genética/metabólica.

Tabela 11 - Classificação etiológica das Hiperlipidémias Primárias – bases genéticas e metabólicas

DOENÇA	ALTERAÇÃO PRIMÁRIA	ALTERAÇÃO METABÓLICA	FENÓTIPO	RISCO CORONÁRIO
<b>Hipercolesterolemia Comum</b>	Múltiplos fatores ambientais e genéticos	Produção aumentada de LDL e/ou diminuição do catabolismo do LDL	IIa	+
<b>Hiperlipidemia Familiar Combinada</b>	Desconhecida	Produção aumentada de ApoB100 da VLDL e/ou da LDL	I IV	++
<b>Hipercolesterolemia Familiar</b>	Pelo menos 600 mutações que condicionam disfunção do recetor do LDL	Produção aumentada de LDL e/ou diminuição do catabolismo do LDL	IIa; IIb; IV	++++
<b>Hiperlipidemia dos Remanescentes (tipo III)</b>	Coexistência de isoformas de apoE não funcionantes associadas com alterações do metabolismo do VLDL/LDL, adquirido ou herdado	Não conversão das partículas remanescentes em LDL	III	+++
<b>Hipertrigliceridemia Familiar</b>	Desconhecida	Produção aumentada de VLDL e/ou diminuição do catabolismo do VLDL	IV; V	?
<b>Síndrome das Quilomicras</b>	Deficiência da Lipoproteína Lipase ou do seu cofator essencial, apo-CII	Incapacidade de metabolização das quilomicras.	I; V	

Deste modo, as principais determinações analíticas recomendadas para o estudo do perfil lipídico são:

- Colesterol Total
- Colesterol HDL
- Colesterol LDL
- Colesterol VLDL
- Triglicéridos
- Apolipoproteína AI
- Apolipoproteína B100

Os principais parâmetros laboratoriais para aferir a existência de lesões ao nível do fígado e da função renal são:

iv. **Avaliação da Função Hepática**

- Bilirrubina
- Albumina
- Transaminases (AST, ALT)
- Fosfatase alcalina
- Gama glutamiltransferase

v. **Avaliação da Função Renal**

- Ureia
- Creatinina
- Clearance da creatinina
- Ácido úrico
- Proteinúria

#### iv. ADVIA® CENTAUR CP CHEMISTRY SYSTEM

O Centaur CP é um equipamento automático de técnicas imunoenzimáticas, com detecção de analitos por quimioluminiscência. A quimioluminiscência constitui uma reação química que emite energia sob a forma de luz, quando combinada com imunoensaio, a luz



produzida pela reação é proporcional à quantidade de analito na amostra. O Centaur CP permite a execução de métodos imunológicos por ligação competitiva e

Figura 49 - Advia® Centaur CP Chemistry System

<https://www.healthcare.siemens.pt/immunoassay/systems/advia-centaur-cp-immunoassay-sys>

sandwich, utilizando éster de acridina como marcador quimiluminescente, que na presença de peróxido de hidrogénio é oxidado sendo maximizada a emissão de luz pela alteração do ambiente de ácido para básico. A emissão de luz é bastante rápida, tornando a técnica de quimioluminiscência mais rápida do que os métodos de RIA ou EIA (Enzyme Imuno Assay).

#### PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS:

- Doseamento da Ferritina
- PTH (hormona da paratiróide ou paratormona)
- Imunoglobulina E (IgE) específica
- CK-MB
- FSH
- hCG
- TSH
- Anticorpos anti-HCV (vírus da hepatite C)
- Anticorpos anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana)
- Anticorpos anti-HAV (vírus da hepatite A)

## **b) Equipamentos Automatizados em Imunologia**

### **i. IMMULITE 2000 IMMUNOASSAY SYSTEM**

É um analisador de imunologia da Siemens. Este sistema realiza ensaios tendo como base a tecnologia de quimioluminescência e utiliza esferas de poliestireno com anticorpos específicos adsorvidos à superfície como fase sólida. Cada esfera é dispensada num tubo de reação com características próprias que serve como recipiente de incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal.



Figura 50 - Immulite 2000 *Immunoassay System*

<https://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-2000-immunoassay-system>

De seguida a amostra é incubada com o anticorpo marcado com uma enzima (fosfatase alcalina) sendo que, posteriormente, a mistura é separada da esfera através de uma rotação a alta velocidade do tubo de reação sobre o seu próprio eixo vertical, fazendo com que o material excedente se acumule numa câmara superior do tubo. Segue-se uma série de 4 lavagens para assegurar que a esfera fica desprovida de qualquer fração não ligada. A fração ligada é então quantificada utilizando como substrato quimioluminescente o dioxetano que, ao reagir com a fosfatase alcalina ligada à esfera, promove a emissão de luz. A intensidade de luz emitida é detetada por um fotomultiplicador sendo o resultado, calculado com base numa curva padrão. Podem ser realizados ensaios em sandwich ou competitivos.

#### **PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS NO EQUIPAMENTO:**

- Ácido Fólico
- Vitamina B12
- hCG

## ii. CAPILLARYS 2 SEBIA

Utiliza-se este equipamento de Eletroforese Capilar de Zona em solução livre para quantificar as variantes da hemoglobina e efetuar a eletroforese de proteínas.

De uma forma geral, as amostras de sangue são introduzidas no equipamento, que procede de forma automática à adição da solução hemolizante, incubação da amostra e injeção no capilar. As moléculas

**carregadas** são separadas pela sua mobilidade eletroforética, num **tampão alcalino com um pH específico**. A separação ocorre, igualmente, em função do pH do electrólito e do fluxo electro-osmótico.



Figura 51 - Capillarys 2 Sebia

<http://www.sebia.com/en-EN/groupeproduits/capillary-electrophoresis>

### Eletroforese de Proteínas

O soro é composto por dezenas de diferentes proteínas cuja concentração poderá ter interesse clínico. A eletroforese de proteínas séricas revela 5 a 6 bandas.

- O valor normal da concentração de proteínas totais é 6 - 8 g/dl
- A albumina é a proteína maioritária 3.5 – 5 g/dl.
- As frações das globulinas no seu total correspondem a 2 – 3.5 g/dl e são compostas por: proteínas de transporte e proteínas de fase aguda (bandas alfa e beta), sintetizadas no fígado
- As Imunoglobulinas (banda gama) sintetizadas por células plasmáticas

A eletroforese de zona consta de 3 fases fundamentais:

- Fase separativa (que depende da carga da molécula, do tamanho da molécula, do campo elétrico, do suporte e do tempo e da temperatura de separação)
- Fase identificativa (Coloração)
- Fase quantitativa (Densitometria -percentagem relativa de proteínas em cada fração).  
Multiplica pelas [Proteínas Totais] = [Proteína]<sub>fração</sub>.

A separação das hemoglobinas ocorre num meio líquido tamponado a pH alcalino, no interior de tubos capilares de sílica. A velocidade da eletro-osmose leva a uma migração catódica das moléculas que, são detetadas e semi-quantificadas (%) diretamente por espectrofotometria a 415 nm. Os resultados surgem em software apropriado com representação gráfica das bandas obtidas.

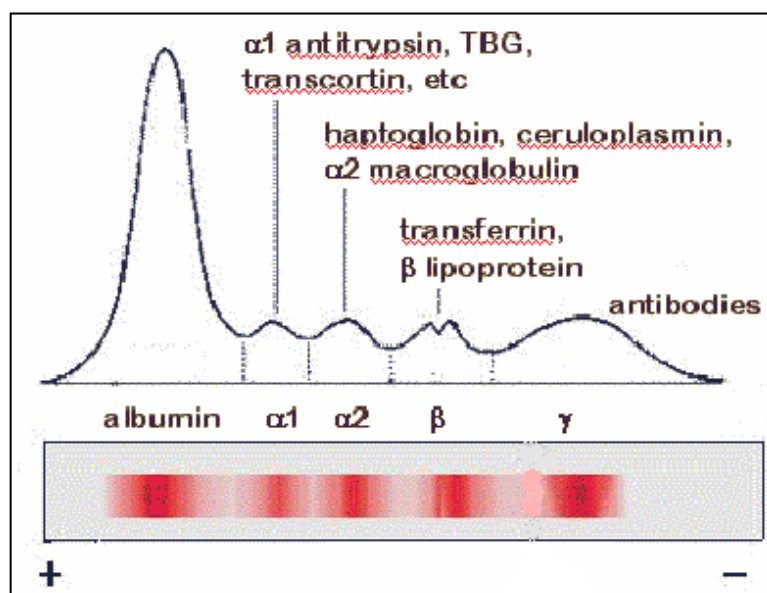


Figura 52 – Perfil Eletroforético

O perfil eletroforético pode ser normal, ou alterado por situações fisiológicas ou patológicas. Nesses casos poderá apresentar:

- Bandas diminuídas ou ausentes
- Bandas com intensidade aumentada
- Bandas com mobilidade anormal

Por esse motivo devemos fazer correr paralelamente com a amostra em estudo, um soro normal. A obtenção de eletroforeses com perfis sugestivos de situações patológicas é auxiliar de diagnóstico, de prognóstico e a sua normalização reflete muitas vezes monitorização terapêutica da doença.

## EXEMPLOS DE PERFIS PATOLÓGICOS

### ➤ Cirrose Hepática

Quando a função hepática está diminuída, a capacidade de síntese proteica está comprometida e as concentrações de albumina e das alfa e beta globulinas estão diminuídas. Adicionalmente, observa-se a “ponte cirrótica” (fusão das bandas beta e gama) devido ao aumento de IgA.

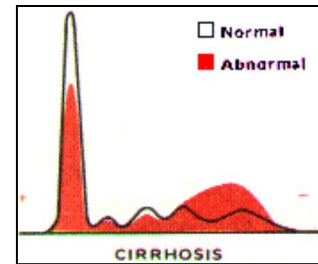


Figura 53 - Perfil Eletroforético Cirrose Hepática

### ➤ Síndrome nefrótica

Perda seletiva de proteína pelo rim, com perda massiva de proteína na urina devido a permeabilidade aumentada no glomérulo. Observa-se diminuição da albumina, alfa-1, beta e gama, e elevação da alfa-2 devido a acumulação de alfa-2-macroglobulina (não é filtrada e a sua síntese aumenta).

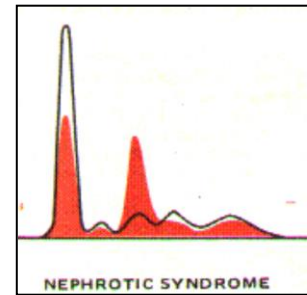


Figura 54 - Perfil Eletroforético Síndrome Nefrótica

### ➤ Inflamação Aguda

Aumento das bandas alfa-1 e alfa-2 durante a resposta inflamatória, quase sempre associado a diminuição da albumina, devido a proteínas de fase aguda.

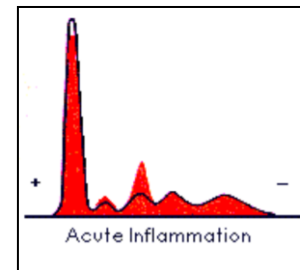


Figura 55 - Perfil Eletroforético Inflamação Aguda

### ➤ Inflamação Crônica

Associada às proteínas de fase aguda, síntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B com aumento da banda gama policlonal.

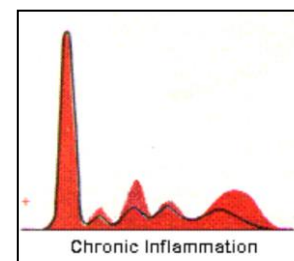


Figura 56 - Perfil Eletroforético Inflamação Crônica

➤ Deficiência em alfa-1-antitripsina

Doença genética. Observa-se uma banda alfa-1 reduzida que deve ser confirmada por quantificação imunoquímica.

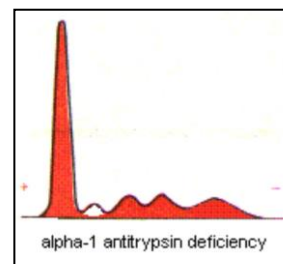


Figura 57 - Perfil Eletroforético Deficiência em alfa-1-antitripsina

➤ Imunodeficiência

Deficiente síntese de imunoglobulinas que se revela por uma diminuição marcada da banda gama. Indivíduos sujeitos a infecções recorrentes.

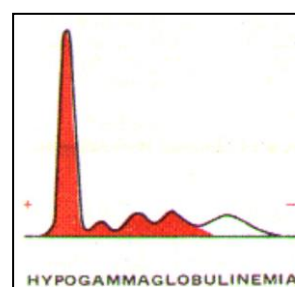


Figura 58 - Perfil Eletroforético Imunodeficiência

➤ Gamopatia Monoclonal

Banda que surge como um pico na região gama. Normalmente está associado a mieloma ou é consequência de patologias como macroglobulinemia de Waldstrom (IgM), gamopatias monoclonais secundárias e idiopáticas.

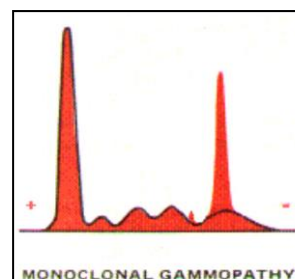


Figura 59 - Perfil Eletroforético Gamopatia Monoclonal

### iii. HYDRASYS® SEBIA

É um equipamento semiautomático destinado à eletroforese e imunofixação de proteínas por gel. A eletroforese das proteínas é uma técnica bastante utilizada em meio laboratorial que tem como principal propósito a pesquisa de modificações no perfil das proteínas nas amostras tratadas, possibilitando a realização de Lipidogramas, quantificação de Imunoglobulinas e a pesquisa da proteína de Bence Jones.

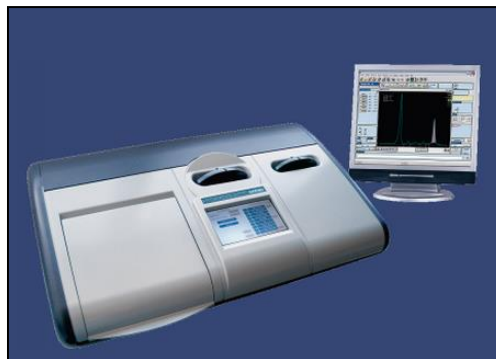


Figura 60 - Hydrasys® Sebia

<http://www.sebia.com/en-EN/produits/hydrasys-2-scan>

Cada amostra é diluída num tampão de diluição e os capilares são cheios com o tampão de separação, as amostras são então injetadas por aspiração para a extremidade anódica do capilar. Dependendo do comprimento de onda associado à extremidade do cátodo do capilar, é possível identificar e quantificar as diferentes frações de proteínas. Deverá ser usado como amostra o soro (e não plasma) devendo o mesmo ser bem centrifugado, pois o fibrinogénio constitui um interferente que origina banda entre a fração Beta e Gama, quando presente, podendo dar origem a equívocos.

O equipamento é constituído por dois módulos que funcionam de modo independente. O da esquerda é destinado à corrida eletroforética sendo apenas necessário colocar o gel de agarose e um “pente” aplicador da amostra. No caso de ser uma imunofixação é ainda necessário um passo extra no qual é usada uma “máscara” que serve para aplicar os anticorpos.

O módulo da direita destina-se à coloração e secagem do gel de forma a revelar o resultado. As proteínas são separadas por eletroforese em meio alcalino (pH 9,2) e depois imunoprecipitadas com anti-soros de especificidades diferentes: anti-cadeias pesadas e anti-cadeias leves. Após imunofixação, as proteínas imunoprecipitadas são coradas com negro de amido ou violeta ácido. O excesso de corante é eliminado em meio ácido.

O procedimento geral da técnica consiste em:

- 1) Aplicar amostras, as urinas são aplicadas diretamente, os soros são previamente diluídos de forma automática em cuvetes no HydraPlus e aplicadas sobre os pentes;
- 2) Colocar o gel adequado e tiras embebidas com tampão. Com papel de filtro retira-se o excesso de humidade no gel;
- 3) Colocar os pentes sobre o gel;
- 4) Migração eletroforética da amostra sobre o gel. O programa tem voltagem, tempo e temperatura definidas;
- 5) Pipetar anti-soros específicos para os poços;
- 6) Aplicar os Ac sobre o gel, fazendo-os rolar sobre toda a zona de migração;
- 7) Incubar para que ocorra a ligação;
- 8) Utilizar o papel de filtro para remover excessos;
- 9) Secar e lavar;
- 10) Retirar a película e colocar no suporte para corar/descorar.

#### iv. COBAS® E411 ROCHE

Analizador de imunologia baseado na tecnologia de eletroquimioluminescência (ECLIA). Este equipamento utiliza micropartículas revestidas com estreptavidina, anticorpos monoclonais específicos biotinilados e anticorpos monoclonais específicos para cada analito, marcados com um quelato de ruténio.



Figura 61 - Cobas® e411 Roche

<https://usdiagnostics.roche.com/forher/cobase411.html>

A tecnologia de ECLIA representa um sistema de detecção de luminescência de alta sensibilidade que amplifica qualquer sinal desejado e reduz possíveis interferências mesmo em concentrações bastantes reduzidas do analito que se pretende estudar.

A electroquimioluminescencia segue o princípio básico do ensaio competitivo ou não competitivo, mas a reação de quimioluminescência é eletricamente estimulada a produzir luz, pela aplicação de uma corrente elétrica. Ocorrem reações de oxidação e de redução, levando à emissão de fótons, que provocam uma emissão quimioluminescente e que é medida por um fotomultiplicador.

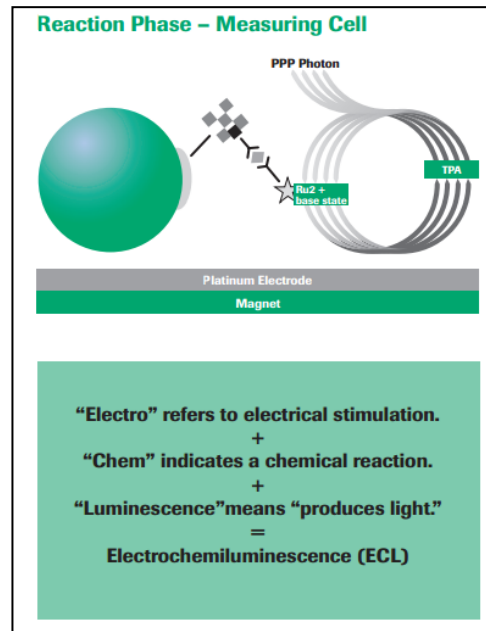


Figura 62 - Tecnologia ECLIA

#### PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS NO EQUIPAMENTO:

- Troponinas
- Toxo IgG
- ACTH
- Cortisol

## C. QUÍMICA ANALÍTICA

No laboratório de Química Analítica são efetuados doseamentos de vários parâmetros químicos e bioquímicos, como sejam, Vitaminas B1, B2, B6, A, E e D; aminoácidos; triptofano; amiodarona; antidepressivos; antiepiléticos; carotenos; metais (alumínio; cobalto; ferro; crómio; iodo; etc.); catecolaminas; metanefrinas; ácido vanilmandélico; ácido homovanílico; ácido 5-hidroxiindolacético; serotonina; entre outros que serão referenciados ao longo deste capítulo. Importa ainda referir que, a maioria das amostras processadas são alvo de preparação prévia, de acordo com o manual de procedimentos definido.

De forma a resumir, de forma sumária, a diversidade dos métodos químico-analíticos disponíveis apresenta-se de seguida um quadro esquemático das técnicas utilizadas de acordo com as propriedades do composto em estudo e a sua consequente finalidade em termos laboratoriais:

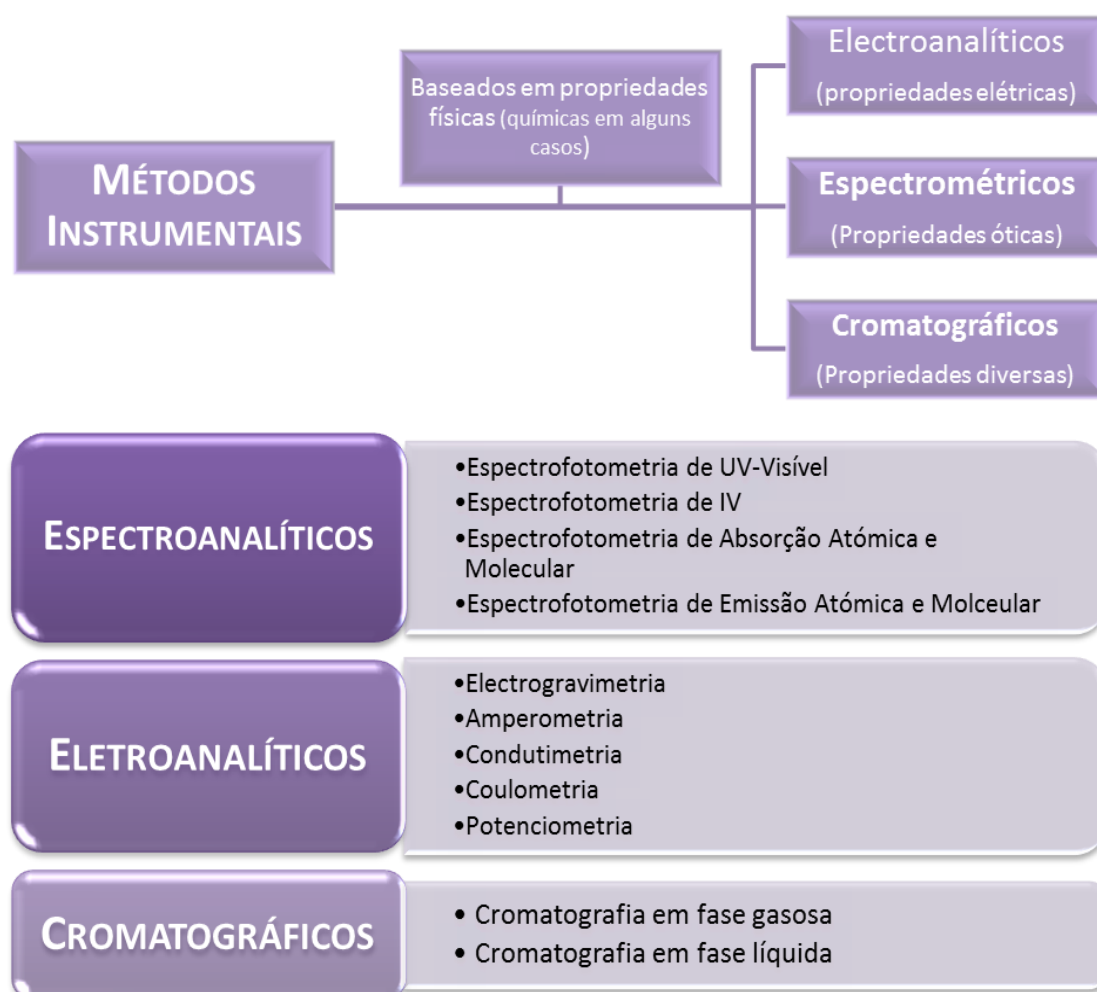


Figura 63 - Principais Métodos Instrumentais em Química Analítica

### **a) Absorção Atômica**

Corresponde à absorção específica e quantitativa por parte de um elemento mantido no estado de vapor atômico por meio de energia calorífica (geralmente da chama), de uma radiação proveniente de uma lâmpada cujo centro emissor (cátodo) contém o mesmo elemento. Como espécies absorventes só interessam os elementos no estado fundamental que vão absorver a radiação.

Tal como na fotometria de chama o elemento sofre a dessolvatação, vaporização e atomização, que ocorre no forno de grafite ou na chama. O elemento é dissociado termicamente em átomos livres, no estado basal (átomo neutro). O átomo neutro é capaz de absorver radiação proveniente de uma fonte externa numa faixa estreita de comprimento de onda, correspondente à sua linha do espectro. Quando a luz proveniente da lâmpada penetra na chama, ocorre uma diminuição da intensidade do feixe de luz, porque os átomos que se encontram no estado basal absorvem a energia. Para cada parâmetro é necessário uma lâmpada de cátodo oco específica, sendo efetuadas leituras em duplicado ou triplicado em cada, o valor final obtido é o resultado da média dos dois valores que apresentem menor variação entre resultados. A absorção de radiações provenientes da fonte luminosa depende da população de átomos no estado fundamental, a qual é proporcional à concentração da solução distribuída na câmara.

Este método apresenta maior sensibilidade comparativamente à fotometria de chama, precisão na gama dos ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) e necessita de volumes de amostra pequenos.

Para a concretização desta técnica laboratorial utiliza-se o equipamento GFA – 7000A Shimadzu® (Graphite Furnace Atomizer), no qual é possível determinar a presença de alumínio no soro, cádmio no sangue total, chumbo na urina e no sangue total, cobre na urina crómio no soro e na urina, mercúrio no sangue total e na urina, níquel no soro e na urina, selénio no soro, etc.



Figura 64 - GFA – 7000A Shimadzu®

<https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/AAS/C122-E058G.pdf>

### **b) Fotometria de Emissão com Plasma de Árgon - ICP (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer)**

A técnica de Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma de Árgon ICP-OES é uma técnica de análise de multi-elementos (medidos simultaneamente) para a análise elementar de cátions (por exemplo, Na, K, Ca, Mg, Fe, Al, Mn, etc.), enxofre, fósforo e silício.

Neste contexto o plasma é entendido como uma mistura gasosa condutora de eletricidade com uma significativa concentração de cátions e elétrons (as concentrações são tais que a carga total se aproxima de zero). A atomização faz-se num dispositivo onde se produz o plasma, designado por TOCHA (“torch” em inglês), e não numa chama. A fonte é constituída por 3 tubos de quartzo, concêntricos, através dos quais flui uma forte corrente de árgon (entre 11 a 17 L/min). Rodeando o topo dos tubos encontra-se uma bobine de indução, arrefecida por água e alimentada por um gerador de rádio frequência de ~2kW de potência, que produz um campo magnético. A ionização inicial do árgon fluente é iniciada por uma faísca (ignitor). Estes íões e seus elétrons interagem com o campo magnético efetuando movimentos em círculos, e como consequência do grande atrito gerado por este movimento dá-se uma grande elevação de temperatura.

Para esta técnica é utilizado o equipamento *Varian Vista MPX – ICP/OES*®, baseando-se no princípio de que o biogénico é introduzido como um aerossol para o plasma indutivamente acoplado, sendo que a temperatura no seu núcleo é de 10,000 Kelvin. A elevada temperatura do plasma vaporiza o aerossol e excita os átomos aos níveis elevados de energia.

Ao retornar ao seu estado fundamental, o espectro de comprimentos de onda emitidos pode ser usado para identificar o elemento de onde se originou.



Figura 65 - *Varian Vista MPX – ICP/OES*

[http://www.colloidalsciencelab.com/fact\\_pages/Varian-MPX.pdf](http://www.colloidalsciencelab.com/fact_pages/Varian-MPX.pdf)

O método constitui uma opção para a deteção de elementos para os quais não se possui cátodo oco, ou para determinação de vários parâmetros de uma só amostra. Permite avaliar a existência de metais na urina, soro, cabelo e unhas.

### c) Espectrofotometria de Absorção Molecular (zona do Infravermelho)

A absorção de radiação eletromagnética da região do ultravioleta (UV) (100-400 nm) e visível (Vis) (400-800 nm) por parte de moléculas, átomos ou iões está normalmente associada a transições eletrónicas. Estas ocorrem quando, por interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um eletrão é promovido dum estado eletrónico de baixa energia para outro de energia mais elevada. A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração, do coeficiente de absorção molar da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação. Deste modo, cada frequência da vibração pode ser associada a um tipo específico de ligação química. A radiação eletromagnética é constituída por um campo elétrico oscilante e um campo magnético oscilante, perpendiculares um ao outro. O campo elétrico oscilante interfere com o momento dipolar da molécula e esta interferência é detetada.

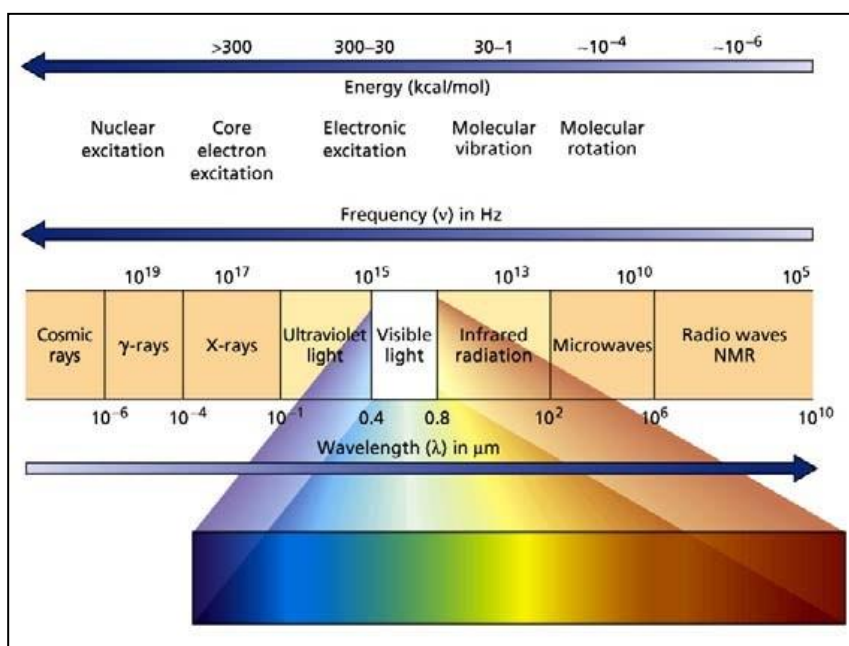


Figura 66 - Espectro de Infravermelhos

Para obter o espectro de infravermelhos (IV) de uma amostra, faz-se passar através da amostra um feixe de luz infravermelha, e mede-se a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda. A partir desta informação obtém-se o espectro de transmissão ou de absorção, que mostra os comprimentos de onda do IV a que a amostra absorve radiação. Pode-se então interpretar que tipos de ligações químicas estão presentes.

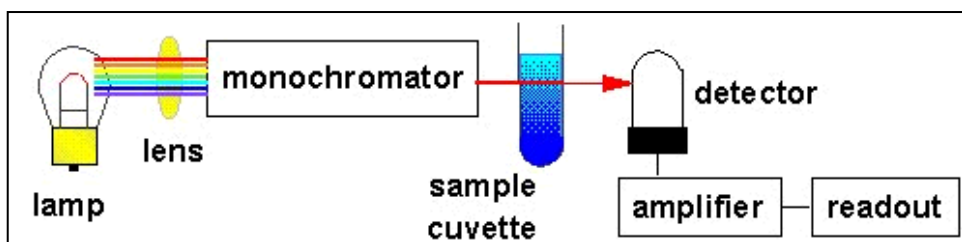


Figura 67 - Esquema simplificado de um equipamento de feixe

Existem três modos para conduzi um doseamento por absorção molecular, aplicando a expressão da lei de Beer (conhecendo a constante de absorção); a partir de curva de calibração (conseguida com amostras de padrões) e ainda por comparação das absorvâncias de amostras padrão e problema.

Esta técnica apenas funciona para ligações covalentes. Os espectros são mais difíceis de interpretar quanto maior o número de ligações ativas no IV existirem na molécula, e exigem que a amostra se encontre livre de contaminações. Quanto mais complexa a estrutura molecular, maior o número de bandas de absorção e mais complexo é o espectro de IV.

Este método pode ser utilizado para determinar os cálculos urinários. Para esta avaliação, analisa-se o seu peso, dimensões, forma, cor e uniformidade de superfície. Depois da avaliação macroscópica, prepara-se a pastilha com brometo de potássio (300mg BrK + 1mg Cálculo), em almofariz. A mistura é prensada, até obtenção de uma pastilha homogénea que é colocada no suporte para leitura no espectrofotómetro de IV.

#### **d) Espectrofotometria de Massa**

A espectrofotometria consiste na medição da intensidade da luz em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) previamente determinados. Quando um feixe de luz incidente de determinada intensidade atravessa uma célula quadrangular que contém uma solução de um composto que absorve luz de um determinado  $\lambda$ , a intensidade do feixe de luz transmitido é inferior à intensidade da luz incidente, sendo esta capacidade da substância de absorver a radiação definida como absorvância. A lei de Beer estabelece que a concentração de uma substância é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida.

O equipamento de espectrofotometria de massa possibilita a determinação da atividade ureásica indicativa da presença de *Helicobacter pylori* (teste de sopro com ureia marcada com carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ )) – isótopo estável não radioativo.

A bactéria *Helicobacter pylori* é considerada atualmente como o principal agente etiológico das doenças gastroduodenais. É um bacilo gram-negativo, de forma espiralada, responsável pelas gastrites e implicado na úlcera gastroduodenal e no cancro gástrico. A sua prevalência a nível da população portuguesa é bastante elevada, atingindo cerca de 80% de indivíduos em idade adulta. A  $^{13}\text{C}$ -ureia, na presença da enzima urease hidrolisa-se e o  $\text{CO}_2$  libertado, marcado isotopicamente, é detetado na amostra de ar expirado. O teste consiste em duas colheitas, uma no tempo zero (basal) e outra 30 minutos após ter ingerido uma solução com  $^{13}\text{C}$ -ureia (positivo). As amostras são doseadas para determinar a quantidade normal de  $^{13}\text{C}$  que existe no  $\text{CO}_2$  da respiração.

Caso a *Helicobacter pylori* esteja presente e ativa no estômago, procede à decomposição da  $^{13}\text{C}$ -ureia *in vitro*, sendo assim detetada no  $\text{CO}_2$  expirado. O equipamento lê as duas amostras e determina a diferença de forma automática. Se a diferença dos valores obtidos for superior a 4,5 o resultado é positivo, caso o valor se situe entre os 3,50 e os 4,50 é repetida a análise com o segundo tubo de colheita do ar e se se mantiver nesta gama de valores o resultado reportado é de franco positivo, considerando-se ainda assim como positivo.

### **e) Cromatografia em Fase Gasosa**

Na cromatografia de fase gasosa (GC) a amostra é volatizada e injetada numa coluna cromatográfica. A eluição é levada a cabo por um gás inerte (fase móvel). A fase móvel não interatua com a espécie que está a ser analisada, a sua função é única e exclusivamente de transporte.

Existem dois tipos de cromatografia gasosa:

- Cromatografia gás-sólido, GSC
- Cromatografia gás-líquido, GLC

Na cromatografia gás-sólido a fase estacionária é sólida e a espécie a analisar é adsorvida na fase estacionária. É uma cromatografia pouco utilizada. A cromatografia gás-líquido é baseada na partição da espécie a analisar entre a fase móvel gasosa e a fase líquida imobilizada na superfície de um sólido inerte. Muitas vezes esta cromatografia é designada incorretamente por GC e tem um grande campo de aplicação.

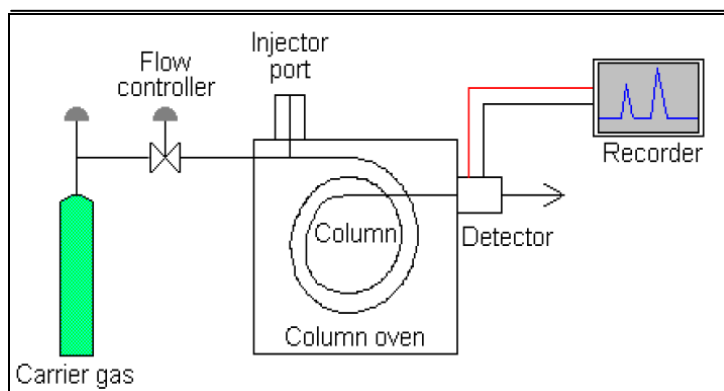


Figura 68- Componentes básicos de um instrumento para cromatografia em fase gasosa

A cromatografia gasosa é muitas vezes acoplada a técnicas seletivas espectroscópicas e eletroquímicas, originando métodos extremamente úteis na identificação de componentes de misturas complexas. A técnica de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) é o método utilizado para identificar compostos com base nas massas dos átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas, após a formação de iões na fase gasosa e posterior separação de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), seguidas de deteção.

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

#### **f) Cromatografia em Fase Líquida - HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

A técnica de HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - tem como principal objetivo a separação das diferentes componentes químicas de determinada amostra, consoante as suas funções moleculares, por meio de uma interação seletiva entre as moléculas do soluto e duas fases (uma móvel e uma estacionária).

Esta técnica é considerada mais vantajosa em relação à cromatografia líquida clássica ou convencional uma vez que apresenta a possibilidade de separações com elevada resolução e em tempos relativamente curtos (cerca de minutos até uma hora).

Um sistema automatizado HPLC é constituído por um reservatório de solvente, bomba, injetor, pré-coluna, uma coluna de alta eficiência, detetor e computador. As condições ótimas de separação requerem o conhecimento das propriedades físicas dos componentes em questão (ex. volatilidade, solubilidade, etc.) assim como o das propriedades químicas que tornam possível a sua deteção (ex. fluorescência, absorção no UV, atividade eletroquímica). A existência de uma pré-coluna previne a entrada de partículas estranhas provenientes do eluente ou da amostra, sendo que aumenta a duração da coluna. Em relação à cromatografia gasosa, apresentam a vantagem de proporcionar uma maior eficiência de separação, de operar a temperaturas inferiores, sendo de grande aplicação em separações de espécies macromoleculares e biológicas de reduzida estabilidade e a recuperação dos componentes separados também é mais fácil. Tem reduzida aplicação com compostos voláteis.

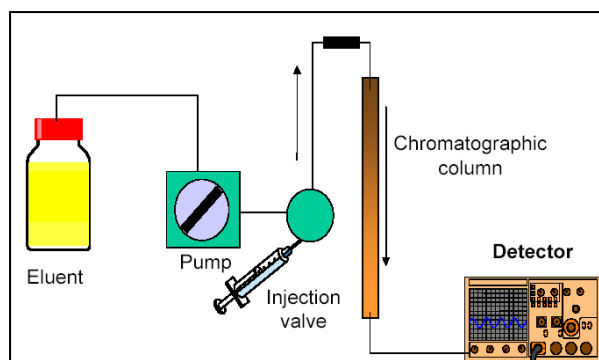


Figura 69 - Componentes básicos de um sistema de HPPLC

Em termos laboratoriais e de uma forma genérica, a fase inicial da técnica de HPLC (Shimadzu®) pressupõe a tratamento/purificação da amostra em estudo através da sua extração em coluna de cromatografia preparativa por SPE (Solid Phase Extration) pelo uso de kit's comerciais disponíveis. Seguidamente a amostras tratadas são então injetadas no próprio equipamento de HPLC para análise



Figura 70 - HPLC Shimadzu®

<https://www.shimadzu.com/an/hplc/>

## **D. IMUNOLOGIA**

No departamento de Imunologia (IMN) é realizado diversas técnicas quer manuais, quer com recurso a equipamentos automáticos, para aferição de parâmetros imunológicos, utilizando para tal amostras de soro, urinas e fezes. O departamento encontra-se dividido nas seguintes áreas funcionais principais:

- Serologia
- Autoimunidade
- Imunofluorescência
- Citometria de Fluxo
- Macroscopia
- Métodos qualitativos e quantitativos de reações antigénio-anticorpo

Neste departamento mantêm-se ainda algumas técnicas e métodos manuais, devido não só ao baixo número de solicitações de certos parâmetros, como por questões operacionais/logísticas (condicionantes práticas, custos, etc.), recorrendo ainda assim ao apoio de alguns equipamentos químicos como o Espectrofotómetro e outros. De seguida serão apresentadas algumas técnicas e procedimentos que tive a oportunidade, não só de observar como de efetuar, durante o período de estágio naquela valência.

### **a) Serologia**

Neste sector são realizadas, maioritariamente, técnicas de precipitação e aglutinação. Os princípios de precipitação e da aglutinação, através da formação de complexos Ag-Ac, estão na base de vários métodos para detetar e quantificar antigénio solúveis (citocinas, imunoglobulinas) e membranares (presentes em células).

- **Mononucleose Infeciosa**

A mononucleose infecciosa (MI) é causada pelo agente viral Epstein-Barr, o qual pertence à família de vírus de herpes. Os sintomas de MI são febre, dores de garganta e inflamação das glândulas linfáticas. Em casos muito raros podem ocorrer problemas cardíacos ou no sistema nervoso central.

A infeção com o vírus Epstein-Barr durante a adolescência ou em jovens adultos causa mononucleose infecciosa em 35% a 50% dos casos reportados ao Centers of Disease Control (CDC). O período de incubação da doença é de 10 a 60 dias, embora um período de 7 a 14 dias seja normal para crianças e adolescentes.

Para detetar a presença de anticorpos heterófilos de mononucleose infecciosa (pertencentes à classe de IgM) em sangue total, soro ou plasma é utilizado o teste rápido Clearview® IM II, um imunoensaio cromatográfico qualitativo utilizando a reação de **Paul-Bunnet**.

#### Princípio do método Paul-Bunnet:

No teste Clearview® IM II o antigénio extraído de eritrócitos de bovinos é imobilizado na região da linha de teste. Durante os testes, a amostra reage com as partículas revestidas de antigénio extraído de eritrócitos bovinos que foram aplicadas à compressa da etiqueta. Esta mistura migra cromatograficamente pelo teste e interage com o antigénio extraído de eritrócitos bovinos imobilizados.

I. Caso a amostra contenha anticorpos heterófilos de MI aparece uma linha colorida na região da linha de teste, o que indica uma aglutinação visível, sendo um resultado positivo.

II. No caso de a amostra não conter anticorpos heterófilos, não aparece qualquer linha colorida na região anteriormente referida indicando um resultado negativo.

O controlo do procedimento é identificado pela presença de uma linha colorida na região da linha de controlo que indica que foi adicionado o volume correto da amostra e que ocorreu um escorrimento da membrana.

- **Antigénios Febris**

Os antigénios febris são suspensões normalizadas de bactérias tingidas que são usadas para identificar e quantificar anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infeções febris, tais como:

- Brucelose
  - ✓ Reação de Hudlesson - *Brucella mellitensis*
  - ✓ Reação Rosa Bengala - *Brucella abortus*
- Salmonelose
  - ✓ Reação de Widal - *Salmonella typhi* A e H e *Salmonella paratyphi* AH e BH
- Rickettsioses
  - ✓ Reação de Weill-Félix

O antígeno da suspensão é colocado em contacto com o soro do doente e aglutina na presença do correspondente anticorpo homólogo dando assim indicação da presença de infeção por um destes agentes infecciosos.

Procedimento:

1. Colocar 12,5 ul de amostra e 1 gota de cada controlo nos círculos do cartão
2. Homogeneizar o Ag com suavidade antes de utilizá-lo. Acrescentar 1 gota a cada círculo próxima à gota da amostra.
3. Misturar devidamente
4. Colocar no agitador a 100 rpm durante 2 min. No caso do Rosa Bengala colocar durante 4 min.
5. Efetuar a observação macroscópica - evidenciar a presença ou não de aglutinação no tempo máximo de 1 minuto após paragem do agitar. É importante mencionar que a leitura tardia pode originar falsos positivos.

Caso seja visível a presença de aglutinação e portanto, um resultado positivo, deve-se efetuar o teste prova em tubo para confirmar resultado. Títulos superiores a 1/80 para os antígenos de *Salmonella* ou *Brucella* são geralmente indicativos de infecção recente. Um título inferior a 1/160 não deve ser considerado significativo.

#### Princípio da Reação de Rosa Bengala

A Reação de Rosa de Bengala é um procedimento de rastreio, para a pesquisa da presença de anticorpos anti-*Brucella* no soro dos doentes com suspeita de Brucelose (*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. bovis* e *B. suis*). O serodiagnóstico clássico das infecções agudas por *Brucella* baseia-se na pesquisa rápida e titulação dos anticorpos da classe M (aglutininas) e IgG anti-antígenos polissacarídeos A e M da parede celular, através da utilização de antígeno ácido tamponado, corado com Rosa de Bengala, executada em lâmina.

#### Princípio da Reação de Widal

Este teste laboratorial é utilizado para o diagnóstico da febre tifoide (*Salmonella typhi*) e paratifoide (*Salmonella paratyphi* A, B ou C). Baseia-se na pesquisa dos anticorpos anti-O e anti-H séricos pela utilização das suspensões de antígenos O-somático e H-flagelar da *Salmonella typhi* e *paratyphi* A, B. O uso conjunto de antígeno O somático e antígeno H flagelar aumenta o valor diagnóstico, sendo certo que, o antígeno O confirma a presença de infecção ativa (8º dia após contaminação) ao passo que o antígeno H aparece mais tarde (10-12 dias) e persiste durante muito mais tempo, sugerindo infecção passada

Ambas aglutininas (O e H) podem estar elevadas em indivíduos oriundos de áreas endêmicas. No caso da infecção por *Salmonella* a aglutinação ocorre na presença dos antígenos O-somático e H-flagelar. Na infecção por *Brucella* a aglutinação apenas ocorre com o antígeno O-somático. As reações com o antígeno O-somático ocorrem mais precocemente, em geral, após a primeira semana de infecção. No que diz respeito às reações com antígeno H-flagelares, estas reações são mais tardias e persistem durante algum tempo.

### Princípio da Reação de Weill-Félix

Esta prova é utilizada para o diagnóstico da febre da carraça (*Rickettsia conorii*). A similaridade entre os antígenos O existentes nas paredes celulares das riquetsias e em certas estirpes de *Proteus* permitiu o uso de antígenos febris, baseando-se em três estirpes de *Proteus*. Assim sendo, em todos os resultados considerados positivos, deve-se despirar uma eventual infecção urinária por *Proteus*. A positividade do título encontra-se então mais elevada, ou seja, superior ou igual a 1/160

- **Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* – Teste VDRL e RPR**

A sífilis é uma doença infecciosa humana produzida por uma espiroqueta, sendo uma doença transmitida sexualmente. Outras possíveis vias de transmissão são a transfusão de sangue infetado, hoje praticamente eliminada através de triagem sorológica de rotina, e a perinatal (sífilis congênita) transmitida, pelo agente *Treponema pallidum* procedentes da mãe infetada para o feto em desenvolvimento.

Clinicamente, após um período de incubação que varia de 10 a 90 dias, pois é inversamente relacionado com a quantidade do inoculado, ocorre, em 85% dos pacientes, o surgimento de um cancro, que é uma lesão solitária e indolor, caracterizando a sífilis primária.

Os testes sorológicos para sífilis são classificados como não treponémicos, usados mais comumente para a triagem, como o VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e o RPR (Rapid Plasma Reagin), e treponémicos, usados como testes confirmatórios para os soros reativos nos testes de triagem, como o FTA-ABS (fluorescent treponemal antibody absorption) e o TPHA (treponema pallidum hemagglutination) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Os anticorpos tornam-se detetáveis cerca de 3-4 semanas após a exposição e podem permanecer em níveis detetáveis durante longos períodos após o tratamento. São formados dois grupos de anticorpos: anticorpos não treponémicos que reagem com antígenos não específicos (teste VDRL ou RPR); Treponémicos que reagem com os antígenos específicos de *T. pallidum* (teste TPHA). Os anticorpos específicos para os antígenos não treponémicos são encontrados na doença ativa e os níveis diminuem após um tratamento bem-sucedido. Os anticorpos específicos persistem muito tempo após a infecção ter sido tratada, sendo necessário testar ambos os grupos de anticorpos, uma vez que os anticorpos não treponémicos podem surgir por razões diferentes da infecção sífilítica.

O título dos anticorpos detetados pelo teste RPR é um reflexo bastante exato da duração/evolução da doença e da sua resposta ao tratamento. O teste VDRL é um teste de floculação, não-treponêmico, para diagnóstico da sífilis, através da pesquisa de anticorpos (reaginas) no soro, plasma ou líquido céfalo-raquidiano (LCR), com a grande vantagem sobre o VDRL clássico por consistir em uma suspensão estabilizada e pronta para uso. Quando a suspensão antigênica do VDRL é misturada com o soro, plasma ou líquido céfalo-raquidiano (LCR) que contenham anticorpos (reaginas), as partículas de antígeno floculam e o resultado da reação é observado ao microscópio. A ausência de floculação indica resultado negativo.

O RPR representa um teste rápido de aglutinação para o serodiagnóstico da Sífilis. Apresenta-se como uma forma modificada do VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) clássico, que contém uma suspensão de cardioplipina / lecitina / colesterol e partículas de carvão para melhorar a leitura visual, evitando assim a necessidade de utilização do microscópio, já que a reação é visível macroscopicamente sob uma boa fonte de luz. Os antígenos cardioplipídicos reagem assim com os anticorpos (reagina) presentes na amostra e formam depósitos pretos macroscopicamente visíveis.

É um método semi-quantitativo, recorrendo-se a diluições sucessivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) das amostras positivas para se determinar o título, através da última diluição a apresentar positividade. Tem como limitação a ocorrência de falsos positivos, quando as amostras são de indivíduos portadores de outras infecções diferentes de Sífilis.

## **b) Nefelometria**

O princípio deste método baseia-se na formação de complexos Ag-Ac que, quando precipitam, têm a capacidade de dispersar a luz que passe na amostra onde eles se encontram. Deste modo, a concentração destes complexos em solução (meio líquido e não gel) pode ser determinada medindo a dispersão de luz num ângulo de 90°C (dispersão lateral).

Para esta técnica é utilizado o equipamento BN ProSpec® da Siemens e são determinados diversos parâmetros relacionados com a quantificação de proteínas, como sejam, glicoproteína, macroglobulina, apolipoproteína, ceruplasmina; fatores de coagulação (fibrinogénio, antitrombina, plasminogénio C1 inibidor). As proteínas contidas nos fluidos corporais humanos formam complexos imunitários numa reação imunoquímica com anticorpos específicos. Estes complexos difratam um feixe de luz que atravessa a amostra. A intensidade da luz difratada é proporcional à concentração da proteína relevante na amostra. O resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida.



Figura 71 - BN ProSpec® Siemens

<https://www.healthcare.siemens.pt/plasma-protein/systems/bn-prospec-system>

### **c) Testes de Imunofluorescência Indireta**

- Anti- *Campylobacter jejuni* IIFT (IgA, IgG)

A bactéria *Campylobacter jejuni* é considerada, hoje em dia, como o principal e mais frequente agente de enterocolite bacteriana do mundo. Na Europa o pico de incidência da infecção por *Campylobacter jejuni* ocorre durante o período de Verão.

O género *Campylobacter* é caracterizado como gram-negativo, esporulado, espiral flagelado. Foram até então identificadas mais de 20 espécies. No que diz respeito ao mecanismo patogénico deste microrganismo sabe-se que produzem uma enterotoxina termoestável. O antígeno de superfície PEB1 (tem como função a adesão), bem como as citocinas e os lipopolissacaridos (LPS) são considerados fatores de virulência adicionais.

Os pássaros e o gado em geral são os principais reservatórios de *C. jejuni*. A doença é transmitida a partir destes animais para os humanos através dos alimentos e da água de consumo. Aproximadamente 10.000 germes são suficientes para causar infecção. O consumo de carne de aves mal cozinhadas ou os seus produtos é a causa principal de infecção de acordo com estudos de casos realizados em Inglaterra e no País de Gales.

O teste de imunofluorescência indireta tem como principal objetivo a determinação qualitativa e quantitativa *in vitro* de anticorpos contra *Campylobacter jejuni* em amostras de pacientes.

#### Avaliação dos Resultados:

Se os anticorpos contra *Campylobacter jejuni* estiverem presentes na amostra, uma fluorescência distinta da bactéria que cobre a reação torna-se visível.

### Avaliação Qualitativa

Reatividade IgA	Avaliação
Sem reação a 1:320	Negativo. Não foram detetados anticorpos contra <i>Campylobacter jejuni</i> na amostra do paciente. A infecção não pode ser excluída
Reação Positiva a 1:320	Positivo. Indicação de infecção

Reatividade IgG	Avaliação
Sem reação a 1:1000	Negativo. Não foram detetados anticorpos contra <i>Campylobacter jejuni</i> na amostra do paciente. A infecção não pode ser excluída
Reação Positiva a 1:1000	Positivo. Anticorpos contra <i>Campylobacter jejuni</i> foram detetados na amostra do paciente. Indicação de infecção

### Avaliação Quantitativa

O título é definido como o fator de diluição da amostra para o qual apenas uma específica fluorescência é identificável. Deverá ser comparado com a reação obtida com uma diluição de controlo negativo equivalente. Os títulos de anticorpos podem ser estimados com base na seguinte tabela a partir da fluorescência de diferentes diluições da amostra.

Tabela 12 – Avaliação Quantitativa do Teste Anti- *Campylobacter jejuni* IIFT

Fluorescência em				Título de Anticorpos
1:10	1:100	1:1000	1:10000	
Fraco	Negativo	Negativo	Negativo	1:10
Moderado	Negativo	Negativo	Negativo	1:32
Forte	Fraco	Negativo	Negativo	1:100
Forte	Moderado	Negativo	Negativo	1:320
Forte	Forte	Fraco	Negativo	1:1000
Forte	Forte	Moderado	Negativo	1:3200
Forte	Forte	Forte	Fraco	1:10000
...	...	...	...	...

#### **d) ImunoEnsaio Enzimático (EIA)**

O avanço mais importante nos imunoensaios foi o desenvolvimento dos imunoensaios enzimáticos. As primeiras técnicas EIA foram descritas independentemente em 1971. A partir daí, foram usadas para detetar uma enorme variedade de diferentes antigénios e anticorpos. Os princípios e procedimentos da técnica EIA são basicamente semelhantes aos das técnicas RIA excetuando que utilizam enzimas em vez de isótopos radioativos. Os imunoensaios não isotópicos apresentam várias vantagens em relação ao radioimunológicos como sejam:

- Maior estabilidade dos reagentes;
- Maior especificidade, devido ao uso de antigénios marcados com enzima;
- Produzirem, de modo geral, ensaios homogéneos;
- Ausência do perigo de radiações.

Podem considerar-se duas etapas nas técnicas EIA: a reacção primária entre os imunoreagentes (anticorpos e antigénio correspondente) e a deteção usando enzimas como indicadores, previamente ligadas aos reagentes. As técnicas EIA dividem-se em dois grandes grupos: "*enzyme-multiplied immunoassay techniques*" (EMIT) e "*enzyme-linked immunosorbent assays*" (ELISA). Nas técnicas EMIT a reacção ocorre num meio líquido homogéneo e a separação entre reagentes ligados e não ligados não é satisfeita. Nas técnicas ELISA, parte das reacções ocorrem em meio sólido que também serve para separar os imunocomplexos dos reagentes não ligados.

##### ▪ INNOTEST® hTAU Ag

O INNOTEST® hTAU é um imunoensaio enzimático em fase sólida para a determinação quantitativa de proteína Tau no líquido cefalorraquidiano humano (CSF). Este ensaio mede o marcador biológico Tau total, incluindo os seis isoformas (352 a 441 aminoácidos) do cérebro. A utilização combinada de concentrações de marcadores de beta amiloide e Tau no líquido cefalorraquidiano humano permite fazer a diferenciação entre a doença de Alzheimer (AD) e o envelhecimento normal ou outras doenças neurológicas, como a depressão. Como marcador de diagnóstico AD, os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados juntamente com outras informações de diagnóstico e clínicas.

A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, é uma desordem neurodegenerativa caracterizada histologicamente pelo acúmulo de feixes neurofibrilares intracelulares e placas de amiloides extracelulares nas regiões corticais e límbicas do cérebro. A ultraestrutura dos feixes neurofibrilares é composta por filamentos helicoidais emparelhados compostos principalmente por proteína Tau anormalmente hiperfosforilada (Phospho-Tau). Os principais componentes dos depósitos de amilóides são os peptídeos amilóides  $\beta$  de 40 e 42 aminoácidos, que são derivados da proteína do precursor do amilóide ligado à membrana integral.

## PRINCÍPIO DO TESTE

O INNOTEST® hTAU Ag é um imunoensaio enzimático em fase sólida, no qual a proteína Tau humana ou fragmentos são capturados pelo primeiro anticorpo monoclonal, AT120. As amostras de CSF humano são adicionadas e incubadas com dois anticorpos marcados com biotina, HT7bio e BT2bio. Este complexo antígeno- anticorpo é detetado por uma peroxidase marcada com estreptavidina. Após a adição do substrato, as amostras vão desenvolver uma cor. A intensidade da cor é uma medida para a quantidade de proteína Tau total humana na amostra.

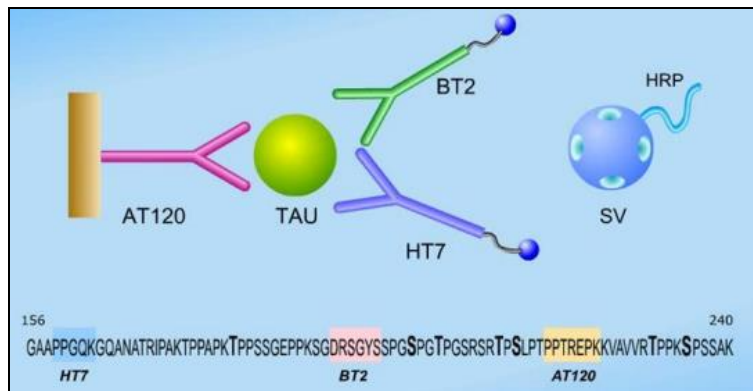


Figura 72 - Princípio do teste INNOTEST hTau Ag

## RESULTADOS

### Validação:

- A absorbância de 450 nm dos brancos individuais não deve ser inferior a 0,200 OD (*outside diamentar*).
- A absorbância de 450 nm do padrão mais elevado deve ser superior a 1,600 OD.

Os valores da absorvância da análise do comprimento de onda duplo (450 nm e 620 nm) diferem cerca de 50 mOD dos valores comprimentos de onda individuais. Estes valores não afetam o resultado final do teste.

Cálculo de resultados:

- Calcular a absorvância média para as soluções padrão e as amostras desconhecidas. Repetir o teste se % CV entre os valores individuais de OD for superior a 20%.
- Construir a curva padrão, colocando os valores médios de absorvância obtidos para cada solução padrão no eixo vertical (Y) e as correspondentes concentrações no eixo horizontal (X). Desenhar a curva mais ajustável a estes pontos.
- Utilizar o valor da absorvância média de cada amostra de CSF (*Cerebrospinal fluid*) desconhecida para determinar concentração correspondente de Tau em pg/mL a partir da curva padrão. Só é possível determinar as concentrações das amostras, se a absorvância estiver dentro dos limites da curva padrão. A extrapolação de resultados dos valores OD que se situem acima do ponto padrão mais elevado e abaixo do ponto mais baixo da curva padrão podem conduzir a resultados incorretos.

- 1,25-Dihydroxy Vitamin D IDS®

O kit IDS 1,25-Dihidroxy Vitamina D EIA é um sistema de ensaio completo destinado à purificação de 1,25-dihidroxivitamina D (1,25D) em soro ou plasma humano por imunoextração seguido por quantificação por imunoensaio enzimático. Os resultados devem ser usados em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais para auxiliar o clínico na avaliação da deficiência de 1,25D associada à doença renal na população adulta.

A vitamina D é um termo coletivo comumente usado para uma família de moléculas intimamente relacionadas derivadas de 7-desidrocolesterol (pro-vitamina D3) que ocorre naturalmente. A pro-vitamina D3 sofre uma conversão fotolítica na pele dando origem à vitamina D3 (colecalfiferol) "parental" após a exposição à luz solar. Este composto é biologicamente inativo, mas entra na circulação e é hidroxilado no fígado para a 25-hidroxivitamina D activa (25D).

Uma pequena proporção desta torna-se posteriormente hidroxilada no rim originando a hormona calcitropicamente altamente potente 1,25D. Este composto é largamente ligado à proteína de ligação à vitamina D e à albumina na circulação, sendo um dos principais reguladores do metabolismo do cálcio (e fosfato), estimulando a absorção intestinal de cálcio e aumentando a reabsorção óssea. Também inibe a produção de hormona paratiroideia (PTH) tanto pela ação direta sobre as glândulas paratireoides quanto indiretamente pelo aumento dos níveis séricos de cálcio. A produção de 1,25D é estimulada pela hormona paratireoide (PTH), proporcionando assim um circuito de controlo eficaz.

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

As amostras de pacientes são delipidadas e extraídas a partir de potenciais reações cruzadas por incubação durante 90 minutos com um anticorpo monoclonal anti-1,25D de fase sólida altamente específico. O gel de imunoextração é então lavado e purificado 1,25D eluído diretamente em tubos de ensaio de vidro. Em seguida, uma porção desta é incubada durante 90 minutos com agitação em poços de microplacas que são revestidas com um anticorpo anti-ovelha específico. 1,25D ligado à biotina é adicionado e a placa é agitada durante mais 60 minutos antes da aspiração e da lavagem. A enzima avidina marcada com enzima (peroxidase de rábano) é adicionada e liga-se seletivamente a biotina complexada e, a seguir a uma lavagem adicional, a cor é desenvolvida utilizando um substrato cromogénico (TMB).

A absorvância das misturas de reação é lida num leitor de placas de microtitulação, a intensidade de cor desenvolvida é inversamente proporcional à concentração de 1,25D.

- VaccZyme™ Anti-Tetanus Toxoid IgG Enzyme Immunoassay Kit

Este ensaio destina-se à medição *in vitro* de anticorpos IgG específicos contra o toxóide tetânico (T.Tox.) presentes no soro, a fim de determinar o estado protetor.

Os anticorpos antitetânicos são criados em resposta à vacinação com tétano Toxóide. A resposta de um doente à imunização pode ser avaliada, subsequentemente, pela determinação serológica do seu anticorpo anti-tétano-toxóide utilizando esta técnica de imunoensaio enzimático quantitativo. Os doentes com infeções recorrentes devem ser investigados quanto à imunodeficiência, anomalias tímicas e a consequente incapacidade de responder a antígenos bacterianos.

Os micropoços são pré-revestidos com antígeno toxoide tetânico. Os calibradores, controlos e amostras de doentes são adicionadas aos poços e os anticorpos reconhecem a ligação ao antígeno toxoide tetânico durante a primeira incubação. Depois de lavar os poços, para remover todas as proteínas não ligadas, é adicionada a IgG anti-humana de coelho marcada com peroxidase purificada (cadeia específica  $\gamma$ ). O conjugado liga-se ao anticorpo do doente e o excesso de conjugado não ligado é removido por uma lavagem adicional. O substrato é visualizado com o 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), que dá um produto de reação azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de anticorpos na amostra. Adiciona-se ácido fosfórico a cada poço, para-se a reação, sendo produzida uma coloração final amarela, que é então lida a 450nm.

### e) **ELISA**

Para otimizar a quantificação de proteínas, foram desenvolvidas técnicas que fazem uso de uma enzima conjugada ao anticorpo e que permite detetar quantidades de proteínas solúveis ou presentes em membranas muito pequenas. Um dos ensaios mais utilizados é a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay*), sendo a variante mais usada a ELISA *sandwich*. O método de ELISA permite dosear anticorpos ou antigénios procedendo à marcação de um deles com uma enzima (por exemplo, peroxidase, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase). A atividade final é avaliada pela adição de um substrato sobre o qual a enzima de marcação vai atuar dando origem a um cromogéneo. Esta técnica é rápida, simples e facilmente adaptável a analisadores automáticos.

Em microplacas especiais são imobilizados anticorpos específicos para o antigénio a dosear, seguido da adição da amostra, que contém uma quantidade de antigénio desconhecida assim como a aplicação de soluções-padrão de diferentes concentrações conhecidas de antigénio. Segue-se a lavagem que remove o antigénio não-ligado e a adição de um anticorpo secundário contra antigénio sob estudo, para um epítipo diferente ao qual se ligou o anticorpo primário, conjugado com uma enzima como a peroxidase. A deteção é feita pela adição de um substrato ou cromogénio que é degradado pela enzima, originando um produto de reação com cor. Quanto mais Ag existir na amostra ou na solução-padrão, maior será o desenvolvimento de cor que será posteriormente quantificado no espectrofotómetro. Através da elaboração de uma curva de calibração, com base nos resultados obtidos para diferentes concentrações da solução-padrão, poderá ser extrapolada a concentração de antigénio na amostra.

De uma forma geral, o procedimento simplificado consiste em:

- Pipetar cada um dos calibradores, controlo, amostras, para o respetivo poço;
- Incubar 30min (normalmente a 37°C);
- Efetuar 3 lavagens sucessivas;
- Adicionar o anti-soro marcado;
- Incubar durante 30min;
- Efetuar 3 lavagens sucessivas;
- Adicionar o substrato cromogéneo;
- Incubar durante 15min;
- Adicionar a solução de Stop;
- Realizar a leitura dos poços por fotometria a comprimento de onda adequado.

### **f) Immunoblotting**

A imunoprecipitação de proteínas é uma técnica que permite isolar proteínas presentes numa amostra biológica através do uso combinado de anticorpos (normalmente imunoglobulinas do tipo IgG) específicos para estas proteínas e de esferas que contêm proteína A ou proteína G. A técnica decorre da especificidade de um anticorpo ou imunoglobulina para o antigénio, neste caso uma proteína, sendo por isso designada por imunoprecipitação.

As técnicas de imunotransferência utilizam anticorpos (ou outros ligandos específicos em técnicas relacionadas) para identificar proteínas alvo entre várias espécies de proteínas não relacionadas. Eles envolvem a identificação do alvo de proteína através de reações específicas de antigénio-anticorpo (ou proteína-ligando). As proteínas são tipicamente separadas por eletroforese e transferidas para membranas (normalmente nitrocelulose). A membrana é revestida com um anticorpo primário para um alvo específico e depois com um anticorpo secundário marcado, por exemplo, com enzimas ou com radioisótopos. Quando o ligando não é um anticorpo, a reação pode ser visualizada utilizando um ligando que está diretamente marcado. No procedimento simplificado de *dot blot*, as amostras de proteínas não são separadas por eletroforese, sendo marcadas diretamente na membrana. A técnica de *Imunoblotting* é agora amplamente utilizada em conjunto com a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, não só para objetivos tradicionais, tais como a identificação de imuno-afinidade de proteínas e a análise de respostas imunológicas, mas também como uma técnica de interface genoma-proteoma.

#### Procedimento Geral:

- Pré diluir as amostras de soro
- Colocar tiras num canal disponível,
- Pipetar 1,5mL de amostra para a tira e incubar 30 minutos no agitador. Seguidamente lavar a tira.
- Pipetar 1,5mL de conjugado enzimático, incubar 30 minutos no agitador, lavar novamente. Pipetar 1,5mL de solução substrato, incubar 10 minutos no agitador.
- Parar a reação, aspirar o líquido presente no canal e lavar com água. O controlo positivo do IB está incluído na tira.

▪ Deciscan™ HCV PLUS (BioRad®)

DECISCAN® HCV PLUS é um teste unitário em membrana, utilizando uma técnica imunoenzimática que permite a individualização de anticorpos associados a uma infeção pelo vírus da hepatite C no soro ou no plasma humano.

A caracterização destes anticorpos detetados é uma etapa suplementar indispensável para uma melhor compreensão da serologia HVC, permitindo, assim, um acompanhamento da cinética da evolução dos anticorpos. O teste utiliza como suporte sólido uma membrana fixada numa tira plástica, onde são aplicados sucessivamente:

**1) Controlo Anti-IgG humanos**

Este controlo permite simultaneamente:

- a validação da adição da amostra,
- o controlo dos reagentes (conjugado, substrato),
- a leitura dos resultados em função da intensidade do sinal.

**2) Proteína de fusão: GST**

Os genes codificados para as proteínas de NS3 e de NS4 foram fundidos com o gene da Glutatião S Transferase. A proteína de fusão (GST) permite, assim, controlar a presença de anticorpos anti-GST que podem estar na origem de reações falsamente positivas.

**3) Antígenos HCV**

- Proteínas recombinantes produzidas por *E.coli* a partir de clones selecionados:
  - na zona não estrutural: NS3 e NS4
- Péptidos selecionados pela sua elevada imunogenicidade:
  - na zona estrutural: C1 e C2
  - na zona não estrutural: NS4

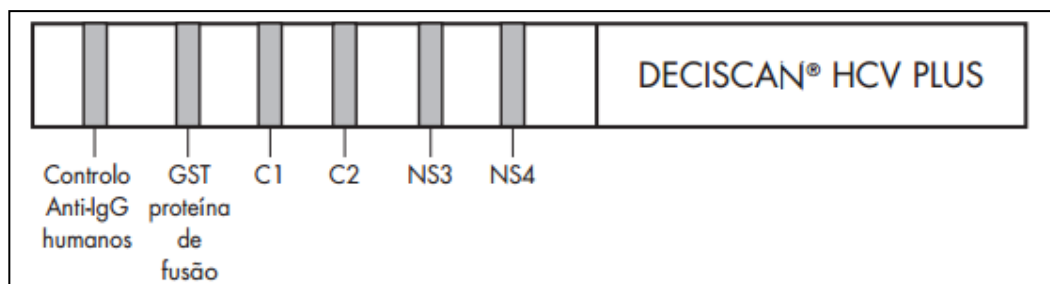


Figura 73 – Tira do Teste Deciscan HCV Plus

## PROCEDIMENTO

A realização do teste compreende as seguintes etapas reacionais:

- 1) O soro a estudar é incubado com a tira. Se houver anticorpos anti-HCV presentes, estes ligam-se aos antígenos fixados na fase sólida.
- 2) Os anticorpos anti-IgG humanos, marcados com fosfatase alcalina, são adicionados após lavagem. Estes fixam-se, por sua vez, aos anticorpos específicos retidos na fase sólida.
- 3) Após eliminação do conjugado enzimático não ligado, o complexo antígeno/anticorpo é revelado por adição do substrato.
- 4) Após paragem da reação, procede-se então à leitura das tiras reveladas e à interpretação dos resultados.

## RESULTADOS

A localização e a identificação das bandas de controlos e das bandas de antígeno HCV presentes em cada tira, corresponde ao esquema seguinte e será validada pelo soro de controlo positivo. O controlo (anti-IgG humanos) situa-se na extremidade da tira (do lado oposto ao suporte de plástico); GST - C1 - C2 - NS3 - NS4 - suporte de plástico (nº de identificação) são, em seguida, aplicados sucessivamente, com base na figura acima apresentada (Figura 73). A intensidade do sinal obtido em cada tira é avaliada por comparação com a intensidade do sinal da banda de controlo (anti-IgG humanos) presente em cada tira.

### Intensidade da banda:

- ✓ Intensidades superiores à intensidade do sinal do controlo anti-IgG: **3 +**
- ✓ Intensidade igual à intensidade do sinal do controlo anti-IgG: **2 +**
- ✓ Intensidades inferiores à intensidade do sinal do controlo anti-IgG, mas superiores ao estado de vestígio: **1 +**
- ✓ Intensidade do sinal apenas visível (vestígio): **0,5 +**
- ✓ Nenhum vestígio: **0**

A banda de controlo deve ser visível a olho nu, sem ambiguidade. Esta valida as etapas de deposição da amostra, de conjugado e de revelação.

Tabela 13 – Interpretação do Resultados Teste Deciscan HCV Plus

LEITURA	INTERPRETAÇÃO
Nenhuma banda antígeno HCV visualizada	NEGATIVO
1 banda antígeno HCV visualizada ou 2 bandas antígenos HCV visualizadas no gene da cápside (C1, C2)	INDETERMINADO*
2 bandas antígenos HCV visualizadas provenientes de 2 genes diferentes (gene da cápside, gene NS3, gene NS4) e com uma intensidade de 0.5+	POSITIVO PROVÁVEL*
Pelo menos 2 bandas antígenos HCV visualizadas, provenientes de 2 genes diferentes (gene da cápside, gene NS3, gene NS4) e com uma intensidade superior a 0.5+	POSITIVO

Tabela 14 – Exemplos de interpretação de resultados Teste Deciscan HCV Plus

	C1	C2	NS3	NS4	INTERPRETAÇÃO
A	1+	2+	0	0	Indeterminado
B	0	0.5+	0.5+	0	Positivo provável
C	0	0	0	0	Negativo
D	0	2+	1+	0.5+	Positivo
E	0	0	0.5+	0	Indeterminado
F	0	0.5+	1+	0	Positivo provável
G	0	0	1+	1+	Positivo

### **g) Imunofluorescência**

Na microscopia de fluorescência a amostra biológica alvo de estudo é, ela própria, a fonte de luz, sendo que a amostra pode emitir fluorescência ao ser objeto de marcação com compostos fluorescentes. Assim, o microscópio de fluorescência baseia-se na absorção de energia pelo composto fluorescente e subsequente emissão de energia na forma de fluorescência visível quando sobre o alvo incide um feixe de luz de um determinado comprimento de onda.

#### **Vidas® bioMérieux**

O equipamento VIDAS (Vitek Imuno Diagnostic Assay Sistem) tem por base o método de ELISA, com uma deteção do ponto final por imunofluorescência. Após incubação da amostra com um anticorpo ou antigénio marcado pela fosfatase alcalina, sucedem-se etapas de lavagem automáticas, com vista a remover os componentes e o conjugado não ligado. Na etapa final de revelação, a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferilfosfato (4-MUP) em 4-metil-umbeliferona (4-MU), do qual resulta emissão de luz a 450nm após excitação a 370nm.



Figura 74 - Vidas® BioMérieux

<http://www.biomerieux.pt/produto/solucao-vidasr>

- ***Clostridium difficile***

A infeção por *Clostridium difficile* surgiu na primeira década deste milénio a partir de um agente patogénico considerado agressivo a uma posição de notoriedade. Esta transformação foi provavelmente impulsionado por três fatores principais:

1. A propagação de estirpes epidémicas e, em particular, um clone "hipervirulento", denominado de forma variável como O ribotipo de *C. difficile* 027 / NAP1 / BI, associado a morbidade e mortalidade aumentada, especialmente nos idosos;
2. Precauções de controlo de infeção sub-óptimas em muitos contextos de saúde diferentes provavelmente contribuíram com a transmissão de estirpes de *C. difficile*, nomeadamente as com potencial epidémico;

3. Confusão sobre quando, onde e a melhor forma de testar a evidência de infecção por *C. difficile* contribuiu para a subvalorização de casos e assim alimentou a propagação deste agente patogénico oportunista.

O princípio do ensaio combina o método de imunoensaio por *sandwich* em duas etapas com a detecção de fluorescência (ELFA). O recetáculo de Fase Sólida (SPR) serve como fase sólida bem como o dispositivo de pipetagem para o ensaio. Os reagentes para o ensaio encontram-se distribuídos nas diversas tiras de reagentes seladas e estão prontos para utilização sempre que necessário. Os quatro passos necessários da reação são executados automaticamente pelo instrumento. O meio reacional é encaminhado para dentro e para fora do SPR várias vezes, sendo cada passo seguido de um ciclo de lavagem que tem como objetivo eliminar os componentes não ligados:

- Ligação específica da toxina A e / ou B presente na amostra com anticorpos anti-toxina A (policlonal de coelho) e anticorpos anti-toxina B (monoclonal de rato) revestidos no interior do SPR.
- Ligação entre os anticorpos da toxina A e anti-toxina A (monoclonal de ratinho) conjugado com biotina e a ligação entre a toxina B e os anticorpos anti-toxina B (monoclonal de ratinho) conjugado com biotina. A presença de biotina é detetada por incubação com estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina.

Na fase de **detecção** a fosfatase alcalina catalisa a hidrólise do substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) num produto fluorescente (4-metilumbeliferona) cuja fluorescência é medida a 450 nm. A fluorescência é medida duas vezes para cada amostra testada. A primeira leitura é uma leitura em segundo plano da cuvete de substrato antes do SPR ser introduzido no substrato. A segunda a leitura é realizada após incubação do substrato com a enzima remanescente no interior do SPR. A intensidade da fluorescência aumenta de acordo com a quantidade de toxinas A e / ou B na amostra. Os resultados são analisados automaticamente pelo instrumento, um valor de teste é gerado e um resultado é impresso para cada amostra.

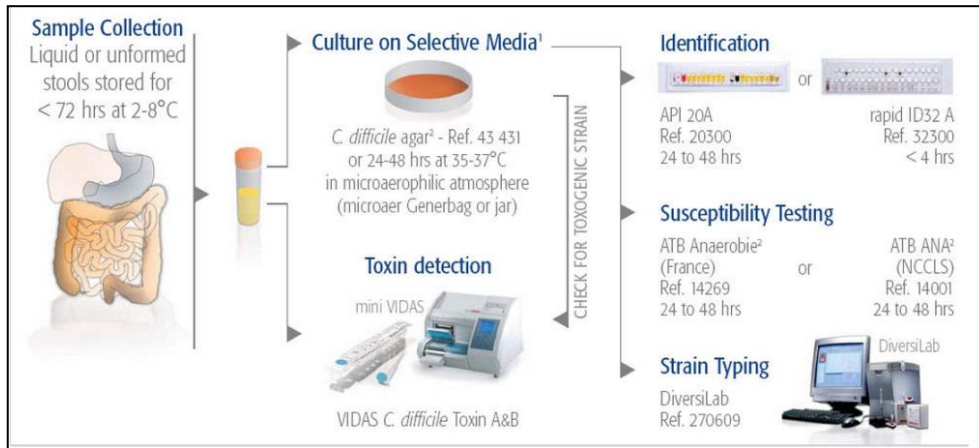


Figura 75 – Procedimentos para a deteção de *C. difficile*

<http://www.biomerieux.pt/produto/painel-vidasr-c-difficile>

## **E. MICROBIOLOGIA**

Na área de Microbiologia são processados diversos tipos de produtos biológicos provenientes da triagem, sendo estes conservados em recipientes próprios de acordo com a sua origem. De uma forma geral, no departamento de Microbiologia são rececionadas amostras de urina (urina asséptica), fezes, exsudados vaginais, rectais, oculares, faríngeos, expetoração, entre outros.

Os produtos são primeiramente semeados e cultivados, efetuando-se de seguida a sua análise e interpretação com base no tipo de colónia e consequente realização do Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA). Deste modo, neste capítulo serão descritos os principais procedimentos de análise e interpretação dos resultados de acordo com o produto biológico a trabalhar.

### **a) *Urina Asséptica***

A colheita de urina asséptica deve ser efetuada com base nos procedimentos descritos no Manual de Colheitas, efetuando-se a mesma diretamente para um recipiente estéril, rejeitando a primeira e a última parte da micção. Caso a amostra não possa ser processada na hora imediata à colheita a mesma deve ser refrigerada, por forma a preservar a sua integridade.

Para a urocultura é necessário proceder aos seguintes passos:

#### **i. EXAME CITOBACTERIOLÓGICO (CITOMETRIA DE FLUXO)**

Para este procedimento deve-se colocar o tubo e urina com conservante na *rack* do citómetro de fluxo, para executar a contagem de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, bactérias, cristais, leveduras e espermatozoides. Após esta análise no equipamento imprimem-se os respetivos resultados, e com base na contagem efetuada pelo equipamento e de acordo com os “alertas” associados a cada amostra no que diz respeito à presença de um número de leucócitos superior a 20 por  $\mu\text{l}$  e contagem de bactérias superior a 500 por  $\mu\text{l}$ , são selecionadas as amostras a semear, bem como todas as urinas de bebés colhidas em saquinhos e todas as amostras processadas em regime de urgência.

## ii. EXAME DO SEDIMENTO URINÁRIO (MICROSCÓPIO ÓTICO)

Efetua-se sempre que surjam os seguintes sinais de alerta:

- Muitas células epiteliais e muitos leucócitos
- Células epiteliais tubulares
- Cristais e presença de eritrócitos
- Leveduras

A observação microscópica é efetuada com a objetiva de 40X e as células são quantificadas por campo, multiplicando por 5 para se obter o resultado em  $\mu\text{l}$ . Deve-se ter em atenção a existência de possíveis interferências com cristais ou granulações.

## iii. EXAME CULTURAL (EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR)

1. Selecionar o meio de cultura apropriado para o produto biológico a trabalhar com base em tabela interna (no caso da urina utiliza-se primeiramente o CLED)
2. Com a ansa descartável, semear a urina fazendo um inóculo vertical e espalhá-lo perpendicularmente a este
3. Incubar na estufa durante 18 a 48h ( $35 \pm 2^\circ\text{C}$ )
4. Observar as placas e efetuar a valorização clínica das amostras de acordo com o número de células epiteliais, de leucócitos e com a contagem das colónias:

10 colónias=1000 UFC / ml ( $10^3$ )

100 colónias=10 000 UFC / ml ( $10^4$ )

1000 colónias= 100 000 UFC / ml ( $10^5$ )

Os exames culturais são valorizados quando temos colónias iguais ou superiores a  $10^5$  não obstante poderão ser valorizadas as amostras com colónias de  $10^4$  ou  $10^3$  em crianças e diabéticos. Caso sejam evidenciadas culturas mistas, suspeita-se de contaminação e portanto deve-se solicitar repetição da colheita.

### Gelose CLED (Cistina Lactose Eletrólito Deficiente)

A gelose CLED é recomendada para o isolamento dos microrganismos urinários. Também permite diferenciar os germes ao fermentar a lactose dos germes não fermentativos. Os microrganismos lactose (+) originam colónias amarelas ou amarelas-esverdeadas por acidificação do meio. Os microrganismos não fermentativos originam colónias verdes, azuis ou incolores. A composição do meio evita que os *Proteus* invadam as culturas executadas.

Os microrganismos mais frequentemente responsáveis por infeções urinárias são:

- *E. coli*
- *Proteus spp.*,
- *Klebsiella spp.*,
- *Enterococcus spp.*
- *Staphylococcus spp.*
- *Candida spp.*

No caso de identificação de colónias amarelas, com morfologia sugestiva de *E. coli* semear, com uma ansa, o meio CPS3 para efetuar identificação presuntiva (produção de  $\beta$ -glucuronidase), incubar durante 18 a 24h (35+/- 2°C) e efetuar o respetivo TSA.

A coloração rosa a *bordeaux* das colónias no meio CPS3, permite a identificação direta de cerca de 90% das *E. coli*. Esta identificação é introduzida manualmente no VITEK 2 ® nas respetivas cartas de antibiograma (ver mais adiante).

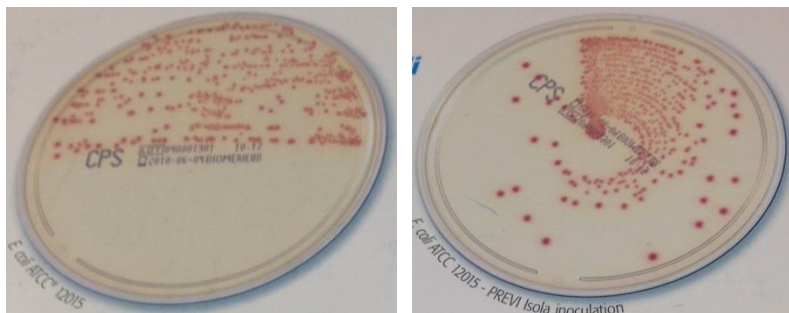


Figura 76 - Meios CPS3 com crescimento de *E. Coli*

Ana Isabel Soares, 2016

## **b) Exsudado Vaginal**

Produto: Zaragatoa com o exsudado recolhido, introduzido em meio de transporte (Stuart); lâmina com esfregaço

### **i. EXAMES CULTURAIS (EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR)**

1. Selecionar meios de cultura a utilizar, de acordo com o produto a trabalhar
2. Retirar a zaragatoa do meio de Stuart e semear nos meios de cultura selecionados
3. Incubar durante 24 a 48h a 35+/-2°C, os meios
4. Voltar a colocar a zaragatoa no meio de Stuart

### **ii. EXAME CITOLÓGICO**

1. Retirar novamente a zaragatoa do meio de Stuart
2. Colocar uma pequena quantidade de exsudado numa lâmina cobrindo seguidamente com uma lamela
3. Pesquisar ao microscópio ótico a presença de células, leucócitos, eritrócitos, parasitas (*Trichomonas vaginalis*), formas leveduriformes e filamentosas de fungos e fazer a sua semi-quantificação com base nos seguintes critérios:
  - 0 a 5/ campo com ampliação de x400 - Raros
  - 6 a 14 /campo com ampliação de x400 - Alguns
  - > 15/campo com ampliação de x400 - Muitos

### **iii. EXAME DIRETO COM COLORAÇÃO DE GRAM**

- Efetuar coloração de Gram do esfregaço
- Pesquisar ao MO a presença de bactérias (Gram + ou -) e suas características morfológicas (presença de formas leveduriformes e filamentosas de fungos). Efetuar a sua semi-quantificação com base nos seguintes critérios:
  - 0 a 5/ campo com ampliação de x1000 - Raros
  - 6 a 29 /campo com ampliação de x1000 - Alguns
  - 30/campo com ampliação de x1000 - Muitos

#### iv. EXAME CULTURAL

A pesquisa é orientada para:

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Streptococcus B*
- *Listeria monocytogenes*
- *Candida spp*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Candida albicans*

Meios:

- Columbia
- Chocolate polivitex
- *Gardnerella* gelose
- Sabouraud gentamicina
- Gelose StreptB (se se pretender pesquisar *Streptococcus B*, no caso de grávidas entre as 33 e 37 semanas)

#### Columbia

A gelose Columbia descrita por *Ellner et al.* é um meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Adicionada com sangue de carneiro, torna-se um meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do metabolismo destas. A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (*estreptococos*, *Listeria*). A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise, que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana. Esta gelose é também adequada para o isolamento dos germes anaeróbios.

- Anotar a presença eventual de hemólises características:
  - hemólise  $\alpha$ : coloração esverdeada à volta da colónia.
  - hemólise  $\beta$ : zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia.

## **Chocolate Polyvitex (VCAT)**

Isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoea* e *meningitidis*.

Esta gelose é composta por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX. A seletividade é obtida por associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas. A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (estreptococos, *Listeria*). A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana. Esta gelose é também adequada para o isolamento dos germes anaeróbios.

## **Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol**

É um meio seletivo recomendado para isolamento de leveduras e bolores a partir de amostras polimicrobianas.

A presença de peptonas e glucose favorece o desenvolvimento das estirpes/cepas fúngicas. A presença de gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) e Gram (+). O cloranfenicol melhora a seletividade em relação a algumas espécies, por vezes, resistentes à gentamicina (estreptococos, *Proteus*). O pH da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento dos fungos face ao desenvolvimento bacteriano.

Se se verificar o desenvolvimento de fungos (colónias azuis) deve-se semear em meio específico para *Candida albicans*. Neste caso, as colónias brancas isoladas podem corresponder a *Candida spp*, para garantir tal achado executa-se a prova da filamentação.

## **Gardnerella Gelose**

A gelose Gardnerella é um meio de isolamento seletivo destinado à deteção de *Gardnerella vaginalis* a partir de colheitas/coletas genitais. *Gardnerella vaginalis*, isolada ou associada a alguns microrganismos anaeróbios (*Mobiluncus*, *Bacteroides* e *Prevotella*), é responsável por diferentes infeções urogenitais. A presença de sangue humano facilita o crescimento da espécie procurada e permite a obtenção de uma  $\beta$ -hemólise à volta das colónias. Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes Gram (-) bem como das leveduras.

Após incubação registar o crescimento, anotando a presença de  $\beta$ -hemólise característica: zona clara à volta ou por baixo da colónia. Uma  $\beta$ -hemólise obtida unicamente em gelose de sangue humano significa que há grande presunção de *Gardnerella vaginalis*. Esta orientação deve ser confirmada por exame direto e tendo em conta o contexto clínico. A identificação de colónias suspeitas deve ser seguida de testes bioquímicos.

### **TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: OXIDASE**

O teste da oxidase permite confirmar a presença de *Neisseria gonorrhoeae* (oxidase positiva) de entre as Enterobacteriaceae (oxidase negativa).

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

#### **Procedimento:**

- ✓ Deitar 1 a 2 gotas do reagente da oxidase sobre papel de filtro.
- ✓ Colocar sobre o papel de filtro a colónia retirada da cultura bacteriana a testar.

Resultado Positivo (oxidase +): cor violeta a púrpura em cerca de 10 a 30 segundos.

Resultado Negativo (oxidase -): cor amarela, reações tardias ou ausência de coloração.

### **c) Exsudado Faríngeo**

O exsudado faríngeo serve de auxílio de diagnóstico nas infecções bacterianas do trato respiratório superior. A pesquisa é orientada para *Streptococcus* dos grupos A, C e G de Lancefield.

Meios a utilizar:

- Columbia
- Columbia ANC (CNA)
- Todd-Hewitt

Amostra: Zaragatoa com exsudado em meio de Stuart

Conservação: Até 24h entre 2 a 8°C

Semear as placas conforme meios apresentados em cima e incubar na estufa a 35 +/- 2°C  
24h-48h:

1. Colocar zaragatoa no meio Todd-Hewitt com sangue e incubar 18 a 24h (35+/-2°C). Repicar o meio líquido, com uma ansa, para o meio Columbia ANC e incubar na estufa a 35+/-2°C
2. Efetuar um controlo positivo com uma placa de Columbia ANC semeada com Todd-Hewitt em que previamente foram inoculadas algumas colónias de *Streptococcus pyogenes* (incubar durante 18 a 24h a 35 ± 2°C).
3. Observar as placas e procurar evidências de β-hemólise.

#### **i. COLUMBIA ANC + 5% DE SANGUE DE CARNEIRO (CNA)**

Isolamento seletivo de bactérias exigentes, que permite o desenvolvimento de bactérias Gram (+) frequentemente detetadas nas amostras clínicas. Permite a deteção de hemólises (devido à presença de sangue de carneiro), sendo este um critério de base para a orientação e identificação bacteriana. A presença de ácido nalidixico e colimicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) bem como os Bacillus.

No caso de inexistência de desenvolvimento bacteriano o resultado é expresso com a indicação de “*não se desenvolveram bactérias potencialmente patogénicas*” nos meios usuais utilizados.

## ii. TODD-HEWITT

O caldo Todd-Hewitt + Antibióticos é um caldo de enriquecimento seletivo destinado ao enriquecimento do *S. aureus* no âmbito do rastreio do *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), bem como deteção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora poli-microbiana. Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos da flora de acompanhamento. Após a etapa de enriquecimento, o caldo Todd-Hewitt + Antibióticos deve ser repicado em meios destinados à deteção dos estreptococos.

#### **d) Exsudado Nasal**

O exsudado nasal serve de auxiliar de diagnóstico nas infeções do trato respiratório superior. A pesquisa de bactérias é orientada para:

- *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA)
- *Streptococcus*  $\beta$  -hemolítico do grupo A\*
- *Streptococcus pneumoniae*\*
- *Moraxella catarrhalis*\*

\*realizar apenas se justificável

Meios a utilizar:

- Columbia (já descrito anteriormente)
- Chapman Gelose (MSA)

#### **i. CHAPMAN GELOSE (MSA)**

O meio destina-se ao isolamento seletivo de estafilococos em amostras de origem humana. Os microrganismos que fermentam o manitol dão colónias amarelas, sendo esta a característica para a orientação e identificação do *Staphylococcus aureus*. O elevado teor em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de outros microrganismos que não o *Staphylococcus*.

Após incubação observar o crescimento bacteriano e o aspeto das colónias:

- As colónias de *S. aureus* que fermentam o manitol são amarelas e apresentam uma descoloração amarela à volta das colónias difundida no meio.
- A identificação dos microrganismos isolados deve ser seguida de testes bioquímicos

Numa amostra com *Staphylococcus aureus* deve-se realizar sempre o TSA, para pesquisa de MSRA (*Staphylococcus aureus* Metilicina Resistente). Se o quadro clínico não for indicativo de processo infeccioso, pode-se adicionar nas observações do resultado clínico informação que reporte para este acontecimento tal como “flora de colonização”.

### TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: COAGULASE

Verifica a capacidade de um microrganismo reagir com o plasma e formar um coágulo por ação da enzima da coagulase. Um teste de coagulase positivo é um critério de diagnóstico presuntivo para identificar o *S. aureus*.

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente pelas estirpes de *S. aureus*. Existem duas formas de coagulase: uma “ligada à parede celular” ou “Factor clumping” e outra libertada pela célula bacteriana que é a “coagulase livre”. A “coagulase ligada” ou “Factor clumping” atua diretamente no fibrinogénio plasmático e causa aglutinação das bactérias em agregados.

#### Procedimento:

- ✓ Colocar uma gota do reagente no cartão próprio
- ✓ Repicar uma colónia da amostra pretendida e misturar devidamente

Reação positiva: Ocorre aglutinação (efetuar posteriormente o TSA)

Reação negativa: Efetuar GP (antibiograma no VITEK)

### TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: OPTOQUINA

Permite testar a sensibilidade do *Streptococcus pneumoniae*.

#### Procedimento:

- 1) A partir de uma ou várias colónias da estirpe a testar, semear em estrias apertadas uma placa Columbia.
- 2) Colocar com a pinça um disco de optoquina na superfície da placa.
- 3) Incubar a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas
- 4) Observar o diâmetro do halo de inibição formado (ver mais a frente definição)

Resultado: Um halo de inibição  $\geq 15\text{mm}$  significa a presença eventual de *Streptococcus pneumoniae*

## TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: BACITRACINA

Os *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do Grupo A de Lancefield são geralmente sensíveis a pequenas quantidades de Bacitracina, sendo que, por outro lado, os *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos de outros grupos são geralmente resistentes.

Amostra: Colónias com *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos

### Procedimento:

- 1) Semear com a ansa uma placa de Columbia com uma colónia de bactérias suspeita.
- 2) Colocar na superfície da placa um disco de bacitracina com o auxílio de uma pinça.
- 3) Incubar a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas.

Resultado: O crescimento do *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do Grupo A é inibido pela Bacitracina, sendo visível uma zona de inibição à volta do disco  $\geq 15\text{mm}$ . Os *Streptococcus* de outros grupos resistem à Bacitracina e portanto crescem à volta do disco.

## **e) Coprocultura**

A pesquisa é orientada para os seguintes microrganismos:

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Campylobacter*
- *E. coli*
- *Yersinia*
- *Candida spp*

Meios a utilizar:

- CLED
- Selenito
- Hektoen
- Sabouraud
- Campyloset
- Yersinia (se pedido)

### **i. SELENITO**

Caldo de enriquecimento para as *Salmonellas* a partir das fezes. A sua composição favorece o crescimento das *Salmonellas* no seio de uma flora polimicrobiana. Após a etapa de enriquecimento, o caldo de Selenito F deve ser repicado em meios destinados à detecção de *Salmonella*.

### **ii. HEKTOEN**

A gelose de Hektoen é um meio de isolamento seletivo de diferenciação destinado à pesquisa das *Salmonellas* e *Shigella* a partir de colheitas de fezes. Os microrganismos que fermentam um dos três açúcares contidos neste meio originam colónias amarelas e amarelas-salmão, as outras colónias verdes ou azuis-esverdeadas. Os microrganismos que produzem H<sub>2</sub>S originam colónias com centro negro.

A presença de colónias verdes ou azuis-esverdeadas com ou sem centro negro (colónias características) representa uma forte presunção de *Salmonella* ou de *Shigella*. A inibição dos germes Gram (+) obtém-se com uma mistura de sais biliares e de corantes.

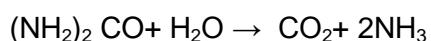
### iii. **CAMPYLOCEL**

A gelose *Campylocel* é um meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* intestinais a partir das fezes. A presença de sangue facilita o crescimento da espécie pesquisada, sendo a fertilidade aumentada devido à presença de redutores.

Os antibióticos e antifúngicos presentes no meio inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos. As colónias de *Campylobacter* são de tamanho pequeno, cinzentas e estendem-se por vezes ao longo das estrias da sementeira. A identificação deve ser igualmente confirmada simultaneamente por exame direto: os *Campylobacter* têm uma mobilidade característica. A coloração de azul de metileno também é útil para a pesquisa de leucócitos que por vezes são abundantes.

### **TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: TESTE DE UREASE**

Permite a deteção da presença da enzima urease, contribuindo para a demonstração das características de identificação das Enterobactérias. A enzima urease catalisa a hidrólise de ureia em dióxido de carbono em amónia.



Se a urease estiver presente, hidrolisa a ureia e a amónia resultante, aumenta o pH do meio, alcalinizando-o, pelo que a sua presença se deteta facilmente por meio de um indicador. A prova é considerada positiva aquando da alteração da cor do meio e negativa na ausência dessa alteração.

As bactérias que possuem urease transformam a ureia em carbonato de amónio, induzindo uma alcalinização do meio que adquire uma coloração vermelha violácea na presença de vermelho de fenol. Deste modo, este teste ajuda na identificação de certas espécies de *Enterobacter*.

Resultados possíveis:

- ✓ Urease + (funciona como controlo positivo): *Proteus spp.*
- ✓ Urease + fraco: *Klebsiella spp.*
- ✓ Urease – (funciona como controlo negativo): *Escherichia coli*
- ✓ Urease –: Suspeita-se de *Salmonella spp.* na coprocultura, permitindo a distinção em relação ao *Proteus spp.*

**TESTES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES: TESTE INDOL**

Este teste permite qualificar as bactérias segundo a sua capacidade de usar o aminoácido triptofano como fonte de carbono e/ou energia. Algumas enterobactérias produzem a enzima triptofano que cataliza a remoção do grupo indólico do triptofano. Assim, enquanto o indol acumula no meio de cultura, como desperdício o resto da molécula de triptofano é transformada em piruvato e usada para satisfazer as necessidades nutritivas da bactéria.

A produção de indol é demonstrada pela adição do reagente de Kovacs, o qual reage com indol dando origem à formação de uma coloração vermelha na parte superior.

## **f) Expetoração**

Meios a utilizar:

- Columbia
- MacConkey
- Chocolate haemophilus

Procedimento:

- Retirar do frasco estéril, com o auxílio de uma ansa descartável, uma porção da amostra com pús ou sangue, e semear os meios de cultura selecionados (em cima).
- Efetuar duas lâminas, retirar a amostra com uma ansa descartável
- Incubar as placas Columbia e MacConkey em estufa a 35+/-2°C até cerca de 48h. Incubar a placa Chocolate haemophilus em estufa de CO2 a 35 +/-2°C até cerca de 48h.
- Depois de secas, fixar as lâminas à chama de bico de bunsen e efetuar uma coloração de Gram
- Observar o Gram ao microscópio ótico com uma ampliação de x100 para quantificar células epiteliais e leucócitos. Com uma ampliação de x1000 observar o predomínio de bactérias da amostra.

Resultados:

- No exame direto - células epiteliais e leucócitos
- No Gram - referir o predomínio da flora
- No exame cultura: caso se identifique crescimento bacteriano valorizável, dar o resultado como “presença de bactérias potencialmente patogénicas”

## **i. TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Estas bactérias são encontradas com frequência em patologia humana: infeções cutâneas, septicémias, endocardites, meningites pneumónicas, etc.

O reagente *Slidex staph plus* engloba partículas de latex azul sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos monoclonais. Permite a deteção simultânea do fator de afinidade para o fibrinogénio, da proteína A pelo fragmento Fc das IgG de rato e de um antigénio de grupo ligado às estruturas periféricas específicas do *Staphylococcus aureus*.

Amostra: colónias de uma cultura suspeita de *Staphylococcus aureus* em meio de Columbia ou Chapman.

### Procedimento:

- A. Numa carta descartável escolher dois círculos adjacentes e identificá-los com o nº da amostra.
- B. Agitar os reagentes e colocar uma gota de reagente R1 num dos círculos e uma gota de reagente R2 no círculo adjacente
- C. Utilizando o bastonete ou ansa, retirar do meio de cultura, 1 ou 2 colónias suspeitas e adicioná-las ao reagente R1 e ao reagente R2.
- D. Misturar cuidadosamente durante aproximadamente 10s, dar à placa um ligeiro movimento rotativo durante aproximadamente 20s
- E. Ler a reação sob luz normal sem uso da lupa.

### Resultados:

- Resultado positivo: aparecimento de aglutinação com o reagente R1 ao fim de aproximadamente 30s e ausência de aglutinação como reagente R2
- Resultado negativo: ausência de aglutinação com os reagentes R1 e R2
- A reação não é interpretável se houver aglutinação com o reagente R2.

Microrganismos valorizados:

- *Staphylococcus aureus*
- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Moraxella*
- *Klebsiella*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinobacter baumannii*

**ii. TUBERCULOSE: PESQUISA DE BACILO DE KOCH**

Dentro das espécies clinicamente importantes de *Mycobacterium* sp., a espécie *tuberculosis* apresenta uma alta patogenicidade para o homem. O bacilo de Koch, como é conhecida esta espécie, é um bacilo álcool-ácido resistente e de crescimento lento, devido à espessura de sua parede celular rica em ácido micólico.

O diagnóstico definitivo de Tuberculose é bacteriológico, exigindo a identificação do agente *Mycobacterium tuberculosis* nos tecidos ou líquidos biológicos (expetoração, secreções brônquicas, suco gástrico, líquidos pleural, ascítico, pericárdico, líquor, pus, urina, sangue ou fezes) atingidos pela doença, sendo a expetoração o produto mais comum para identificação de Mtb. Devem ser colhidas três amostras, preferencialmente de manhã, em jejum, em três dias consecutivos

Na expetoração, como na maioria dos outros produtos, deve ser feito um exame para pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido-Resistente (BAAR) e para cultura e identificação da espécie de micobactéria. O exame bacteriológico permite descobrir as fontes mais importantes de infecção (os casos bacilíferos) e verificar a respetiva sensibilidade aos diversos fármacos antibacilares. Num doente «com suspeita clínica de TB doença, cada produto biológico colhido é analisado ao microscópio, sendo efetuado um exame bacteriológico direto, com a coloração de Ziehl-Nielsen, que permite a deteção imediata de micobactérias. Na prática, esta revela-se a técnica mais utilizada e de rápida, económica e fácil execução para o diagnóstico de TB. O exame cultural, feito em meio de Lowenstein, é o método padrão de identificação de Mtb. Este método aumenta a rentabilidade do exame direto, mas tem a desvantagem da morosidade do resultado (duas a seis semanas), devido ao crescimento lento das micobactérias.

## Procedimento

É realizado o **exame direto** a partir do esfregaço por estiramento em lâmina, feito em duplicado, com coloração de uma das lâminas por Ziel-Neelsen, sendo a outra convenientemente armazenada. No microscópio ótico pesquisa-se a presença de bacilos álcool-ácido resistentes.

Para o **exame cultural** a amostra deve ser sujeita a tratamento prévio de descontaminação – digestão com NaOH para concentrar qualquer célula de micobactéria que possa estar presente. As Mycobacterias estão revestidas com uma fina camada de material que resiste à coloração, contudo, uma vez coradas as células bacterianas resistem à descoloração por solventes orgânicos fortes como álcool-ácido. Consequentemente, estas bactérias são conhecidas como “*acid-fast*”.

1º. Junta-se igual quantidade de expectoração e de NaOH para liquefazer a amostra

2º. Adiciona-se uma gota de indicador fenolftaleína (indicador).

3º. Neutraliza-se com HCl 2N até viragem da cor da solução (até desaparecer a cor vermelha).

A amostra é posteriormente transferida para tubo de Lowenstein Joensen que incuba a 37°C em posição inclinada, com rolha não totalmente fechada, durante as primeiras 24h, ao fim das quais se remove o produto em excesso e coloca-se o tubo na vertical, até perfazer os 60 dias de incubação. Dá-se resultado ao fim de 30 e 60 dias caso seja negativo. Se for positivo pode-se dar o resultado quando se revelar positivo.

### **g) Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes**

A quantidade de sangue presente nas fezes aumenta com o agravamento das patologias gastrointestinais que envolvem lesões hemorrágicas, principalmente associadas com o trato digestivo inferior. Desta forma a pesquisa de sangue nas fezes é um meio efetivo de detecção precoce e monitorização de doenças digestivas ou intestinais hemorrágicas.

Natureza da amostra: Fezes (em tubo de tampão para diluir a amostra ou em recipiente limpo e vedado). Estável 12h a 2 ou 8°C.

#### Procedimento:

- Retirar do frasco estéril, com o auxílio de uma ansa descartável, uma porção da amostra com a vareta que se encontra no interior da tampa do próprio tubo. Efetuar movimentos de rotação de modo a que as duas vendas fiquem preenchidas com fezes
- Colocar a vareta no interior do tubo de diluição da amostra
- Retirar o número necessário de dispositivos perfurantes da embalagem de alumínio (ter especial atenção para não tocar na parte do dispositivo perfurante abaixo do limite superior da zona amarela, pois será onde a amostra irá ser colocada)

O teste é baseado na imunocromatografia, utilizando dois anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana. Um deles reveste as partículas de látex azuis (marcadores de detecção) e o outro está imobilizado na membrana de migração que se liga às partículas de látex marcadas e que têm a função de indicar a positividade do teste. A suspensão das fezes entra em contacto com a parte inferior da tira e se existir hemoglobina, esta vai ligar-se aos anticorpos que revestem as partículas de látex. Estas partículas vão migrar através do líquido, e se a amostra contiver hemoglobina irá surgir na zona de reação uma linha azul, caso a sua concentração exceder o valor limite de detecção. A segunda linha serve de controlo interno do kit.

#### Resultados:

- Positivo: Presença de duas linhas azuis na zona de reação
- Negativo: Uma linha azul única na zona de reação, após 10 minutos.

Após de 10 minutos não valoriza qualquer tipo de linha que possa surgir.

## **h) Hemocultura**

As Hemoculturas estão entre as mais importantes amostras para diagnóstico dos laboratórios de microbiologia clínica. A taxa de recuperação e tempo de detecção são os principais indicadores de desempenho de qualquer sistema de cultura de sangue. A realização de hemocultura permite detectar a presença de bactérias ou leveduras no sangue, para identificar o microrganismo (s) presente, e orientar conseqüentemente o tratamento, sendo geralmente prescritas duas ou mais hemoculturas e colhidas amostras consecutivas. Idealmente deveriam ser realizadas com o mínimo de uma hora de intervalo (no sentido de maior probabilidade de detectar microrganismos nas bacteremias intermitentes) e antes do início da antibioterapia, no entanto em situações de emergência, ou em doentes com alta probabilidade de bacteriemia contínua, o intervalo pode ser encurtado para 10 minutos ou menos, colhidas em locais diferentes.

Como o sangue é um produto estéril, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura indica, geralmente, ser este o agente etiológico da infeção.

### **i. BACT/ALERT® BIOMÉRIEUX**

O BacT/ALERT® é um sistema automatizado de incubação, agitação e monitorização de hemoculturas que deteta a existência de microrganismos. A tecnologia utilizada está patenteada para o sensor e detecção colorimétrica, identifica os microrganismos através da monitorização da produção de CO<sub>2</sub> por parte destes, uma vez que estas espécies metabolizam os substratos existentes no meio de cultura.

- Produto biológico necessário: frasco para hemocultura em aerobiose

Os frascos de Hemocultura são colocados no equipamento BacT/ALERT para leitura, sendo que o crescimento de microrganismos é detetado pela produção de CO<sub>2</sub> a partir da cultura. No caso de produção de CO<sub>2</sub> o frasco apresenta coloração. Deste modo, os microrganismos em multiplicação no meio, que geram CO<sub>2</sub>, consoante o aumento deste gás, assim a cor do sensor do frasco torna-se mais tênue.



Figura 77 - BacT/ALERT® 3D 60  
bioMérieux e meios/frascos de cultura

<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/bact-alert-3d-healthcare>

O feixe de luz emitido dos díodos é projetado através de um filtro de excitação para refletir o sensor sensível ao CO<sub>2</sub> no topo de cada frasco. A luz refletida é direcionada através de um filtro de emissão para um detetor fotossensível que por sua vez está conectado com o computador. Ao medir a luz refletida, o equipamento monitoriza e deteta as mudanças de cor no sensor. Os algoritmos analisam os dados para determinar a positividade, e o laboratório é imediatamente notificado com alarmes sonoros e visuais. As alterações no sensor são permanentes e

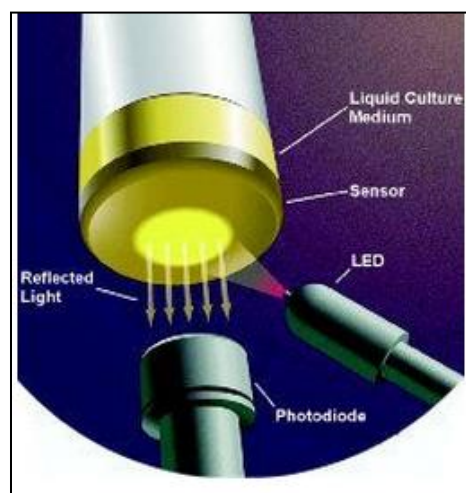


Figura 78 - Ilustração do funcionamento do BacT/ALERT®

visíveis a olho nu, pelo que se o nível de CO<sub>2</sub> não se altera significativamente após um determinado número de dias, a amostra é considerada negativa (devendo ser expressa como estéril).

No caso de amostras positivas deve-se realizar a identificação do microrganismo e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. De seguida, e de acordo com o tipo de crescimento bacteriano verificado (bactérias aeróbias e anaeróbias) e considerados POSITIVOS pelo equipamento efetua-se repicagem para os meios próprios:



Figura 79 - Colorações dos frascos de cultura

→ Bactérias Aeróbias: Columbia (COS)

→ Bactérias Anaeróbias:

Columbia (COS)

Schaedler (meio sólido): incubar em GENbag Anaer bioMérieux®

Posteriormente deve-se efetuar a leitura/interpretação das placas. A Hemocultura serve de auxiliar para o diagnóstico de infeções sistémicas. A valorização e interpretação clínica são baseadas no Cumitech 1C (Blood Cultures IV) da Sociedade Americana de Microbiologia.

Os microrganismos mais isolados são:

- *Staphylococcus spp*
- *Streptococcus spp*
- *Enterobactereaceae*

As sepsis a anaeróbios são situações clínicas muito pouco frequentes. A positividade dos frascos de hemocultura em anaerobiose é na maioria dos casos da responsabilidade de bactérias anaeróbias facultativas como por exemplo *Staphylococcus spp.*

## ii. GENBAG ANAER BIOMÉRIEUX®

O GENbag é composto por um envelope estanque de plástico flexível e transparente, que permite, com a utilização de um gerador, obter rapidamente uma atmosfera adaptada à cultura das bactérias anaeróbias, microaerófilas e capnófilas (= exigentes em dióxido de carbono).

As saquetas/sachets de alumínio dos geradores GENbag funcionam sem adição de água nem de catalisador (não há libertação de hidrogénio). Proporcionam ao utilizador uma grande praticabilidade e total segurança. As saquetas/sachets geradoras GENbag anaer, microaer e CO<sub>2</sub> contêm os mesmos componentes químicos (carvão ativado, ascorbato de sódio e outros componentes orgânicos e inorgânicos). Os compostos gasosos obtidos (oxigénio e dióxido de carbono) são ajustados pelas quantidades de compostos químicos que absorvem o oxigénio e libertam o dióxido de carbono contidos em cada saqueta/sachet.



Figura 80 - GENbag Anaer bioMérieux®

<http://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/Culture/Ancillary-Products/Others/Gas-generators/GENBAG-ANAEROBIC-%2820-SACHETS%29/p/45534>

## PROCEDIMENTO

### Placas de Petri:

- Colocar as placas de Petri semeadas no envelope de plástico.
- Utilizar, preferencialmente, placas com ventilação.
- Respeitar as indicações descritas no envelope:
  - GENbag microaer e GENbag CO<sub>2</sub>: colocar 2 placas no máximo. No caso de cultura em 1 única placa, é essencial colocar uma 2ª placa vazia na saqueta/sachet de forma a ajustar o volume de ar no envelope de plástico e atingir assim a boa concentração gasosa.
  - GENbag anaer: colocar 5 placas com 90 mm de diâmetro, no máximo.

### Galerias de identificação:

- Para as galerias de identificação do tipo API, colocar 1 galeria em cada envelope estanque (as galerias devem ser colocadas no envelope GENbag com as suas placas individuais de incubação previamente humedecidas. Para as galerias de antibiograma do tipo ATB, colocar 2 galerias em cada envelope estanque (seja com o GENbag CO<sub>2</sub> ou com o GENbag anaer).

- Abrir a saqueta/sachet de alumínio sem utilizar tesoura ou objeto cortante. Tirar o gerador (saqueta/sachet de papel) e colocá-lo num envelope de plástico. A reação começa logo que o gerador entra em contacto com o ar.

O tempo que decorre entre abrir a saqueta/sachet de alumínio que contém o gerador, colocá-lo no envelope de plástico e fechar o envelope deve ser o mais curto possível. Um contacto prolongado com o ar conduz à perda de atividade; a atmosfera pretendida para o envelope ficará incompleta.

- Seguindo bem a linha traçada no envelope (GENbag anaer, GENbag microaer ou GENbag CO<sub>2</sub>), fechar esta hermeticamente com uma barra para fechar. Aplicar a barra para fechar em todo o seu comprimento de forma a ficar estanque. Verificar regularmente a capacidade das barras para fechar, cada barra pode ser utilizada, no máximo, uma dezena de vezes.

- Para GENbag anaer, colocar um indicador de anaerobiose no envelope de plástico. O indicador de anaerobiose permite controlar se a reação de anaerobiose foi bem efetuada e se esta é mantida durante a incubação.

- Após incubação, observar as culturas através do envelope, reincubar se necessário. Se o envelope estiver aberto e se for necessária uma segunda incubação, utilizar novos geradores.

- Após utilização, tirar o gerador GENbag anaer do envelope e deixá-lo arrefecer à temperatura do laboratório.

Tabela 15 - Tabela Resumo Meios de Cultura

Produto Biológico	Meios de Cultura	Exame a Fresco / Coloração de Gram
Exsudado Auricular/Ocular	- Columbia - MacConkey - Chocolate Haemophilus - Chapman	-/x
Coprocultura	- Hektoen - Sabouraud - Campyloset - Selenito - Yersinia (apenas se pedido)	-
Faríngeo	- Columbia - CNA - Todd-Hewitt	-
Nasal	- Chapman - Columbia	-
Vaginal/Vulvar	- VCAT - Columbia - Sabouraud - Setrept B - <i>Gardnerella</i> (se justificável)	x/-
Urina Asséptica	CLED	x/-
Expetoração	- Columbia - MacConkey - Chocolate Haemophilus	-/x
Hemocultura Aerobiose	Columbia	-
Hemocultura Anaerobiose	- Columbia - Schaedler com Vit. K3	-

### iii. TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (TSA) /ANTIBIOGRAMA

Os antibióticos podem ser definidos, segundo Waksman (1943) como toda a substância química produzida por microrganismos capaz de inibir o desenvolvimento e de destruir as bactérias ou outros microrganismos.

Os antibióticos poderão ter uma atividade “bactericida” se matam as bactérias ou uma atividade “bacteriostática” se apenas inibem a multiplicação e o crescimento bacteriano. Neste último caso, o hospedeiro infetado tem tempo para ativar a sua resposta imunitária e eliminar o agente infeccioso, enquanto que em casos de doentes com sistemas imunitários debilitados e incapazes de destruir o agente bacteriano são preferencialmente utilizados os antibióticos com ação bactericida. Em qualquer dos casos, os antibióticos atuam atacando a parede bacteriana, a membrana celular ou outros constituintes bacterianos necessários para a vida e reprodução bacteriana. A classificação mais comum dos antibióticos baseia-se no seu mecanismo de ação.

#### **Mecanismos de ação dos Antibióticos:**

- Inibição da síntese da parede celular
- Inibição da síntese da membrana citoplasmática
- Inibição da síntese da membrana citoplasmática
- Inibição da síntese proteica nas ribossomas
- Inibição da síntese dos ácidos nucleicos
- Antibióticos que alteram os metabolismos celulares

Há centenas de antibióticos, alguns dos quais são apenas utilizados a nível hospitalar, estando a maior parte incluídos em oito grandes grupos. São classificados de acordo com a sua estrutura química de base. Os constituintes de cada grupo de antibióticos surgem da adição ou substituição de radicais à estrutura base, com o objetivo de aperfeiçoar as suas propriedades antibacterianas e farmacológicas.

Os principais grupos de antibióticos são:

- Penicilinas, inibidores de beta-lactamase, cefalosporinas;
- Monobactâmicos;
- Carbapenemes;
- Glicopeptídeos,
- Macrólidos e lincosaminas;
  
- Tetraciclina;

- Quinolonas e fluoroquinolonas;
- Aminoglicosídeos;
- Outros antibacterianos (exemplo: sulfonamidas, cloranfenicol, rifamicinas, linezolid, metronidazol, fosfomicina)

Os TSA (testes de sensibilidade aos antibióticos) permitem avaliar *in vitro* a sensibilidade das bactérias a um determinado antibiótico ou antibacteriano, possibilitando definir a concentração inibitória mínima (CMI - a mais pequena concentração em que já não há crescimento bacteriano) e a concentração de bactericida mínima. Além de informar o grau de resistência, a CIM pode dar informações importantes sobre a possível presença de genes envolvidos nos mecanismos de resistência.

Esta metodologia comporta diversas vantagens, nomeadamente:

- Não depende da taxa de crescimento bacteriano.
- Evita os problemas de má difusão dos aminoglicosídeos.
- Utilizado nas bactérias anaeróbias.
- Deteta sinergismos e antagonismos dos antibióticos.

O TSA deve ser efetuado nas seguintes situações:

- ✓ Para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana
- ✓ Estudos epidemiológicos de resistência e em estudos de novos agentes antimicrobianos
- ✓ Em todos os microrganismos isolados de locais geralmente estéreis (sangue, por exemplo);
- ✓ Nas situações clínicas que requerem terapêuticas prolongadas;
- ✓ Na ausência de resposta à terapêutica empírica instituída.

O TSA pode ser realizado laboratorialmente segundo diversas metodologias, sendo as praticadas no laboratório os métodos manuais de difusão por discos, E-test e ainda o método automático com cartas Vitek ®. Os antibióticos a reportar encontram-se de acordo com as regras estabelecidas pela Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), sendo selecionados com base no produto biológico e no microrganismo isolado.

## **MÉTODOS DE DIFUSÃO: E-TEST**

A gelose Mueller Hinton é um meio que se destina à realização de antibiogramas por difusão e à determinação de Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) utilizando o método Etest®. Este meio foi concebido em conformidade com as recomendações dos comités EUCAST [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing] e CLSI®

A composição da gelose Mueller Hinton permite o crescimento das bactérias não exigentes (enterobactérias, bacilos Gram (-) não fermentadores, estafilococos e enterococos) detetadas em condições patológicas, garantindo um mínimo de interferência dos componentes da fórmula no resultado do antibiograma.

A sua concentração em iões bivalentes permite uma determinação ótima da sensibilidade dos antibióticos cuja atividade é catião dependente. O seu reduzido teor em timina - timidina (inibidores da sulfonamida) diminui os fenómenos de crescimento à volta dos discos, permitindo uma medição mais exata das zonas de inibição.

## **MÉTODOS DE DIFUSÃO: DISCOS**

Amostra: 4 a 5 colónias iguais retiradas de um meio com 18 a 24 horas de incubação.

### Procedimento:

1. Colocam-se os discos de papel impregnados com o agente antimicrobiano e as placas escolhidas conforme o microrganismo em estudo à temperatura ambiente.
2. Prepara-se um inóculo num tubo de poliestireno, suspendendo 4 ou 5 colónias iguais na ampola de soro fisiológico estéril, agita-se no vórtex e ajusta-se a turvação a 0,5 da escala de McFarland por comparação visual.
3. Inocula-se as placas com uma zaragatoa, pressionando o excesso contra as paredes do tubo, aplicando em 3 sentidos diferentes pela totalidade da placa.
4. Selecionam-se os antibióticos a usar de acordo com o produto e o organismo em estudo.
5. Colocam-se os vários discos com a pinça (flamejada na chama do bico de Bunsen). Pressionam-se ligeiramente os discos colocados à superfície do meio para assegurar bom contacto. Os discos devem ser colocados pelo menos a 1.5 cm de distância uns dos outros e da parede, devendo no máximo ser colocados 5 discos. Não se deve recolocar um disco depois deste ter entrado em contacto com o agár.

6. Após alguns minutos colocar na estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  (evitar níveis elevados de dióxido de carbono para evitar alteração do pH superficial do meio).

7. Medir o diâmetro (mm) dos halos de inibição completa, após 18 a 24 h, com o auxílio de uma régua. Colónias grandes dentro do halo de inibição têm dois significados: representam estirpes resistentes ou um inóculo polimicrobiano que é sempre de evitar.

### MÉTODOS AUTOMATIZADOS: VITEK 2® BIOMÉRIEUX

O Sistema Vitek 2® utiliza a tecnologia colorimétrica avançada, utilizando códigos de barras para a rastreabilidade completa e qualidade desde a amostra até ao resultado. O sistema Vitek 2 responde às necessidades dos testes laboratoriais de controlo de qualidade para identificação microbiana rápida e segura, executando as análises de identificação e sensibilidade, através da monitorização contínua do crescimento e da atividade dos organismos no interior das cartas. Esta função é executada através do sistema ótico de transmitância. A tecnologia “*expert*” (AES - *Advanced Expert System*) inclui uma grande base de dados de identificação, a disponibilidade de uma plataforma mais automatizada, resultados rápidos, maior confiança e requer pouco tempo de formação.



Figura 81 - Vitek 2® BioMérieux

<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>

O aparelho possui uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas, uma zona de incubação e leitura automática de cartas (com capacidade para incubar várias cartas à temperatura média de  $35^{\circ}\text{C}$ ). O sistema ótico funciona de forma contínua, detetando a luz transmitida a comprimento de onda apropriado, com recurso a LEDs (Díodos Emissores de Luz). As cartas disponíveis constituem pequenas placas compostas por poços preenchidos por substratos bioquímicos liofilizados para reações de identificação ou concentrações variáveis de antibióticos para o teste de sensibilidade. Após a leitura o equipamento analisa e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho através de um *software* próprio.

## **A Resistência aos Antibióticos**

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a eficácia dos agentes antibacterianos foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se oporem à sua ação. Estas podem adquirir resistência aos antibióticos, quer modificando o seu genoma por mutação, quer incorporando genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética. A resistência aos antibióticos constitui, deste modo, um grave problema de Saúde Pública à escala mundial que se traduz num inevitável aumento da morbidade e da mortalidade e que terá como consequência a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com a saúde e os cuidados médicos (recomendações do Conselho Europeu 8/6/1999).

Quando uma bactéria é suscetível a determinado antibiótico é destruída por ação do mesmo, no entanto permanecem as bactérias resistentes, então as únicas a proliferar. Assim, estas bactérias resistentes permanecerão no local de infeção e tornar-se-ão predominantes após ação sucessiva de antibiótico (pressão de seleção). O principal fator favorecedor da resistência aos antibióticos, e que se relaciona diretamente com os hábitos terapêuticos instituídos, é a pressão de seleção exercida pelo uso intensivo, muitas vezes excessivo, da antibioterapia. A aquisição e a transferência de genes de resistência aos antibióticos associados à seleção exercida pelo uso intensivo destas substâncias explicam a situação alarmante em medicina humana à escala mundial. Alguns exemplos: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou apresentando suscetibilidade diminuída à vancomicina, *enterococos* resistentes à vancomicina, estirpes multirresistentes de pneumococos, bactérias de Gram negativo produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro alargado, meningococos com suscetibilidade diminuída à penicilina.

Os mecanismos de resistência são hereditários, isto é, uma bactéria transmite à sua descendência a resistência aos antibióticos; mas pode ainda transmiti-lo às bactérias circundantes que coabitam com a bactéria resistente. É desta forma que as bactérias que vivem no corpo humano sem causar problemas (comensais) se tornam resistentes. Não obstante, os antibióticos não diferenciam entre as bactérias comensais e as bactérias agressivas (as patogénicas, que causam as infeções), revelando-se este um problema no que à ação dos antibióticos diz respeito.

A resistência pode surgir por aquisição de mutações espontâneas (devido à modificação da informação genética "endógena") ou por aquisição de material genético de outras bactérias ("exógeno"). Neste último caso, pode haver transferência (disseminação) de material genético, por simples conjugação, com outra bactéria - nomeadamente dos genes que codificam para a resistência aos antibióticos - o qual se pode encontrar em elementos genéticos móveis (plasmídeos e transposões). Este material genético também pode ser transferido (disseminado) para outra bactéria através dos vírus das bactérias (os bacteriófagos).

### **Mecanismos de resistência aos Antibióticos:**

- Resistência bacteriana:
  - Bombas de efluxo
  - Alteração da permeabilidade
  - Produção enzimática que altera a estrutura química do antibiótico
  - Alteração do local de ação
  
- Adquirida (aquisição de genes de resistência):
  - Mutações espontâneas em genes endógenos
  - Aquisição de sequências exógenas
  - Expressão dos genes resistência
  
- Intrínseca (resistência ubíqua entre espécies ou géneros)

A resistência intrínseca é uma capacidade inata de determinada espécie bacteriana resistir ao antibiótico. Este pode não penetrar na membrana celular devido à dimensão da molécula ou os genes que codificam para os vários mecanismos de resistência existem no código genético da estirpe selvagem. Este é um tipo de resistência apenas transmitido verticalmente que também pode ser denominado de resistência natural.

De seguida apresentam-se alguns exemplos de mecanismos de resistência intrínseca associados a certas bactérias

Tabela 16 - Mecanismos de Resistência Intrínseca de algumas bactérias na presença de certos antibióticos

TIPO DE BACTÉRIA	ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE RESISTÊNCIA ASSOCIADO
<b>Estritamente anaeróbias</b>	Aminoglicosídeos	Incapacidade de atravessar a membrana interna, que se caracteriza por um processo dependente de oxigênio. A resistência ocorre, pois estas bactérias carecem do transporte adequado à entrada do antibiótico. As bactérias aeróbias facultativas só apresentam resistência quando crescem em condições de anaeróbiose
<b>Gram positivos</b>	Aztreonam	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo número de PBP's (<i>Penicillin Binding Proteins</i>) onde se dá a ligação do antibiótico</li> <li>- Redução do alvo na parede celular impedindo a entrada do antibiótico</li> </ul>
<b>Bacilos Gram negativos</b>	Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B	Diminuição da permeabilidade na membrana externa aos compostos hidrofóbicos
<b><i>Klebsiella sp.</i></b>	Ampicilina	Deve-se à produção de $\beta$ -lactamases, que inativam o antibiótico
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Sulfonamida, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição da entrada do antibiótico, levando a concentrações intracelulares muito baixas</li> <li>- A membrana externa destas bactérias apresenta uma baixa permeabilidade a substâncias hidrofóbicas</li> </ul>
<b><i>Mycoplasma sp.</i></b>	b-lactâmicos	Ausência de parede celular, onde atua o antibiótico
<b>Enterococos</b>	Aminoglicosídeos Todas cefalosporinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição do metabolismo oxidativo para que ocorra a entrada do antibiótico</li> <li>- Decréscimo de PBP's e a produção de <math>\beta</math>-lactamases.</li> </ul>

A emergência de estirpes resistentes aos novos antibióticos faz pairar o espectro de, num futuro próximo, não haver opções terapêuticas para tratar as infecções bacterianas. Para preservar a potencialidade dos antibióticos atualmente existentes, importa diminuir a sua utilização. Os médicos, farmacêuticos e a população em geral devem ser consciencializados para evitar a utilização intensiva e abusiva destes valiosos medicamentos. A prescrição, dosagem e duração de tratamento de antibiótico no homem são de particular importância, para se evitar a eliminação das bactérias benéficas conjuntamente com a bactéria causadora da doença no homem.

### III. BIBLIOGRAFIA

- Pinto, AM. *Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações*, 2ª Edição, Lidel, Lisboa, 2013
- Antcsak, SE. *Fisiopatologia Básica*, Lab Editora, Rio de Janeiro, 2005
- Pimentel, RA. *Marcadores Bioquímicos de Doença Cardiovascula*", Clínica Médica e Diagnóstico Dr. Joaquim Chaves, Lisboa, 2005
- Imuno-hematologia – Recomendações do Instituto Português do Sangue – Centro Regional de Sangue de Lisboa, 2ª Edição, 2008
- MADIGAN Michael T., MARTINKO John M., BENDER Kelly S., BUCKLEY Daniel H., STAHL David A., *Brock Biology Of Microorganism*, 14ª Edição, Pearson, 2015
- Loffeir, L; Rasterter J; Haferlach, T. *Atlas of Clinical Hematology*, 6ª Edição, Springer, 2005
- Young CS, Poulsen K. Anderson's *Atlas of Hematology*, 2ª Edição, Wolters Kluwer Health, 2014
- Rodak BF, Fristma G, Doig K. *Hematology: Clinical Principles and Applications*, 3rd ed. W.B. Saunders Company, 2007
- Bain, BJ. *Células Sanguíneas: Um Guia Prático*, 5ª Edição, Artemed 2016
- ADVIA® 2120/2120i *Hematology Systems - Operator's Guide*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 067D0157-01 Rev. C, 2010-04
- ADVIA® 120 *Hematology Systems - Technology*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
- Bula AVITEX-SLE® Ref OD093 - *Teste Sorológico em Látex para a deteção de anticorpos para DNA de filamento duplo associados com o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)*, Omega Diagnostic, 2012
- Silba, LL. Dissertação de Mestrado - *Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia*, São Paulo 2010
- Skoog, Holler e Crouch. "*Principles of Instrumental Analysis*", 6th Ed. International Student Edition, Thomson Brooks/Cole, 2007.
- *Atomic Absorption Spectrophotometers AA-7000 Series® - Operator's Guide*, Shimadzu Corporation, C122-E058G, 2014

- *Varian Vista-MPX CCD Simultaneous ICP-OES Spectrometer – Technology*, Agilent Technologies, Inc. 2010.
- Martinho, JMG. *Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível*, Magazine *Técnicas Experimentais*, Centro de Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico, Lisboa.
- Gonçalves, MLSS. *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções*, 21ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1990.
- Bula VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B (REF 30 118-01), bioMérieux SA, 2016
- Amado, MA, *MÉTODOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS: Vantagens e inconvenientes*, Escola Superior Agrária de Viseu, 2000.
- Bula *VaccZyme™ Anti-Tetanus Toxoid IgG Enzyme Immunoassay Kit*, The Binding Site Group Ltd., 2010.
- Murray, P; Rosenthal, K *et al. Microbiologia Médica – 7ª edição*, Elsevier Editora Lda., 2014.
- Junqueira, LC; Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*, Guanabara Koogan, 2000.
- Bula GENbag - Geradores de atmosfera (REF 45 532), bioMérieux SA, 2014
- Hoffbrand V, Moss PAH. *Essential Haematology*, 6th ed. Wiley- Blackwell, 2011
- Lorenzi TF. *Atlas de Hematologia: Clínica Hematológica Ilustrada*. Guanabara Koogan, 2006
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbok of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*, 4th ed. W.B. Saunders Company, 2006
- Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry – Techniques, Principles, correlations*, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins 2010
- Daniel, CH. *Quantitative Chemical Analysis*, 7th ed. International Student Priced Edition, W.H. Freeman, 2007
- Koneman, E. W. et al, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Fifth Edition, Lippincott-Raven Publishers, 1997
- Zachary P.; Ullmann M., et al, *Immunoblot in the serological diagnosis of hepatitis C virus infection*, Elsevier, 2004.

- Bula *Deciscan HCV PLUS Assay (Immunoblot test to validate EIA seropositivity and identify specific Hepatitis C Virus (HCV) antibodies in human serum or plasma)*, Bio-Rad, 2015
- Ves-Matic Cube 80, Diesse Diagnostica Senese S.p.A, Meranini Diagnostic. Disponível em: <http://www.en.menarinidiag.es/Products/Hematology/Erythrocyte-sedimentation-rate/Ves-Matic-Cube-80>
- Chrono-log Corporation News, *New Aggregometer Available in two or four Channel Configuration*, 2005. Disponível em: <http://www.chronolog.com/CLNEWS.HTM>
- *Características das Cetonas (corpos cetónicos) e cetoacidose*, Abbott Diabetes Care (ADC). Disponível em: <http://www.abbottdiabetescare.pt/a-diabetes/sobre-a-diabetes/cetonas-corpos-cetonicos-e-cetoacidose>
- Especificações Analisador automático das partículas de urina - Sysmex UF-1000i™. Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Urinalysis/Pages/SERIE-UF.aspx>
- *Datasheet 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA - Enzymeimmunoassay for the quantitative determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human serum or plasma*, Immunodiagnostic Systems Limited. Disponível em: [http://peramed.com/peramed/docs/AC-62F1\\_EN.pdf](http://peramed.com/peramed/docs/AC-62F1_EN.pdf)
- *Datasheet Innostest® hTAU Ag*, Innogenetics. Disponível em: [http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/PathoDiag/Innogenetics/user's%20manual/80323\\_htau\\_110704.pdf](http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/PathoDiag/Innogenetics/user's%20manual/80323_htau_110704.pdf)
- *Datasheet RPR VDRL CARBON / TPHA, Serology rapid tests*, ELITech Microbiology Reagents. Disponível em: [https://www.elitechgroup.com/wp-content/uploads/2015/01/rpr\\_vdrl\\_2013011.pdf](https://www.elitechgroup.com/wp-content/uploads/2015/01/rpr_vdrl_2013011.pdf)
- *Datasheet BACT/ALERT®*, bioMérieux SA. Disponível em: <http://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalertr> e <http://www.biomerieux.pt/microbiologia-industrial/industria-alimentar/bactalertr-3d>
- Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Disponível em: <http://www.dgs.pt> (Microsite do Controlo da Infeção)
- Hemocultura, Lab Tests Online, 2014. Disponível em: <http://www.labtestsonline-pt.org/tests/BloodCulture.html?tab=3>
- Artigo de revisão - *HEMOCULTURAS*, Revista de Saúde Amato Lusitano, 2013. Disponível em: [http://www.ulscb.min-saude.pt/media/6559/artigo\\_revisao\\_2.pdf](http://www.ulscb.min-saude.pt/media/6559/artigo_revisao_2.pdf)

- *Tuberculose: Guia Orientador de Boa Prática*, Ordem dos Enfermeiros – Concelho de Enfermagem, Maio 2013. Disponível em: [http://www.ordemenfermeiros.pt/publicacoes/Documents/GOBPTuberculose\\_VFinal\\_proteg.pdf](http://www.ordemenfermeiros.pt/publicacoes/Documents/GOBPTuberculose_VFinal_proteg.pdf))
- *Resistência aos Antimicrobianos*, Direção-Geral da Saúde, 2015. Disponível em: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx>
- *Qualidade e Certificação* – Laboratório Dr. Joaquim Chaves. Disponível em: [http://www.jcs.pt/pt/conheca\\_a\\_joaquim\\_chaves\\_saude/ver/14](http://www.jcs.pt/pt/conheca_a_joaquim_chaves_saude/ver/14)
- Norma DGS nº 002/2011 de 14/01/2011 - Diagnóstico e Classificação da Diabetes *Mellitus*. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022011-de-14012011.aspx>
- Portaria nº166/2014, de 21 de agosto – *que estabelece os requisitos mínimos relativos à organização e funcionamento, recursos humanos e instalações técnicas dos laboratórios de patologia clínica/análises clínicas e, bem assim dos respetivos postos de colheitas, os laboratórios de patologia clínica/análises clínicas*
- Lei n.º102/2009, de 10 de setembro - Regime Jurídico da Promoção da Segurança e Saúde no Trabalho

# *Parte III*

MONOGRAFIA

O PAPEL DO LABORATÓRIO NO DIAGNÓSTICO E NA CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS  
NEUROTRÓPICO *WEST NILE*

MONOGRAFIA ORIENTADA PELA PROF. DOUTORA QUIRINA SANTOS COSTA



## **O Papel do Laboratório no Diagnóstico e na Caracterização do Vírus Neurotrópico West Nile**

### **I. RESUMO**

O vírus *West Nile* (WNV) é um Flavivírus que se mantém na natureza em ciclos alternados de infecção, em aves e mosquitos hematófagos, principalmente do género *Culex*. A infecção natural já foi demonstrada em mais de 200 espécies de aves, sendo que a suscetibilidade à infecção e à doença variam amplamente (1). O período de incubação da infecção por WNV ocorre, normalmente entre três e quinze dias após a picada do mosquito vetor. Cerca de 80% das infecções humanas por WNV são assintomáticas, nas restantes pode haver uma síndrome febril com início súbito durante dois a cinco dias, com cefaleias, mialgias, mal-estar, náuseas e vômitos, por vezes com exantema maculopapular ou roseolar ou doença neurotrópica em cerca de 1% dos casos. (2)

O presente trabalho representa uma pesquisa da literatura científica existente sobre o vírus neurotrópico *West Nile*, associando a caracterização da infecção causada pelo vírus com o papel do próprio vetor artrópode e a sua caracterização/identificação laboratorial, enfatizando os aspetos mais atuais em termos epidemiológicos relacionados com este tema.

Deste modo, a presente Monografia assume como principais objetivos:

- Reconhecer e relacionar os aspetos ambientais e ecológicos na disseminação da infecção viral;
- Determinar a etiologia e patogénese do vírus *West Nile*;
- Expor os principais aspetos epidemiológicos associados ao vírus e a sua importância no conhecimento da distribuição da doença a nível nacional e mundial;
- Descrever os principais métodos de diagnóstico laboratorial da doença e de que forma constituem uma mais-valia para o domínio da transmissão do vírus;
- Explanar os principais meios de controlo do vetor e as formas de prevenção de transmissão da infecção.

**Palavras-chaves:** *West Nile*, vírus neurotrópico, mosquito, *Culex*, infecção viral, diagnóstico laboratorial.

## II. ABSTRACT

*West Nile virus* (WNV) is a Flavivirus that remains in the wild in alternating cycles of infection, in birds and hematophagous mosquitoes, mainly of the genus *Culex*. Natural infection occurs in 200 species of birds, with a susceptibility to infection and variable disease (1). The incubation period of the WNV infection varies, usually between three and fifteen days after a mosquito bite. Approximately 80% of human WNV infections are asymptomatic, but they may have a febrile syndrome with a sudden onset of two days, with headache, myalgia, malaise, nausea and vomiting, sometimes with maculopapular or roseolar rash or neurotropic disease in about 1% of cases. (2)

The present work summarizes the existing scientific research on the *West Nile* neurotropic virus, conjoining the characterization of the disease caused by the virus and the role of the vector itself and its laboratory characterization/identification, emphasizing the epidemiological aspects.

The present Monograph assumes as main objectives:

- Recognize and relate environmental and ecological aspects in the dissemination of viral disease;
- To determine an etiology and pathogenesis of *West Nile* virus;
- To present the main epidemiological aspects associated with the virus and its importance in the knowledge of the distribution of the disease at national and world level;
- Describe the main methods of laboratory diagnosis of the disease and how they constitute a greater value for the field of virus transmission;
- Clarify the main means of vector control and how to prevent transmission of the disease.

**Keys-words:** *West Nile virus*, neurotropic virus, mosquito, *Culex*, laboratory diagnosis methods.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração da presente monografia teve como base a análise, interpretação e síntese de vários artigos científicos originais e de revisão, bem como a consulta de páginas na internet, publicados no período compreendido entre 1940 e 2016.

Para o ato de pesquisa foram utilizadas palavras-chave como, *West Nile*, vírus neurotrópico, mosquito, *Culex*, infecção viral, diagnóstico laboratorial.

As fontes para a obtenção de bibliografia foram a plataforma Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) e ainda as páginas referentes ao CDC ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) e WHO (<http://www.who.int/en/>). A pesquisa foi realizada no período compreendido entre Fevereiro de 2016 e Julho de 2017.

## IV. INTRODUÇÃO

O aumento de viagens internacionais e as alterações climáticas são fatores que têm contribuído para a expansão de doenças transmitidas por mosquitos a latitudes mais vastas no globo terrestre, para além das regiões tropicais e subtropicais, por vetores invasores:

- Género *Aedes*, tanto da espécie *A. albopictus* como da *A. aegypti* que podem transmitir Dengue, Chikungunya, Zika e Febre-amarela;
- Reemergência de doenças transmitidas por espécies nativas: *Culex* e *Anopheles* que transmitem, entre outras, Febre do Nilo Ocidental e Malária. (3)

As doenças infecciosas associadas a vetores transmitidas ao Homem constituem um grupo de doenças com grande importância clínica, epidemiológica e laboratorial (4). Os vírus transmitidos por artrópodes, designados arbovírus são a causa de doenças infecciosas emergentes que afetam o Homem e os animais domésticos, consideradas um problema de Saúde Pública atual, sendo motivo de preocupação crescente no espaço europeu. Estes vírus são transmitidos entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por intermédio de artrópodes vetores competentes. Nos hospedeiros tangenciais, como o Homem e os animais domésticos, estes vírus causam infeções podendo resultar em casos de doença com morbidade e mortalidade significativas. (5)

Algumas das doenças transmissíveis com maior expressão a nível mundial, e que são responsáveis por graves situações de morte e morbidade, possuem uma característica em comum: o vetor necessita de um hospedeiro para realizar uma refeição de sangue podendo ocorrer a transmissão do agente patogénico, pelo que os mosquitos são um dos exemplos de vetores mais frequentes. Devido à sua capacidade de reprodução, em situação de infeção, a proliferação de agentes patogénicos pode tornar-se elevada, pelo que evitar a multiplicação destes vetores é um importante passo para o combate de doenças. Para isso, é necessário detetar atempadamente a sua presença, perceber a sua capacidade como agente de doença, e restringir possíveis criadouros. (6)

O vírus *West Nile* (WNV) é um dos exemplos de infecções transmissíveis por vetores, tendo sido originalmente identificado no distrito de *West Nile* no Uganda, e isolado pela primeira vez em 1937 (65). No ciclo biológico deste Flavivírus estão envolvidos mosquitos e aves que servem de multiplicadores e reservatório de vírus. Os humanos e equinos são hospedeiros acidentais e finais. Os primeiros surtos epidémicos de encefalite provocados pelo WNV em humanos e equinos registaram-se nos anos 50 e 60 do século passado em Israel e França (29). Em consequência dos casos de doença e morte registados em humanos, aves e equinos, particularmente nos deltas dos rios Danúbio e Volga e após emergência do vírus em 1999 nos EUA, o WNV passou a ser considerado um problema de saúde pública e animal. Nos últimos anos (2004-2010) registaram-se numerosos surtos da doença nos países da bacia mediterrânica. Em Portugal, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1971, em mosquitos, pelo Professor Doutor Armindo Filipe (Investigador Coordenador do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge). (66)

A infecção por vírus *West Nile* tem um elevado impacto em países onde é ou se tornou endémico (América do Norte). Nas últimas décadas os surtos epidémicos do vírus *West Nile* na Europa e bacia mediterrânica têm vindo a aumentar. (8)

O vírus *West Nile* é uma das principais causas de encefalite humana nos EUA, sendo transmitido por mosquitos ornitofílicos sendo os seres humanos são infetados como hospedeiros acidentais. Os principais vetores de transmissão do WNV são os mosquitos do género *Culex*, que preferencialmente se alimentam de aves. Como em muitos outros arbovírus, as características que permitem que Flavivírus, como o WNV, se repliquem e transmitam a diferentes hospedeiros estão codificadas no seu genoma, que também contém informações para a produção de proteínas estruturais e não-estruturais necessárias para infecção de células hospedeiras. O WNV desenvolve estratégias diferentes para estabelecer a infecção, a replicação e a transmissão, sendo que a maioria destas estratégias inclui o desvio das respostas imunológicas do próprio hospedeiro perante o vírus. (9)

Assim, e de forma a melhor compreender os fenómenos associados ao desenvolvimento e transmissão do vírus neurotrópico *West Nile*, considera-se pertinente primeiramente abordar os aspetos ambientais e epidemiológicos associados ao vírus e ao seu vetor de transmissão, onde as alterações climáticas assumem uma especial preocupação. Seguidamente será efetuada a descrição e caracterização da infecção em geral, bem como a respetiva avaliação laboratorial do vírus, que evoca extrema importância no contexto do controlo e da própria erradicação da patologia associada.

## V. INFEÇÕES TRANSMITIDAS POR VETORES E ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS

*“As doenças infecciosas transmitidas por vetores e roedores ao Homem são uma questão importante para a saúde global. Nas últimas duas décadas, muitos agentes patogénicos associados a vetores têm surgido em novas regiões, enquanto muitas doenças endémicas têm aumentado a sua incidência. A importância que estas patologias têm atualmente em todo o mundo foi um fator decisivo para que a Organização Mundial de Saúde dedicasse o Dia Mundial da Saúde 2014 ao tema das Doenças Transmitidas por Vetores.”*

(por José Pereira Miguel, Presidente do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA)

A vida humana depende da dinâmica do sistema climático da Terra. As interações entre a atmosfera, oceanos, biosferas terrestres e marinhas, criosfera e a superfície terrestre determinam o clima da superfície terrestre. As concentrações atmosféricas de gases de efeito estufa, que incluem o dióxido de carbono, o metano e o óxido nitroso estão a aumentar, muito devido às atividades humanas relacionadas com o uso de combustível, alteração do uso da terra e agricultura. Um aumento dos gases de efeito de estufa conduz ao aumento do aquecimento da atmosfera e da superfície terrestre (10). A aceleração da atividade económica no último século precipitou um impacto ambiental de proporções sem precedentes. O declínio dos ecossistemas, a perda de biodiversidade, o esgotamento da camada de ozono estratosférico e as mudanças climáticas são algumas dessas mudanças ambientais. (11)

Segundo a definição do Quarto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental para as Alterações Climáticas, *entendem-se por alterações climáticas (AC) qualquer alteração do clima ao longo do tempo, quer seja devido a variabilidade natural ou como resultado da atividade humana*. De acordo com este relatório, a origem do aquecimento global observado a partir da segunda metade do século XX tem estado associada à intensificação do efeito de estufa. Esta intensificação tem por base o aumento da emissão de gases com efeito de estufa resultante da atividade antropogénica. Estima-se que as temperaturas médias globais aumentem cerca de 1,4°C e 5,8°C em 2100 (relativamente à média de 1961 e 1990), projeta-se o aumento do nível médio do mar e o aumento da frequência de fenómenos extremos, como ondas de calor ou de frio, episódios de precipitação muito intensa e secas mais frequentes e severas, assim como ciclones tropicais mais intensos.

Como têm sido verificadas nas últimas décadas, algumas dessas tendências são já evidentes, sendo inequívoco o atual aumento das temperaturas médias globais do ar e do oceano, a ampla distribuição global do degelo e o aumento do nível médio do mar por meio da expansão térmica das camadas superficiais do oceano e da fusão dos gelos das regiões montanhosas. Dado que as alterações climáticas de origem antropogénica foram inevitáveis no século XX os seus impactes sobre os sistemas naturais e sociais serão na maior parte dos casos negativos. Outro dos impactes que se prevê que ocorra ao nível da saúde é o aumento da incidência de doenças infecciosas, nomeadamente, de doenças originadas pela deficiente qualidade da água e dos alimentos e de doenças transmitidas por vetores e roedores. O potencial aumento destas infeções está relacionado com a sensibilidade que os seus sistemas biológicos têm às variáveis climáticas (por exemplo, temperatura, precipitação e humidade), as quais são condicionantes de fatores como a distribuição geográfica e a dinâmica do ciclo de vida dos seus agentes. (12)

As infeções virais emergentes ou re-emergentes representam um importante problema de Saúde Pública nos últimos anos. O surgimento de uma doença infecciosa é, muitas vezes, multifactorial, refletindo certos comportamentos humanos e mudanças na ecologia dos vetores ou na genética dos microrganismos. Este fenómeno deve-se em parte à evolução dos agentes infecciosos, à globalização e à modificação do habitat. As infeções virais emergentes podem ter origem a partir de agentes infecciosos anteriormente existentes, a partir de fenómenos de mutações genéticas e/ou recombinações, ou como consequências de vírus presentes em animais que se adaptam a hospedeiros humanos. Por outro lado, as infeções re-emergentes podem ter origem a partir da reativação de reservatórios quiescentes ou como consequência do reaparecimento do vírus em áreas anteriormente infecciosas, mas onde este terá deixado de circular. Finalmente, a possibilidade de viajar longas distâncias num curto espaço de tempo pode permitir a rápida introdução de agentes infecciosos em áreas anteriormente não afetadas. Isso pode ocorrer diretamente de pessoa para pessoa ou indiretamente através de vetores de artrópodes ou de outros animais transmissores, e às vezes por meio de transporte de mercadorias – Figura 1. (13,14)

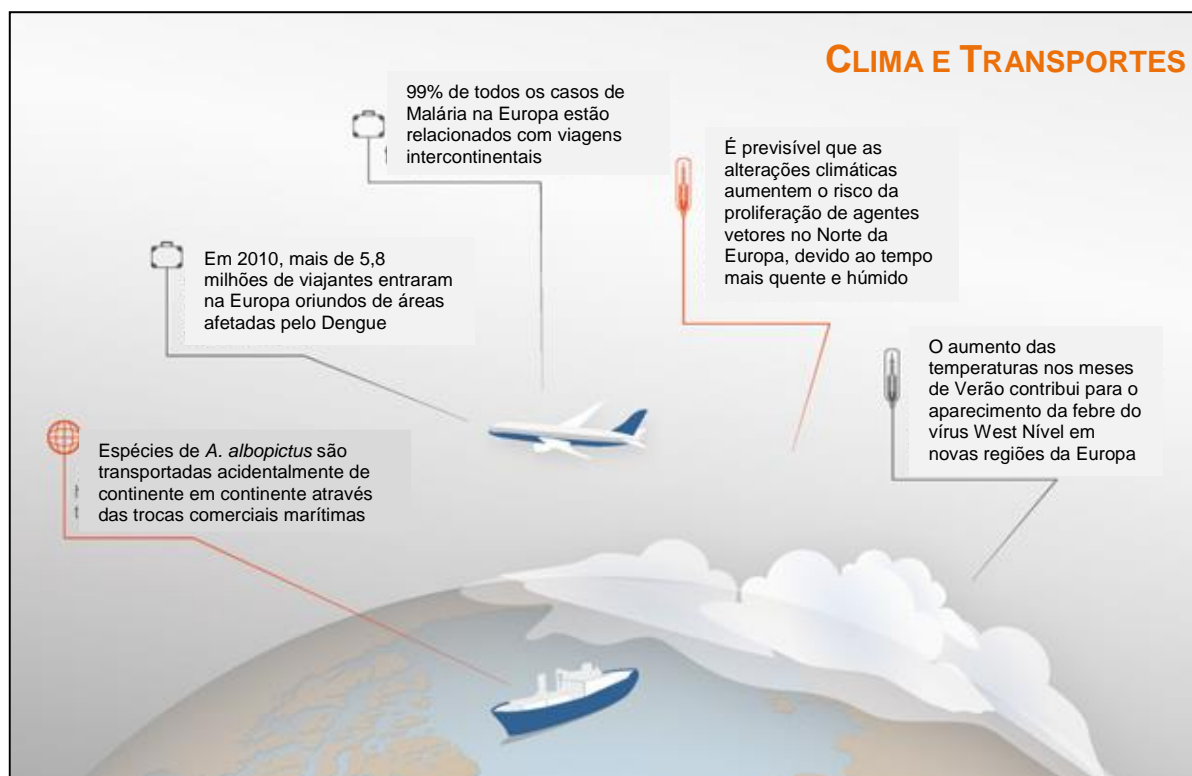


Figura 1- As viagens, trocas comerciais e as alterações climáticas influenciam a distribuição das doenças transmitidas por mosquitos vetores.

[Adaptado de: <http://ecdc.europa.eu/> (62)]

Embora as populações da maioria dos países estejam expostas aos riscos das alterações climáticas, os riscos serão maiores nos países de rendimentos mais baixos, uma vez que o peso atual das infeções sensíveis ao clima é mais elevado e, naturalmente, os seus sistemas de saúde pública são mais fracos. As mudanças temporais e espaciais da temperatura terrestre, da precipitação e dos níveis de humidade que se espera que ocorram sob diferentes cenários de mudança climática afetarão a biologia e ecologia de vetores e hospedeiros. As alterações climáticas podem também alterar a distribuição e a transmissão de doenças transmissíveis através do impacto de comportamentos humanos levando a padrões de mudança de exposição a doenças infecciosas (por exemplo, o aumento do tempo gasto ao ar livre em florestas onde existe um maior número de vetores), e consequentemente o risco de transmissão das infeções por estes agentes aumenta. (15,10) Este risco aumenta porque, embora os artrópodes possam regular a sua temperatura interna, alterando o seu comportamento, estes não podem fazê-lo fisiologicamente sendo criticamente dependentes do clima para a sua sobrevivência e desenvolvimento.

A capacidade vetorial pode aumentar substancialmente devido à redução do período de incubação extrínseca por parte dos artrópodes, apesar da redução na taxa de sobrevivência destes. Espécies de mosquitos como o *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. darlingi*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* são responsáveis pela transmissão da maioria das doenças disseminadas por vetores, sendo sensíveis a mudanças de temperatura em ambientes aquáticos, quer na fase imatura quer na fase adulta. Se a temperatura da água aumenta, as larvas demoram menos tempo a maturar-se e conseqüentemente existe uma maior capacidade para produzir descendência durante o período de transmissão da doença. Em climas mais quentes as fêmeas adultas de mosquito, por exemplo, digerem o sangue mais rápido e alimentam-se com maior frequência, aumentando assim a intensidade da transmissão. (10)

Pelo uso comum, os vetores são normalmente considerados animais invertebrados, geralmente artrópodes, mas também podem incluir «fomites», que são definidos como “qualquer objeto inanimado que pode estar contaminado com microrganismos que causam doenças e assim serve para transmitir a infecção” ou roedores, que transportam o agente de um reservatório para um hospedeiro suscetível. (16) Os principais vetores são, os mosquitos, os flebótomos, as carraças, as pulgas e os piolhos, não só porque integram um conjunto muitíssimo alargado de doenças, algumas consideradas como as de maior mortalidade e morbidade a nível mundial, mas também porque um diagnóstico e uma vigilância epidemiológica integradas permitem que sejam desencadeadas medidas de prevenção que em muito podem reduzir a sua severidade. Os agentes das doenças infecciosas transmitidas por mosquitos destacam-se, pela sua gravidade, em infeções causadas por parasitas como a Malária (*Plasmodium* sp) e as Filárias, mas também por vírus como o *Dengue* e *West Nile*, que necessitam de um diagnóstico laboratorial preciso e diferencial. Os vírus transmitidos por artrópodes (Arbovírus), que provocam encefalites virais, são bem conhecidos na Europa, surgindo, ocasionalmente, surtos epidémicos de vírus *West Nile* (género *Flavivirus*). As doenças transmitidas por vetores constituem assim as doenças infecciosas mais complexas de prevenir e controlar, já não só é difícil prevenir o contacto com os mosquitos, carraças e pulgas, mas a maioria dos vírus transmitidos por vetores ou bactérias infetam não só os seres humanos como os animais.

Os mosquitos são insetos que pertencem à família *Culicidae*, uma das mais primitivas famílias da ordem Diptera, na qual se reconhecem mais de 3500 espécies e subespécies distribuídas por todo o mundo, exceto nos locais permanentemente gelados. Os mosquitos são o mais importante grupo de artrópodes do ponto de vista médico e veterinário pelo facto de serem vetores de importantes doenças da espécie humana. (4)

Na sequência de episódios de pluviosidade intensa e de cheias prevê-se que o risco de doenças transmitidas pela água aumente. Na Europa, no entanto, as boas condições de saneamento básico e de abastecimento público atuais indicam que este risco se mantenha reduzido. Estima-se, igualmente, que o risco de doenças transmitidas por vetores venha a aumentar na sequência quer da alteração da distribuição geográfica dos vetores, quer da extensão do período de época de transmissão. As maiores preocupações para a Europa estão focadas na potencial reintrodução de Malária na Europa de Leste, na introdução do vetor do *Dengue* no Sul da Europa, nomeadamente em Portugal, no aumento do risco de infeções por *Leishmania* sp e no aumento do risco de infeções transmitidas por carraças, como a Encefalite e Doença de Lyme. (12)

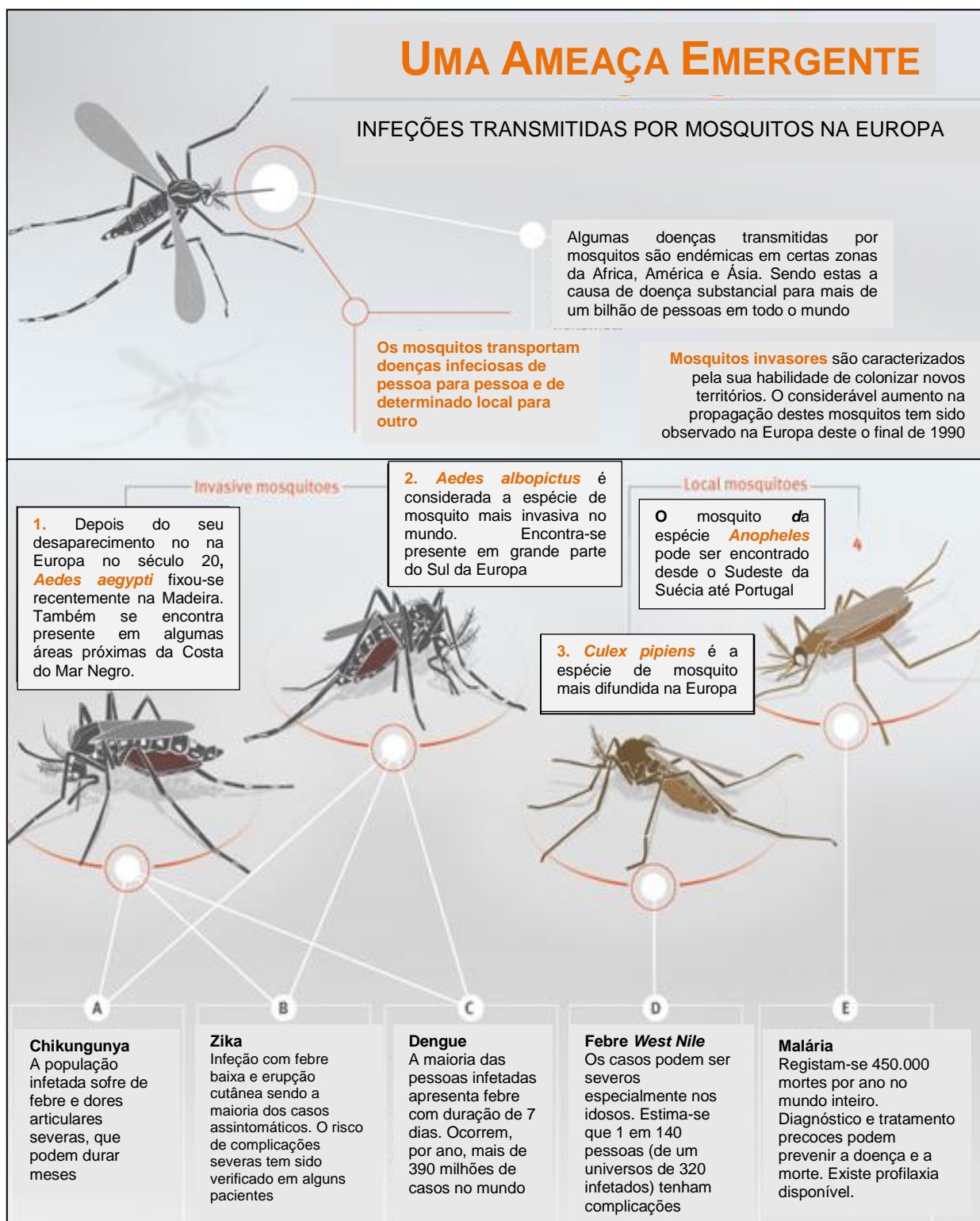


Figura 2 - Principais espécies de mosquitos transmissores de infeções presentes na Europa.

[Adaptado de: <http://ecdc.europa.eu/> (62)]

Em Portugal, a maior parte da investigação relacionada com as alterações climáticas tem sido desenvolvida no âmbito do Projeto SIAM (*Scenarios, Impacts and Adaptation Measures*), o qual tem como principal objetivo avaliar os possíveis impactes das AC e sugerir medidas de adaptação multisectoriais para Portugal. O projeto foi dividido em duas fases, uma que decorreu entre 1999 e 2002 e que teve orientação nacional, constituindo o primeiro estudo de um país do Sul da Europa onde se fez uma avaliação deste tipo e outra, de orientação regional que incluiu também as regiões Autónomas da Madeira e dos Açores e cujos resultados foram publicados em 2006. No Projeto SIAM foi analisado o impacte das AC nos diferentes sectores socioeconómicos e biofísicos de Portugal, nomeadamente, no da saúde. Neste sector, foram identificados em Portugal, com base em programas de controlo e de monitorização nacionais anteriores, cinco potenciais impactes das AC: aumento da mortalidade associada a ondas de calor, doenças associadas com a poluição do ar, doenças transmitidas por vetores e roedores, doenças transmitidas pela água e pela comida e efeitos associados com a ocorrência de cheias e secas. Inserido nos cenários climáticos previstos para o Sul da Europa, as projeções para Portugal indicam que, até ao final do século XXI, haja aumento da temperatura média em todas as regiões, aumento das temperaturas máximas de Verão, variando entre os 3°C nas regiões costeiras e os 7°C no Interior, e que haja incremento da frequência e intensidade de ondas de calor e da frequência de dias com precipitação intensa no Inverno. Face às condições previstas para Portugal, o risco para a saúde das populações pode ser severo. Deste modo, como medida de adaptação foi criado em 2004 um plano de contingência para as ondas de calor, articulado pelas instituições responsáveis pelas áreas da Meteorologia, Proteção Civil e Saúde (Portugal, Ministério da Saúde, Direcção-Geral da Saúde, 2007). (12)

Posteriormente é criado o Programa ENAAC – Estratégia Nacional de Adaptação às Alterações Climáticas, que estabelece os objetivos, as atividades e o modelo de organização e funcionamento da estratégia até 2020, tendo em vista um país adaptado aos efeitos das alterações climáticas, através da contínua implementação de soluções baseadas no conhecimento técnico-científico e em boas práticas. Para este efeito, propõe-se melhorar o nível de conhecimento sobre as alterações climáticas, promover a integração da adaptação às alterações climáticas nas diversas políticas públicas e instrumentos de operacionalização, colocando um maior ênfase na implementação de medidas de adaptação levadas a cabo em diversos sectores estratégicos que abragem para além da Saúde Humana, a Biodiversidade, os Recursos Hídricos e Agricultura, Florestas e Pescas, entre outros. (67)

## A. CARATERIZAÇÃO E TAXONOMIA DOS CULICÍDEOS

Os mosquitos são dípteros nematóceros com 3-6 mm de comprimento em média, delgados, com patas longas e finas, corpo com escamas mais ou menos abundantes. A cabeça é pequena e esférica, com olhos reniformes e dicóticos, compostos por 350 a 500 omatídeos, e sem ocelos. Possuem um 165efalorra longo e flexível, adaptado, nas fêmeas, à perfuração dos tegumentos, e palpos constituídos por cinco segmentos, antenas com um flagelo longo, de 13 artículos, apresentando dimorfismo sexual, sendo plumosas, em regra, nos machos e pilosas nas fêmeas. O tórax apresenta três pares de patas, dois orifícios respiratórios ou espiráculos, um par de asas membranosas compridas e estreitas, com nervuras cobertas de escamas e uma franja de escamas estreitas ao longo do bordo posterior, e um segundo par de asas modificadas, os halteres. O abdómen é longo e delgado, com oito segmentos visíveis e na sua extremidade encontram-se os orifícios genital e anal, rodeados de estruturas mais ou menos complexas as genitálias, sendo a masculina saliente e de importância para a sistemática. (17)

Os mosquitos, família *Culicidae*, compreendem um *táxon* monofilético, pertencentes à ordem Diptera. Esta família representa um grande e abundante grupo que ocorre em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo, e muito para além do Círculo Ártico. (19) Os mosquitos são insetos dípteros, responsáveis pela transmissão de vários agentes patogénicos à espécie humana, causadores de doenças de transmissão vetorial de que se destacam a malária, as filarioses linfáticas e outras, e várias arboviroses entre as quais a febre-amarela e o dengue. (17) Atualmente estão formalmente reconhecidas cerca de 3.490 espécies de culicídeos, classificados em duas subfamílias incluídas na família *Culicidae*: subfamílias *Anophelinae* e *Culicinae*, às quais pertencem as espécies com maior importância em Saúde Pública. (19) A sistemática dos mosquitos é complexa e tem sido continuamente sujeita a revisões que incluem a adição de novos taxa e a modificação e/ ou remoção de outros desde o início das primeiras revisões taxonómicas. (4)

Os membros da família *Culicidae* são reconhecíveis porque, além das características de dípteros nematóceros, apresentam escamas ao longo das veias das asas; franja de escamas bem evidentes, na margem posterior das asas; pernas longas e finas e probóscida longa. Os *Culicidae* classificam-se em 3 subfamílias:

- *Anophelinae*
- *Culicinae*

- *Toxorhynchitinae*

Nas duas primeiras as probóscidas são longas e retas, ou quase. As peças bucais estão adaptadas para picar e sugar. Os *Toxorhynchitinae*, de belas cores metálicas, têm a probóscida muito longa e recurvada para baixo e para trás. Não são hematófagos, razão pela qual não interessam à medicina. A distinção entre anofelinos e os demais *culicidae* é muito fácil:

A – culicíneos põem ovos sem flutuadores, aglutinados ou não; anofelinos põem ovos com flutuadores e isolados;

B – as larvas de culicíneos respiram por um sifão e ficam oblíquas em relação à superfície da água; os anofelinos, sem sifão, permanecem horizontalmente;

C – as pupas pouco se distinguem. (18)

Os mosquitos adultos partilham a característica da maioria dos insetos da ordem Diptera em terem um único par de asas e serem relativamente bons voadores. Os machos não se alimentam de sangue, sendo a sua probóscide (aparelho bucal) adaptada à alimentação de néctares ou de produtos resultantes da fermentação de frutos. São normalmente mais pequenos que as fêmeas da mesma espécie e têm os palpos maxilares mais longos e plumosos (20). Por outro lado, as fêmeas adultas de mosquito têm um poder penetrante e de sucção ao nível bucal adaptado para absorver o sangue dos animais vertebrados, efetuando deste modo refeições sanguíneas, o que explica a sua importância como vetor de infeção. Esta capacidade de realizar refeições sanguíneas dos mosquitos está documentada desde a Era Mesozóica (cerca de 1000 milhões de anos atrás). Tal noção é suportada pelo facto de que certas espécies de mosquitos se alimentam de animais de sangue frio e não possuem certos recetores sensoriais encontrados em espécies que se alimentam de aves e mamíferos. Tendo em conta esta associação entre seres humanos e mosquitos é notável que a compreensão do papel que os mosquitos desempenham na transmissão de patologias aos seres humanos tenha sido apenas desenvolvida na última parte do século XIX. O primeiro agente patogénico descoberto (em 1876 por Patrick Manson), transmitido por mosquitos, foi a filária *Wuchereria bancrofti* (Nemátodo), que causa a doença humana designada de Filariose Linfática. (21)

## B. BIOECOLOGIA E CICLO DE VIDA DOS MOSQUITOS

Tal como os outros dípteros, os mosquitos são insetos holometabólicos, exibem metamorfoses completas passando pelos estádios de ovo, larva e pupa que são anatomicamente diferentes do inseto adulto, têm outro tipo de alimentação e ocupam habitats diferentes. Os ovos são colocados isoladamente (anofelíneos e culicíneos) ou agrupados (culicíneos) e flutuam devido à tensão superficial da água (culicíneos) ou à presença de flutuadores laterais no ovo (anofelíneos). (4)

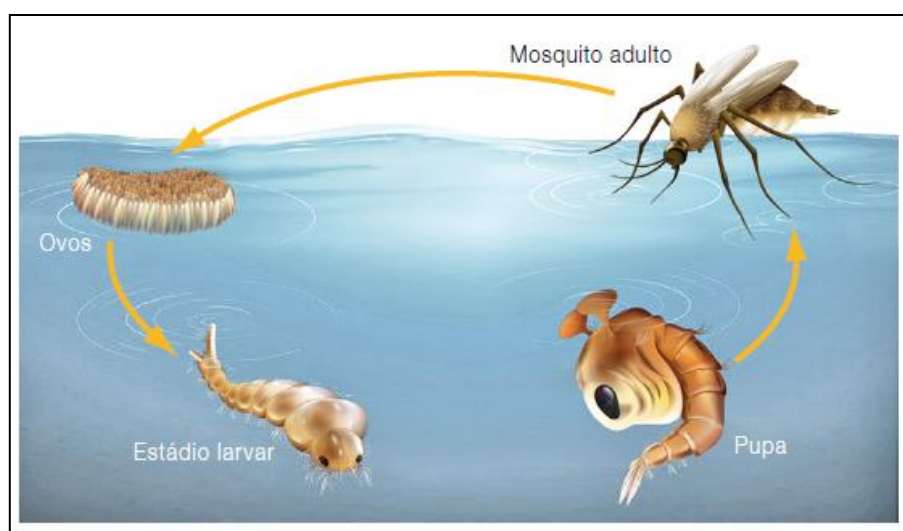


Figura 3 - Representações das diferentes fases do Ciclo de Vida do Mosquito

[Adaptado de: Alves, Maria João *et al*, Relatório REVIVE 2016, Culicídeos e Ixodídeos, CEVDI/INSA, 2017 (64)]

Após eclodirem do ovo as larvas estão perfeitamente adaptadas à vida aquática. Duas características principais determinam o seu modo de vida: o uso de oxigénio atmosférico na respiração e a alimentação de partículas orgânicas em suspensão ou no sedimento do sistema aquático. Relativamente à primeira, esta exige uma dependência quase permanente com a superfície da água, onde se estabelecem as trocas gasosas. O tempo necessário para o desenvolvimento completo da larva depende de vários fatores, sendo a temperatura da água e a disponibilidade de alimentos os mais importantes. Na pupa a função das trocas gasosas é assegurada por duas largas trompetas respiratórias no cefalotórax. Neste estágio de desenvolvimento o inseto não se alimenta e há substituição de vários órgãos da larva por órgãos do inseto adulto. A eclosão do adulto pode dar-se em um ou dois dias caso a temperatura seja favorável.

Quando o mosquito adulto está formado a pressão interna no interior da cutícula da pupa aumenta e o inseto lentamente se expande para fora da cutícula. Em condições naturais os mosquitos machos são os primeiros a emergir. O acasalamento acontece perto do criadouro das formas imaturas após eclosão das fêmeas, caracterizando-se muitas espécies pela formação de enxames compostos por dezenas a milhares de indivíduos sobre o criadouro. Em Portugal, foram registadas 40 espécies de mosquitos, 10 de *Anophelidae* e 30 de *Culicidae*, algumas das quais são vetores competentes de vários arbovírus. Além disso, Portugal é considerado um país de alto risco para a introdução de *Aedes albopictus*, um dos mosquitos vetores mais poderosos da dengue e de vários outros arbovírus (17).

## VI. O VÍRUS WEST NILE

### A. AÇÃO PATOGENICA DOS VÍRUS EM GERAL

Os vírus diferem dos restantes microrganismos por serem metabolicamente inertes, o que os torna incapazes de, por si só, se reproduzirem, fazendo-o apenas no interior da célula hospedeira, utilizando para esse fim, a maquinaria metabólica da célula. Este facto faz com que sejam, sempre, parasitas intracelulares obrigatórios. De todos os agentes vivos infecciosos, os vírus são os mais pequenos. Contêm apenas um tipo de ácido nucleico no seu genoma, que está contido numa cápside, por sua vez circundada ou não por um invólucro. Esta partícula interna infecciosa, inteira, denomina-se virião. A classificação dos vírus pode ser feita com base nas suas múltiplas propriedades morfológicas, físico-químicas, genética, proteicas, antigénicas, biológicas e quanto à organização das cadeias de ácido nucleico. De acordo com as características estruturais gerais, os vírus são agrupados em dois grandes grupos:

- **Vírus nus** – desprovidos de invólucro, com cápside icosaédrica, habitualmente mais resistentes às agressões por agentes físicos ou químicos, incluindo os desinfetantes. Quando eliminados na natureza mantêm o seu poder virulento (patogénico) por longos períodos. Como exemplo de vírus deste grupo é possível apontar os *Enterovírus*, os *Reovírus* e os *Adenovírus*;
- **Vírus com invólucro** – mais frágeis, são incapazes de sobreviver no meio ambiente por longos períodos de tempo, quando eliminados na natureza. São exemplo deste grupo os *Herpesvírus*, os vírus da gripe e do sarampo, entre outros.

De acordo com o seu genoma, os vírus agrupam-se em vírus ARN e vírus ADN, em ambos os casos podendo ser de cadeia simples ou dupla. Os vírus ARN replicam o seu material genético, maioritariamente, no citoplasma das células e, na sua maioria, exercem o efeito patogénico de forma direta, vírus citopáticos diretos, provocando lise da célula por agressão direta da membrana celular. Os vírus de ADN têm, necessariamente, de penetrar o núcleo da célula e usar a polimerase do ADN da célula hospedeira para a sua replicação. É possível descrever, pelo menos, três mecanismos distintos de interação do vírus com a célula permissiva à infeção, por estes agentes vivos. Os vírus podem infetar a célula, replicar-se no seu interior e provocar a sua lise, aquando da libertação das novas partículas virais, resultando numa infeção produtiva que é, geralmente autolimitada.

Nesta podem surgir alterações celulares visíveis ao microscópio designadas por efeito citopatogénico (ECP), como os corpos de inclusão (aglomerados de viriões presentes no núcleo ou no citoplasma), ou outras alterações produzidas durante o ciclo replicativo, com arredondamento e aumento do volume das células – balonização celular. Podem surgir, igualmente, alterações da permeabilidade das diversas membranas celulares e, em certas circunstâncias, podem formar sincícios. Estes resultam da fusão das membranas citoplasmáticas, de diversas células próximas, originalmente células gigantes que partilham vários núcleos. A fusão celular facilita a difusão e a propagação dos vírus entre as células que, nestas condições, conseguem escapar à ação “neutralizante” defensiva dos anticorpos, presentes no meio extracelular. (22)

Os vírus podem infetar a célula sem completar o ciclo de replicação. Neste caso, a infeção é designada de abortiva ou não produtiva. A infeção não progride porque não existem, na célula, os recetores adequados – célula resistente à infeção – ou porque, apesar de conseguirem penetrar na célula, que embora sensível, não é permissiva à multiplicação do vírus. Tal pode ser devido, apenas e só, à ausência de uma enzima celular, sem a qual a replicação viral pode ser interrompida em qualquer etapa. A infeção pode também desencadear mecanismos de defesa celular, com produção de interferões ou outras citocinas, ou por ação de complexos de defesa humoral, acionados pelo hospedeiro. Por fim, a infeção pode ser abortiva porque o vírus sofreu mutações, que interferem com o seu ciclo de vida que é interrompido. Os vírus podem ainda infetar as células e permanecer no seu interior, por longos períodos, alterando-as ou mesmo transformando-as e, nalguns casos, tornando-as malignas. Neste caso, é designada infeção persistente. Nesta, o vírus mantém-se na célula longos períodos mais ou menos longos, nalguns casos, por toda a vida do hospedeiro. Este tipo de infeção pode ser latente, mais comum quando causada por vírus ADN. Nestas, o vírus persiste oculto, num estado não infeccioso, estando presente apenas na forma do seu genoma, com expressão ocasional e muito limitada de genes, nunca havendo síntese proteica. Algumas destas infeções são recorrentes. Neste caso, verifica-se o reaparecimento periódico do vírus reativado e da sintomatologia correspondente, geralmente mais atenuada do que aquela que acompanhou a infeção aguda inicial. Diversos estímulos, alguns identificados outros não, podem reativar os vírus que se encontram em estado latente ou dormente, levando-as a adquirir novamente características infecciosas produtivas.

A infeção persistente pode ser crónica, caracterizando-se pela possibilidade de se detetar sempre o vírus nas células infetadas do hospedeiro. Trata-se de um fenómeno complexo, envolvendo diversos fatores relacionados com o hospedeiro (idade e estado imunitário do indivíduo infetado) e/ou com o vírus.

Este pode sofrer mutações que diminuem a sua virulência, a sua capacidade de replicação e propriedades antigénicas, o que lhe permite uma fuga fácil à vigilância imunitária do hospedeiro. Deste modo, permanecem, por tampo indefinido, no organismo. Outras vezes, a infeção persistente pode originar na célula alterações profundas, na sua biologia, sendo, por isso, designada de transformante. Pode ainda ocorrer a incorporação do ácido nucleico viral no genoma da célula hospedeira. Este será replicado com o ADN da célula, sempre que esta completar um ciclo de divisão normal. Este ácido nucleico, estranho, pode promover a transformação maligna da célula infetada. (22)

## **B. CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS WEST NILE**

O vírus *West Nile* (WNV) é um Flavivírus transmitido por mosquitos e é o agente etiológico de febre e de doença neuroinvasiva. À semelhança dos outros Flavivírus, o virião de WNV é esférico, com 40 a 60 nm de diâmetro. O genoma, de ARN monocatenário de polaridade positiva, é envolvido por uma nucleocápside com simetria icosaédrica, rodeado por membrana e invólucro em bi-camada lipídica, com origem na célula hospedeira. São reconhecidas estirpes de duas linhagens genéticas, nomeadamente a linhagem 1 detetada na Europa, América do Norte, Ásia, África e Austrália e a linhagem 2 identificada na África subsaariana e Madagáscar. O vírus WN mantém-se na natureza em ciclos enzoóticos que envolvem mosquitos ornitofílicos, como vetores primários, e algumas espécies de aves como reservatório primário. Acidentalmente os mosquitos podem transmitir o vírus a equinos e humanos (2).

Como outros Flavivírus, o WNV tem um genoma de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb, contendo 10 genes flanqueados por 5' e 3' nas regiões não codificantes (NCR) sem cauda de poliadenilação na extremidade 3'. Os NCRs do genoma do WNV formam estruturas essenciais para a replicação viral. (23) As regiões não codificantes localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma do WNV contêm estruturas de ARN secundárias conservadas que desempenham um papel importante não só na replicação do genoma, mas também no reforço da tradução de proteínas. O NR 5' pode atuar como um molde para o reconhecimento pela enzima responsável pelas reações de metilação necessárias para a montagem da capsula do vírus. O NR 3' pode funcionar como um local de interação para a montagem do complexo de replicação e para o início da síntese de ARN de sentido negativo. (9) Estruturalmente o vírus WNV surge como uma partícula icosaédrica de ~ 50nm, cercada por uma bicamada lipídica. A nucleocápside é composta pela proteína C, que se associa com o genoma do RNA e medeia a montagem viral. Os heterodímeros da proteína prM e da proteína E tornam-se a bicamada lipídica do vírus durante tal montagem e são expostas na superfície do virião. A proteína PrM tem como objetivo proteger o virião imaturo de sofrer fusão prematura antes da transformação viral a partir da superfície celular por bloqueio do ciclo de fusão de E, sendo clivado durante o processo de maturação viral. Durante a infeção, são produzidas partículas de vírus maduras, imaturas e parcialmente maduras, contendo um número variável de moléculas de proteína prM imaturas na superfície. A proteína E medeia tanto a ligação do recetor à superfície celular para a entrada e fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira. (23)

A poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos é clivada em dez proteínas por 173efalorra celulares e virais. Três destas proteínas são os componentes estruturais necessários para a formação do virião (proteína da cápside ver) e montagem em partículas virais (pré-membrana (prM) e proteínas de envoltório(E)). As outras sete proteínas virais são proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e são todas necessárias para a replicação do genoma. A proteína NS3 contém uma helicase dependente de ATP, e em conjunto com a proteína NS2B, uma s173efalorrotease, a qual é necessária para o processamento da poliproteína do vírus. A NS5 é uma metiltransferase e RNA-polimerase dependente de ARN (NS5). As outras proteínas não estruturais (NS) são proteínas pequenas, geralmente hidrofóbicas, de funções díspares. A NS1 é uma glicoproteína secretada implicada na evasão imune, sendo que a NS2A desempenha um papel na montagem do vírus, bem como inibição da ativação do promotor IFN- $\beta$ . A NS4A é responsável por uma rápida expansão e modificação do retículo endoplasmático (RE) que ajuda a estabelecer domínios de replicação. Por último, a NS4B bloqueia a resposta do IFN. Denota-se assim que todas as proteínas NS revelam ser necessárias para uma replicação eficiente. (24)

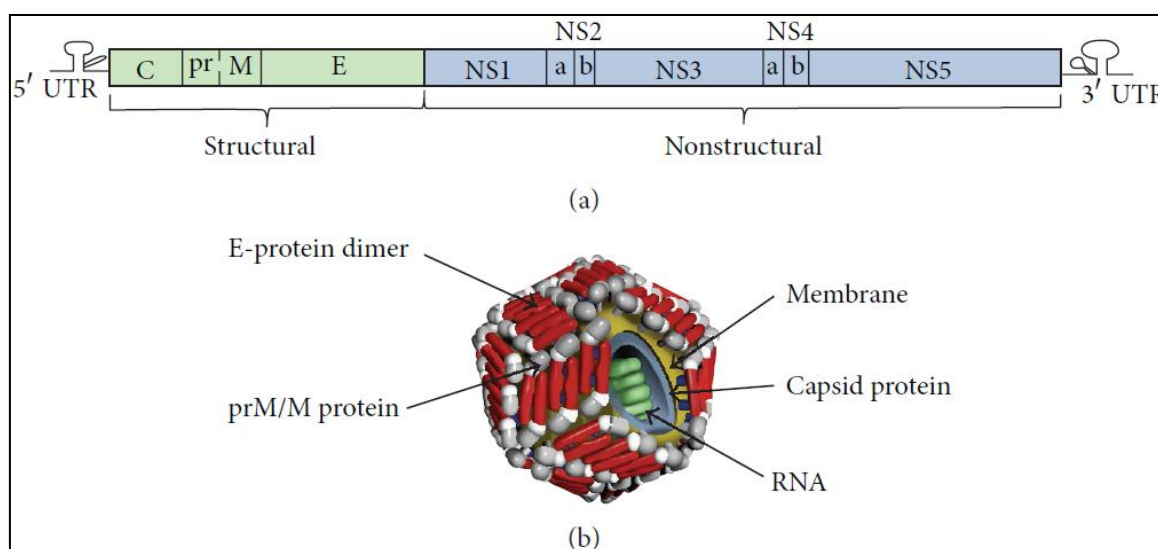


Figura 4 - Genoma Viral e Estrutura do Virião de WNV

(a) o genoma viral é representado com uma ORF codificadora de 3 células estruturais e 7 proteínas não-estruturais. As UTR 5' e 3' são indicadas. As proteínas estruturais são representadas pela cor verde e as proteínas não estruturais são representadas pela cor azul. (b) Estrutura do virião de WNV

[Adaptado de: Chancey, Caren *et al*, Artigo Revisão, The Global Ecology and Epidemiology of *West Nile* Virus, 2014 (23)]

Tipicamente, a RNA-polimerase dependente de ARN liga-se a um ciclo de haste no NCR 5', conseqüentemente, a ciclização permite a interação da polimerase com a extremidade 3', facilitando a síntese da cadeia de ARN negativo. No entanto, o equilíbrio entre formas circulares e lineares do genoma viral intracelular é essencial para a replicação eficaz do ARN e a modulação do início da tradução.

O modelo atual para a síntese de ARN negativo de WNV inclui a ligação da proteína NS5 na extremidade 5' do genoma de ARN positivo viral e a deslocalização da polimerase para o local de iniciação 3' após as interações RNA-ARN mediarem a ciclização do genoma a longa distância (9).

A entrada do vírus na célula hospedeira é feita através de endocitose e medida pelo receptor após a ligação deste à superfície da célula. Várias moléculas têm sido implicadas como receptores para o vírus WN, incluindo DC-SIGN, receptor de manose, e vários glicosaminoglicanos. O endossoma contendo o vírus amadurece durante a internalização a partir da superfície celular, com o pH caindo de neutro para ligeiramente ácido no endossoma precoce e tornando-se mais ácido durante a maturação ao endossoma tardio. Dentro do endossoma, a proteína de envoltório sofrerá uma alteração conformacional resultando na fusão da membrana lipídica viral com a membrana endocítica e a libertação do genoma de ARN viral no citoplasma celular. Após a dissociação da cápside, o genoma do ARN é replicado e a montagem do vírus é iniciada seguindo princípios bem delineados. A poliproteína viral é traduzida e processada nas membranas intracelulares, resultando na expressão das 10 proteínas virais. O ARN viral original é replicado por proteínas virais e celulares em múltiplas cópias para ser utilizado na produção de novos viriões. As proteínas estruturais reúnem-se nas membranas do retículo endoplasmático, associam-se à nucleocápside e incorporam-se no citoplasma através da rede de Golgi. O vírus migra então para a superfície celular através da vesícula exocítica e amadurece à medida que enzimas celulares clivam o prM, resultando na libertação de vírus maduros a partir da superfície celular. Recentemente tem surgido interesse pelo papel das partículas de Flavivírus parcialmente ou totalmente imaturas durante a infeção. Estas partículas de Flavivírus imaturos formam-se quando há clivagem ineficiente da proteína prM da superfície do virião durante a maturação e crescimento. A presença de partículas de Flavivírus imaturos ou parcialmente maduros de WNV têm sido reveladas em cerca de 40% do total da população de vírus numa dada infeção. Embora as partículas virais tenham sido tradicionalmente consideradas não infecciosas, vários estudos recentes têm mostrado que as partículas de WNV imaturas podem ser altamente imunogénicas e infecciosas *in vitro* e *in vivo* quando ligadas por anticorpos contra a proteína E ou prM. Estas partículas de vírus imaturas ligadas a anticorpos não neutralizantes entram em células imunes através do receptor Fc, resultando numa infeção produtiva. (25)

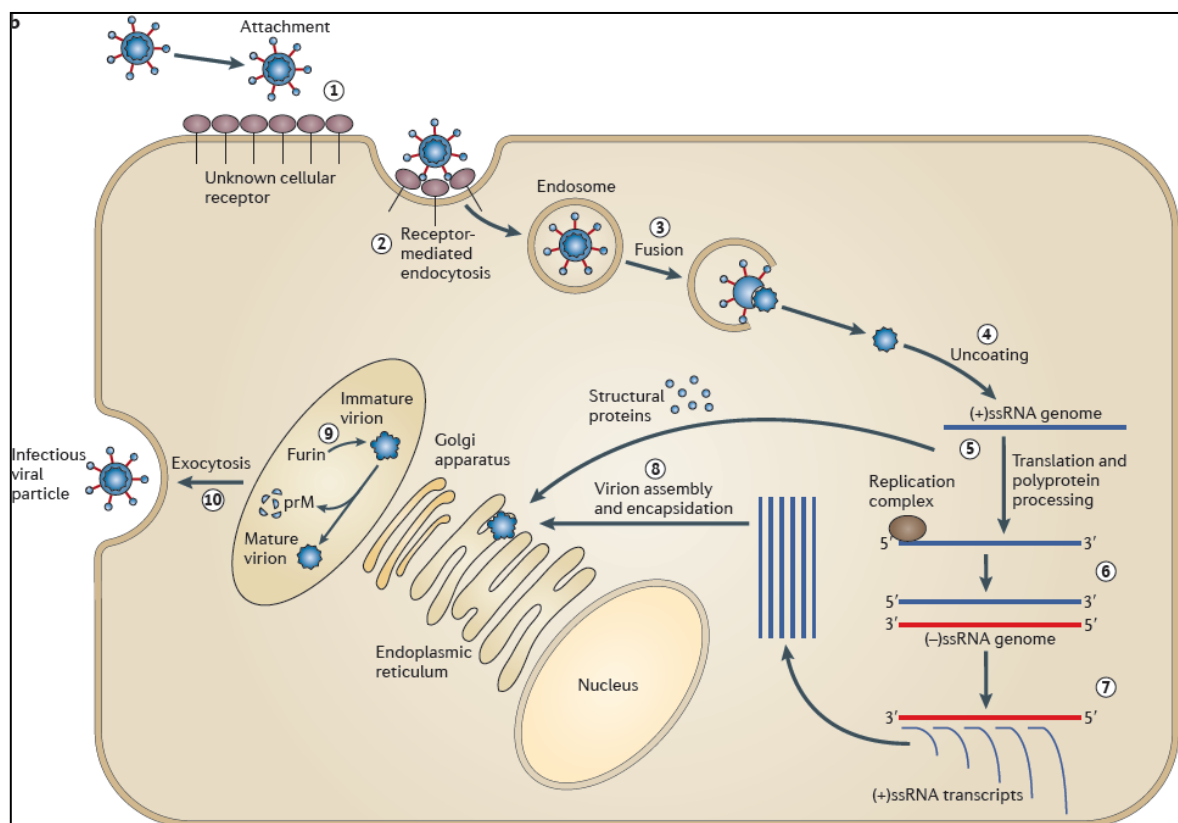


Figura 5 - Representação do ciclo de vida do vírus *West Nile* no interior da célula do hospedeiro

[Adaptado de: Suthar, Mehul S. *et al*, *West Nile virus infection and immunity*, Nature Reviews - Microbiology, 2013 (26)]

O WNV infecta uma vasta gama de células alvo, como já descrito. Na Figura 5 é possível verificar que a entrada de vírus é iniciada depois da ligação da proteína de envoltório, E, com um receptor celular desconhecido (ou receptores) (passo 1), seguida por endocitose mediada pelo receptor do vírus (passo 2). O ambiente de pH baixo dentro da vesícula endossomal desencadeia a fusão viral com a membrana endossomal (etapa 3), levando ao não revestimento do virião e liberação do genoma do ARN de cadeia simples (+) ssRNA de sentido positivo viral para o citoplasma (passo 4). O ssRNA viral (+) é traduzido numa única poliproteína no retículo endoplasmático e clivado em proteínas maduras NS2B-NS3 (NS2B-NS3) e NS5A (NS5A) não celular estrutural da s175efalorrrotease vi175efalorrroteases celulares (passo 5). As proteínas NS, incluindo a RNA-polimerase NSN dependente de RNA viral, formam o complexo de replicação para a síntese de intermediários de RNA de sentido negativo de comprimento total ((-) ssRNA) (passo 6). Estes servem como moldes para a síntese de ssRNAs (+) de comprimento total (passo 7). A proteína da cápside viral, C, é responsável pelo encapsidamento do RNA genômico viral, com a montagem ocorrendo nas membranas RE (passo 8). Os viriões imaturos são transportados através da via secretiva do hospedeiro, resultando na glicosilação da proteína E viral e da clivagem mediada pela furina da célula hospedeira da proteína prM para a proteína de membrana madura M (passo 9). Os viriões maduros são transportados para a membrana plasmática e libertados por exocitose (passo 10). (26)

### C. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

*Em 14 de Setembro de 2015, os representantes das Autoridades de Saúde Nacionais de Portugal notificaram a OMS de um caso confirmado de infeção pelo vírus do Nilo Ocidental. O doente é um homem de 71 anos da cidade de Almancil (município de L-ulé) - Região do Algarve, Portugal, sem história recente de viagem. Em 20 de julho, ele foi hospitalizado com sintomas neurológicos. Após uma recuperação completa, em 4 de agosto, o paciente teve alta do hospital. A seroconversão (IgM e IgG) foi confirmada em duas amostras separadas de dias 7 e 19 de Agosto. A PCR em tempo real foi negativa na primeira amostra. Os testes de neutralização foram positivos para o WNV em amostras efetuadas em 14 de setembro. Embora a presença do WNV seja conhecida em Portugal, onde foram relatados três casos prováveis em humanos (dois em 2004 e um em 2010), este é o primeiro caso humano confirmado laboratorialmente que cumpre plenamente a definição de caso da União Europeia para o WNV.*

*(in Disease Outbreak News – World Health Organization, 17 September 2015) (27)*

O marco histórico da infeção por *West Nile* foi a sua introdução em Nova Iorque em 1999, quando causou mortalidade em aves de vida livre e de zoológicos e provocou doença em 67 pessoas, provocando a morte de 21. A partir daí o vírus disseminou-se rapidamente por praticamente todos os Estados norte-americanos, provocando infeção e doença em uma variedade de aves, mamíferos silvestres e domésticos (especialmente equinos) e também em humanos. Até junho de 2007, a infeção, com ou sem manifestações clínicas, já havia sido detetada em mais de 27.000 pessoas (1100 mortes) e havia causado doença em mais de 25.000 equinos. Concomitantemente com a sua difusão na direção oeste nos EUA, a infeção avançou na direção norte (Canadá) e também na direção sul (México, América Central e Caribe). Nos últimos anos, evidências serológicas e/ou virológicas indicam a presença da infeção em várias espécies de aves e mamíferos, silvestres e domésticos nestes países. O vírus foi identificado em casos de doença neurológica em equinos na Argentina em 2006, onde parece estar presente em aves nativas desde 2005. A rápida expansão da infeção na direção sul das Américas sugere que novas evidências serológicas e virológicas serão relatadas nos próximos anos nas Américas Central e do Sul. As condições ecológicas nestas regiões (clima, flora e fauna) são propícias para a introdução e manutenção do agente em ambientes silvestres, com exposição ocasional de animais domésticos e humanos, como tem ocorrido nos EUA. (1)

O vírus WN foi isolado pela primeira vez em 1937 no norte do Uganda, no distrito de *West Nile*, daí a origem do nome (65). A presença deste vírus na Europa, África, Ásia e Austrália é comum, e em algumas zonas tem estado associado à ocorrência de epidemias entre equídeos, a que se seguiram, quase sempre, episódios mais ou menos graves entre a população humana (29). No entanto, aquilo que parecia um agente patogénico "e"ótico" e com importância médica negligenciável, tornou-se objeto de considerações sérias depois de epidemias registadas na Roménia e Rússia e da sua introdução, ainda inexplicável, nos Estados Unidos, em 1999, onde ocorreram 16,000 casos de encefalites graves que levou à morte de mais de 660 pessoas. Após este surto, o vírus amplificou a sua gama de circulação em grande parte da região oriental dos Estados Unidos, o que intensificou a pesquisa sobre os sinais, sintomas e patogenia do vírus WN. (28)

Em Portugal, o vírus WN foi isolado de mosquitos da espécie *Anopheles maculipennis*, em 1969, na região sul, junto a algumas habitações da barragem do Roxo, Aljustrel, Alentejo (6). Nessa época, ocorria a atividade do vírus na periferia do Mediterrâneo, e é possível que se tenha criado um nicho ecológico ocasional naquela região, que entretanto acabou por desaparecer, sendo que a sua existência só seria detetada se surgissem casos de doença na espécie humana, ou então quando se observam casos de doenças em equídeos ou morte de aves. De facto, foram detetadas serologias humanas positivas, sem descrição de casos clínicos, assim como serologias positivas de aves (sem mortes) e serologias positivas em equídeos (com casos de encefalites equinas). Ainda assim, esta região requer alguma atenção, já que com a conclusão do grande lago artificial do Alqueva, criam-se condições para o estabelecimento de novos nichos ecológicos. (29)

Passados 35 anos, em 2004, surgiram dois casos de infeção por vírus WN em turistas irlandeses que se encontravam de férias no Algarve. Os doentes apresentaram sintomas de gripe e um deles desenvolveu sinais de encefalite leve tendo, posteriormente, recuperado bem. Nesse período e nessa região, foram isolados vírus, linhagem 1, em mosquitos *Cx. pipiens*, facto que demonstra os primeiros casos clínicos relatados de doença por vírus WN adquirida em Portugal. A partir daí, iniciou-se um intensivo reforço dos mecanismos de vigilância de vetores nesta região, incluindo a amostragem em soro de equídeos, a verificação de aumento de mortalidade em aves e a deteção de RNA viral de WN em mosquitos (2,30). Há que considerar que esta região é um biótopo migratório de aves que voam entre a África e a Europa e, portanto, pode ter ocorrido uma reintrodução do vírus por estripes existentes no sul da Europa e nos países africanos. (31)

Concomitantemente, a sequenciação completa do genoma de WN em estripes encontradas em Portugal é obrigatória para estabelecer relações filogenéticas com estripes isoladas provenientes de outras áreas europeias, Médio Oriente e África, contribuindo para a análise epidemiológica do vírus WN na bacia do Mediterrâneo. (2)

Na região de Setúbal, em 2010, um caso provável de infeção humana por vírus WN foi relatado tendo desencadeado uma intensiva pesquisa do vírus em cavalos daquela região. Uma vez que esses animais não saíram daquela região, confirmou-se serologicamente, assim como em dois casos de doença, a presença do vírus no distrito de Setúbal, no qual acresce a existência de uma zona húmida situada no estuário do rio Sado que serve de habitat a aves selvagens e onde existem condições propícias ao desenvolvimento de mosquitos, favorecendo a manutenção do vírus nesta área. (6,32)

No ano de 2015, um novo caso de infeção humana por vírus WN foi reportado em Portugal, novamente, no Algarve, sendo este o último reportado desde então nesta região. (2,32) O paciente residia numa área rural, com presença de mosquitos e onde existiam cavalos que se provaram posteriormente estando infetados, não tinha viajado para fora do país no último ano, nem foi vacinado contra Flavivírus. Desta vez, o doente apresentou sinais de doença neuroinvasiva, e os resultados da análise serológica efetuada confirmaram, por imunofluorescência, IgM específico para vírus WN (33,27). Assim, é possível constatar que a região do Algarve apresenta condições para a proliferação destas infeções já que, para além do turismo contribuir fortemente para a mobilidade de populações estrangeiras em determinadas épocas, dispõe de uma grande área costeira, sapais, ilhas, grutas e zonas húmidas ótimas para o habitat de aves, bem como para o desenvolvimento de mosquitos (34). Paralelamente, projeções sobre as alterações climáticas evidenciam que a região sul será bastante afetada pelos efeitos do aquecimento global, ocorrendo períodos húmidos mais curtos e mais intensos, seguidos de uma época quente e seca mais longa (17).

O European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) tem vindo a publicar atualizações semanais sobre a distribuição espacial de casos humanos de febre do vírus *West Nile* na União Europeia e países vizinhos no seu atlas *on-line*. O atlas abrange os casos autóctones de febre do *West Nile* notificadver na UE (tanto neuro-invasivos como não neuro-invasivos) que satisfazem os critérios laboratoriais descritos na definição do caso da União Europeia (Decisão 2008/426/CE da Comissão). Os mapas também incluem casos não importados de verra da UE. Todos os casos detverados na UE são comunicados ao TESSy através de um sistema de informação em tempo real implementado em 2014. (35)

Atualmente, e de acordo com a distribuição de casos de febre por vírus WN do ECDC, Portugal aparece no mapa dos casos reportados (Figura 6). Para além de Portugal, o país vizinho, Espanha, também é referenciado no panorama atual da infeção, sendo este um ponto relevante na vigilância de entrada de mosquitos pela fronteira.

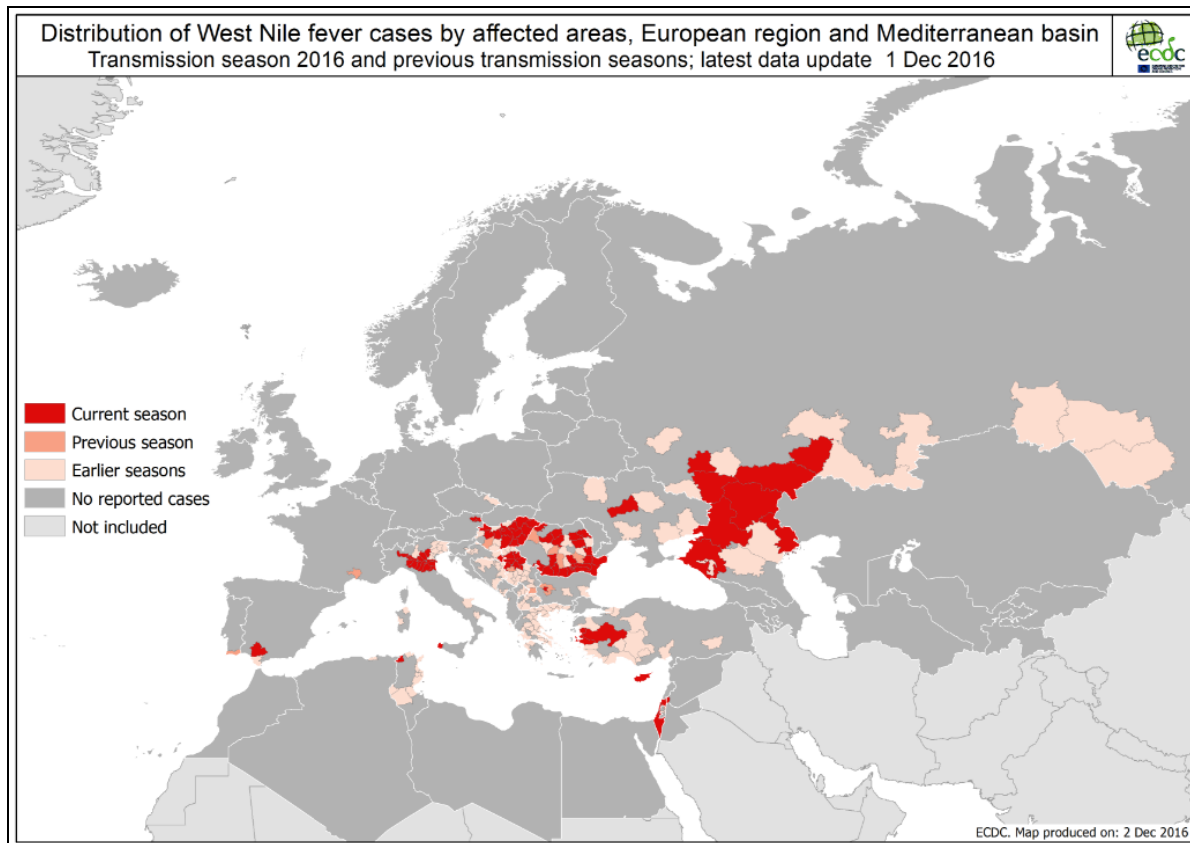


Figura 6 - Distribuição de casos de febre do vírus WN por áreas afetadas, Europa e Bacia do Mediterrâneo a 1 de Dezembro de 2016

[Adaptado de: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west\\_nile\\_fever/West-Nile-fever-maps/PublishingImages/ECDC\\_WNF\\_Affected\\_current\\_and\\_past\\_seasons.png](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/PublishingImages/ECDC_WNF_Affected_current_and_past_seasons.png) (36)]

Os países a vermelho referem-se aos casos ocorridos nesta época, e a rosa e salmão, os ocorridos em épocas passadas. Desde abril de 2009 que, por acordo de decisão da Comissão Europeia, a infeção por vírus WN é uma doença de notificação obrigatória, ao nível da Europa, reforçando, assim, a monitorização efetiva da infeção. (2)

As incidências determinadas e estimadas pela OMS demonstram o impacto dos mosquitos na saúde pública global e evidenciam a importância da entomologia médica aplicada ao estudo desta família de insetos.

## D. TRANSMISSÃO E PATOGÉNESE DO VÍRUS *WEST NILE*

O vírus *West Nile* é um dos vírus mais comumente transmitido aos seres humanos através de mosquitos vetores no Hemisfério Norte, especialmente pelo género *Culex*. Outras formas de transmissão também podem ser associadas, no entanto de forma mais rara (transfusão de sangue, transplante de órgãos, via vertical durante o parto e amamentação). Por outro lado é possível afirmar que o vírus *West Nile* não é transmitido:

- De pessoa para pessoa ou de animal para pessoa através de contato casual. As precauções e controlo de infeção veterinária perante uma suspeita de infeção por Vírus do Nilo Ocidental devem ser as mesmas de acordo com qualquer outra suspeita de infeção viral num animal.
- De manusear aves vivas ou mortas infetadas. Deve-se evitar o contato desprotegido ao manusear qualquer animal morto.
- Através do consumo de aves ou animais infetados. De acordo com a prática geral de saúde pública e devido ao risco de agentes patogénicos conhecidos transmitidos pelos alimentos, importa seguir sempre os procedimentos para cozinhar completamente carne de aves ou mamíferos em estabelecimentos de restauração e bebidas.

A amplificação do WNV na natureza ocorre em sincronia com o ciclo vital dos mosquitos, coincidindo com o período em que as fêmeas adultas se alimentam de sangue para efetuarem as posturas, que na maior parte do hemisfério norte corresponde ao intervalo entre Abril e Outubro. As aves migratórias, reservatórios competentes do WNV, podem proporcionar a dispersão do vírus a grandes distâncias, mesmo entre continentes, funcionando assim como agentes disseminadores. (20)

Estudos de campo realizados no início da Primavera demonstraram que áreas com mortalidade de aves devido a infeção por WNV vêm a sofrer subsequentemente transmissão enzoótica do vírus. No entanto, a maioria das aves infetadas por WNV sobrevivem, tal como foi revelado pela elevada seroprevalência em numerosas aves residentes em zonas de transmissão vírica intensa. O WNV tem sido transmitido principalmente através do mosquito *Culex spp*, no entanto, o facto de ser detetada a presença do vírus num mosquito não o torna necessariamente um vetor competente. O WNV é amplificado durante os períodos em que as fêmeas adultas necessitam de se alimentar de sangue para efetuar as suas posturas. Desenvolve-se assim um ciclo de transmissão contínua do WNV entre mosquitos vetores e aves hospedeiras que constituem reservatórios do vírus.

Os mosquitos infetados transportam o vírus nas glândulas salivares e infetam as aves mais suscetíveis durante a refeição de sangue. As aves reservatório competentes conservarão a virémia (vírus circulando na corrente sanguínea) durante um período de cerca de um mês. Os hospedeiros, 1-4 dias após a exposição, desenvolvem imunidade de longo prazo. É necessário que um número suficiente de vetores se alimente num hospedeiro infetado para assegurar que alguns sobrevivam até se alimentarem novamente noutro hospedeiro reservatório suscetível. Humanos, equinos, e a maioria dos outros mamíferos não desenvolvem a virémia infecciosa com frequência e muito provavelmente são hospedeiros finais ou acidentais. (37)

Para que o ciclo de transmissão de um arbovírus ocorra são necessários três elementos: o agente patogénico, o artrópode vetor e um hospedeiro vertebrado. A transmissão de arbovírus, pelo vetor ao vertebrado, pode ser: mecânica, quando o agente patogénico não se reproduz nem se desenvolve no vetor que apenas o transmite fisicamente, ou biológica, quando o agente patogénico se reproduz ou se desenvolve no artrópode vetor antes de ser transmitido ao vertebrado. Na transmissão biológica o período que decorre entre a ingestão de uma refeição de sangue infetado pelo vetor e a capacidade de transmissão é denominado período extrínseco de incubação. Durante este período, que normalmente demora entre uma a duas semanas em vetores dípteros, os arbovírus infetam e replicam-se nas células epiteliais do estômago. Os vírus dispersam-se depois para a hemolinfa, provavelmente através do sistema traqueal. Uma vez infetadas as glândulas salivares, os vírus passam para os ductos salivares e são transmitidos aos vertebrados durante a refeição sanguínea. (21)

Algumas aves infetadas podem desenvolver altos níveis de virémia na sua corrente sanguínea e os mosquitos podem ser infetados por picaressas aves igualmente infetadas. Após aproximadamente uma semana, os mosquitos infetados podem passar o vírus a mais aves quando picam estes animais. Os mosquitos infetados pelo vírus *West Nile* também mordem e infetam pessoas, cavalos e outros mamíferos. No entanto, os seres humanos, cavalos e outros mamíferos são hospedeiros finais, isto é, estes não desenvolvem altos níveis de vírus na sua corrente sanguínea, e portanto não podem transmitir o vírus a outros mosquitos aquando da picada. (38)

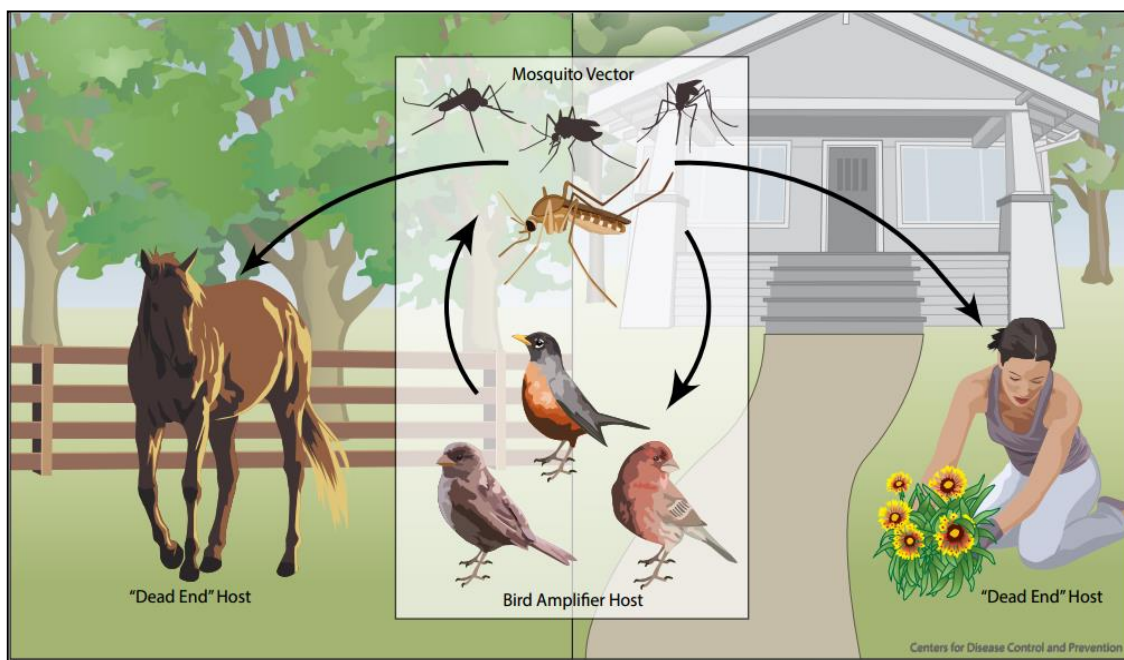


Figura 7 – Ciclo de Transmissão do Vírus West Nile

[Adaptado de: [https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13\\_240124\\_west\\_nile\\_lifecycle\\_birds\\_plainlanguage\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf) (38)]

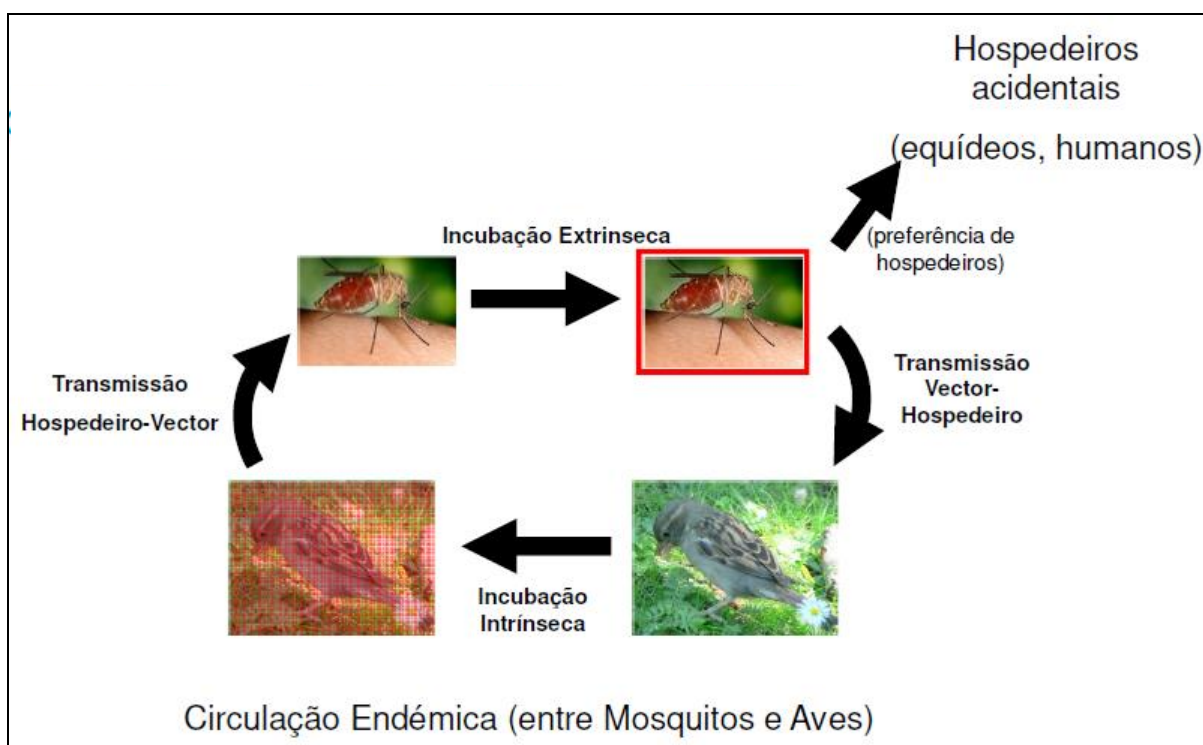


Figura 8 - Incubação extrínseca e intrínseca do vírus West Nile

[Adaptado de: Pinheiro, Carlos Alegria *et al*, Febre do Vírus do Nilo Ocidental, Apifarma Vet, Mirror Group Portugal, 2014 (39)]

### PROPAGAÇÃO DO VÍRUS DO WEST NILE NO MOSQUITO

O mosquito *Culex pipiens* está envolvido na circulação de vários arbovírus na natureza, nomeadamente o vírus *West Nile*, como já referido anteriormente. É a espécie nominal do complexo *pipiens*. É uma espécie paleártica, encontrando-se também nas sub-regiões este e sul-africana e na América do Norte e do Sul. *Culex pipiens* é extremamente comum em Portugal, estando abundantemente distribuído em todas as regiões. Apresenta elevada capacidade de adaptação ecológica. Os criadouros são coleções de água temporárias ou permanentes, apresentando-se muito poluídas e ricas em matéria orgânica ou límpidas. É uma espécie abundante durante o verão e outono, iniciando-se a atividade dos adultos na primavera. As fêmeas invernam abrigadas em interiores de habitações nos lugares mais escuros e em caves naturais. É uma espécie considerada primariamente ornitófila, embora esteja demonstrado que se alimente de outros vertebrados de sangue quente, incluindo humanos. (40)

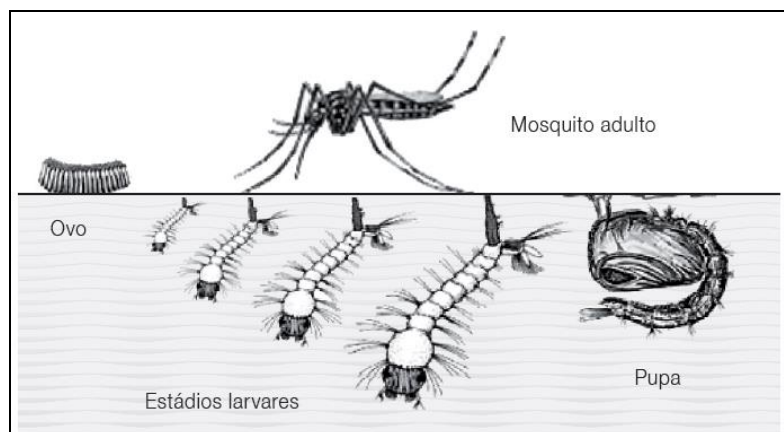


Figura 9 - Ciclo de Vida do Mosquito da espécie *Culex*

[Adaptado de: OsórioH. in Livro Doenças Associadas a Artrópodes Vetores e Roedores, INSA, 2014 (4)]

As fêmeas de *Culex spp.* adquirem o WNV enquanto se alimentam de aves infetadas com o vírus. O WNV reproduz-se nas células epiteliais do intestino médio do mosquito e espalha-se através da hemolinfa para as glândulas salivares e outros órgãos do hospedeiro. Um passo chave na transmissão do WNV e na competência dos vetores é a barreira do intestino médio, que atua como uma barreira física e imune através da produção de peptídeos antimicrobianos e uma matriz peritrófica (composta por quitina, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos) que limitam a replicação viral e a propagação dentro do inseto. Um estudo recente sugere que as lectinas de tipo C facilitam a disseminação do WNV em mosquitos. Uma proteína de lectina de tipo C secretada, mosGCTL-1, liga-se ao WNV e aumenta a ligação viral e a infeção através da interação com mosPTP-1, uma proteína de superfície de mosquito que é um homólogo de CD45 humano. O WNV liga-se ao mosGCTL-1 secretado na hemolinfa, facilitando assim a entrada viral e a invasão de diferentes tecidos de mosquito.

A infecção por WNV desencadeia respostas imunológicas inatas específicas dos invertebrados que podem restringir a infecção. Estas incluem RNAi (processo celular que ocorre em plantas e mamíferos para regular a expressão génica através da inibição ou da degradação das células mRNAs do hospedeiro); vias de sinalização imune inatas mediadas por Toll, deficiência imunitária (IMD) e proteínas JAK-STAT (transdutor de sinal de cinase de Janus e ativador da transcrição); e peptídeos antimicrobianos. Por outro lado, os mosquitos carregam *Wolbachia spp.*, que são espécies bacterianas simbióticas que inibem a replicação do WNV no inseto. Mecanicamente, *Wolbachia spp.* induz stress oxidativo (acumulação de espécies reativas de oxigénio que podem desencadear apoptose ou necrose) e espécies reativas de oxigénio em resposta à infecção por WNV, levando à ativação da via Toll e produção de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas e cecropinas, que inibem a replicação de Flavivírus. Durante a refeição, os mosquitos procuram dentro da pele por sangue e alimentam-se diretamente dos vasos ou sangue extravasado dos hospedeiros. Como parte desse processo, um mosquito injeta a saliva e as partículas virais que ela contém. Dependendo da espécie de mosquito, até 106 unidades formadoras de placas de vírus infeccioso podem ser administradas ao hospedeiro por picada. Além dos fatores virais que bloqueiam a resposta imunológica do hospedeiro, a saliva do mosquito contém moléculas que neutralizam a hemostasia, reduzem a inflamação e alteram a imunidade do hospedeiro. Num estudo efetuado, ratinhos inoculados intradermicamente com WNV subsequente à alimentação por mosquito *Culex spp.* apresentam cinética de infecção mais rápida, virémia aumentada e neuroinvasão acelerada em comparação com ratos inoculados com WNV mas não sujeitos a picadas de mosquito. A saliva do mosquito provoca desregulação das respostas imunológicas locais, incluindo alterações nos níveis de citocinas, levando à imunossupressão local e ao recrutamento reduzido de neutrófilos, células dendríticas e células T para o local primário de infecção. A grande maioria dos dados atuais sobre a patogénese do WNV resultou de modelos animais (principalmente roedores) infetados em condições controladas com uma quantidade conhecida de vírus inoculado com agulha, o que pode não refletir com precisão o curso de uma infecção natural nos seres humanos. (24)

Em modelos de infecção por roedores, o WNV é rotineiramente administrado através de uma inoculação de péptido subcutâneo como forma de modelar o vírus transmitido pelo mosquito, embora vários grupos tenham utilizado vias de administração intraperitoneal e intravenosa, que contornam as interfaces vírus-hospedeiro na pele e drenam o nódulo linfático. A fase inicial após a infecção subcutânea é definida pela replicação do WNV em queratinócitos e células detriticas residentes na pele, que podem incluir células detriticas dérmicas e células de Langerhans.

De seguida ocorre a amplificação viral dentro do nódulo linfático drenante, o que resulta em virémia e disseminação para órgãos viscerais, incluindo o baço, um local primário para a replicação viral em tecidos periféricos. As células alvo específicas para a infeção por WNV no baço e outros tecidos periféricos não estão bem definidas, mas pensa-se que são subconjuntos de DCs, macrófagos e possivelmente neutrófilos. A neuropatogénese do WNV depende da capacidade do vírus para entrar no SNC e propagar-se eficientemente dentro das células alvo, incluindo neurónio185efalorraas mielóides. O potencial neuroinvasivo é governado, em parte, por determinantes nas proteínas estruturais virais, e em particular por um glicano chave N-ligado no domínio I da proteína E. Não se sabe como esses determinantes medeiam a neuroinvasão, mas é possível que eles aumentam a ligação e penetração das células endoteliais, aumentando a infeção viral e a entrada no SNC. Outra possibilidade é que o WNV ganha entrada no SNC por meio da quebra da barreira hemato-encefálica. (26)

## E. FISIOPATOLOGIA DA INFEÇÃO

A patogénese do WNV em seres humanos está ainda pouco definida, mas excelentes modelos animais têm proporcionado suposições sobre os mecanismos que causam a doença WNV. (26) A capacidade do WNV de sobreviver e causar doença dentro do hospedeiro depende da sua capacidade de infetar células alvo e evitar o reconhecimento do sistema imunitário (Figura 10). Certos aspetos da biologia do WNV facilitam a capacidade deste causar infeção grave. O WNV infecta produtivamente diversas populações celulares de muitas espécies animais, sugerindo o uso de recetores múltiplos e/ou bem conservados. O tropismo relativamente diverso do WNV permite a replicação viral em vários tecidos dos hospedeiros animais e humanos e pode contribuir para o amplo espectro de manifestações clínicas. O WNV é citolítico e induz a apoptose numa variedade de células, incluindo os neurónios. Embora poucos estudos tenham investigado os mecanismos de morte celular induzida por WNV *in vivo*, as proteínas individuais de WNV podem contribuir para a citotoxicidade mediada por vírus. (41) Estudos *in vitro* revelam que o WNV é capaz de se replicar em vários tipos de células primárias e imortalizadas de uma grande variedade de hospedeiros, incluindo aves, mamíferos, anfíbios e espécies de insetos, como já referido. Esses achados sugerem que o WNV usa recetores altamente conservados, ou moléculas de entrada, para invadir células e passar de hospedeiro para hospedeiro. (9)

### DISSEMINAÇÃO VIRAL E PATOGÉNESE *IN VIVO*

Nos humanos, o vírus sofre um primeiro ciclo de replicação no local da picada de mosquito, infetando inicialmente as células dendríticas de Langerhans e depois viaja para os nódulos linfáticos drenantes. (9,41). As células dendríticas infetadas migram para a semente e drenagem linfonódulos, resultando em uma virémia primária e subsequente infeção de tecidos periféricos, como o baço e o rim. (41)

O tropismo de células virais dos hospedeiros atrai o virião para monócitos, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. A replicação em células mononucleares em nódulos linfáticos resulta numa virémia primária que é seguida pela infeção dos tecidos periféricos. Uma vez que o vírus entra na circulação, este é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e infetar os neurónios. A infeção por WNV é iniciada pela ligação dos viriões aos recetores celulares, que foram propostos para incluir glicosaminoglicanos (GAGs), c-tipo lectinas e integrinas.

As partículas virais são internalizadas em células hospedeiras através de vias dependentes de clatrina e são então transportadas através de compartimentos endossômicos. O WNV liga-se primeiramente à superfície da célula usando a glicoproteína do invólucro, que permite que o vírus incorpore a célula por um processo de endocitose mediado por um recetor. O baixo pH na vesícula endossomal desencadeia a fusão entre as membranas das células virais e das células hospedeiras através da reorganização estrutural da proteína E. A fusão ótima de WNV com lipossomas ocorre muito rapidamente a níveis de pH entre 6,3 e 6,9. A fusão membranar leva à libertação da nucleocápside e do ARN viral no citoplasma celular. (9).

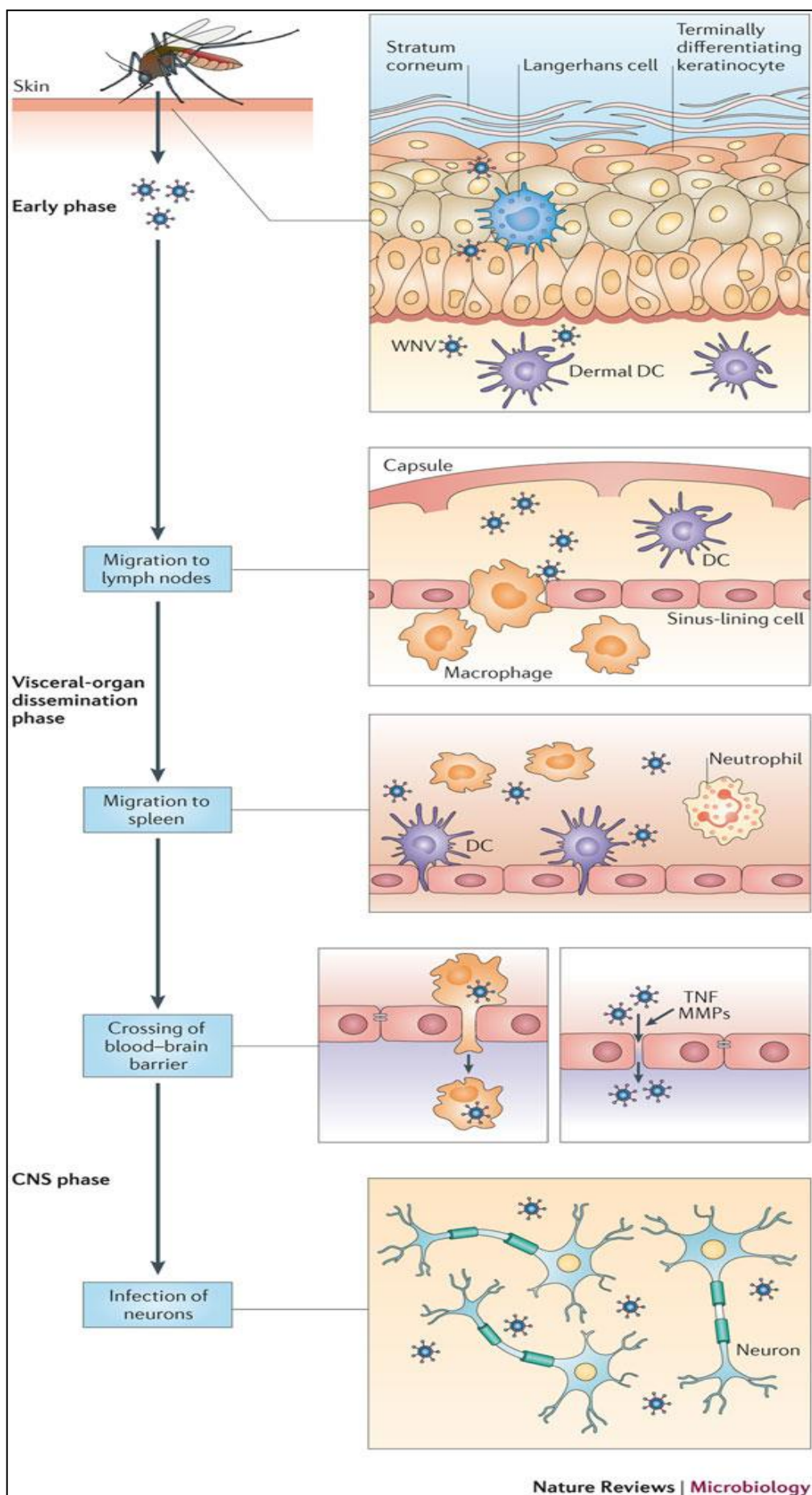


Figura 10 - Patogênese do Vírus West Nile em seres humanos

[Adaptado de: Suthar, Mehul S. et al, West Nile virus infection and immunity, Nature Reviews - Microbiology, 2013 (26)]

## F. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Uma vasta gama de vírus de diferentes famílias e em diferentes áreas geográficas pode causar alterações neuropatológicas imediatas ou tardias e manifestações neurológicas em seres humanos e animais. A infecção por vírus neurotrópicos, bem como a resposta imunológica resultante, pode perturbar irreversivelmente a estrutura estrutural e funcional complexa do sistema nervoso central, deixando frequentemente o doente ou o animal afetado com um prognóstico reservado ou fatal. (42)

O período de incubação do vírus do *West Nile*, embora não seja precisamente conhecido, varia provavelmente de 3 a 14 dias. A maioria das infecções humanas não são clinicamente aparentes. Um inquérito realizado durante a epidemia de 1999 na cidade de Nova Iorque indicou que cerca de 20% das pessoas infetadas com o vírus WN tinham desenvolvido a febre do Nilo Ocidental e apenas metade tinham visitado um médico para esta avaliar a doença. A frequência de vários sinais e sintomas associados à febre do Nilo Ocidental durante surtos recentes são mal definidas porque a vigilância tem-se concentrado essencialmente em pacientes com doença neurológica. Em surtos anteriores, a infecção foi descrita como uma doença febril de início súbito, muitas vezes acompanhada de mal-estar, anorexia, náuseas, vômitos, dor ocular, cefaleia, mialgia, erupção cutânea e linfadenopatia; estes sintomas geralmente duram de 3 a 6 dias.. Embora os surtos recentes de WNV parecem estar associados ao aumento da morbidade e mortalidade, a doença neurológica grave permanece incomum. Dois estudos serológicos realizados em Nova Iorque em 1999 e 2000 mostraram que aproximadamente 1 em cada 150 das infecções resultou em meningite ou encefalite, resultado consistente com uma sero-pesquisa romena de 1996 indicando que 1 em cada 140 a 320 infecções conduziu às mesmas doenças. A idade avançada é, de longe, o fator de risco mais importante para a doença neurológica grave após a infecção; o risco aumenta acentuadamente entre as indivíduos de 50 anos de idade ou mais. (43)

A compreensão de toda a gama de patogénese do WNV nos seres humanos tem sido difícil, principalmente devido à diferença de virulência entre as estirpes de WNV, à alta prevalência de infecções assintomáticas ou subclínicas e à relativa baixa frequência de infecções humanas confirmadas por laboratório. Pouco tem sido publicado sobre infecções humanas com WNV de virulência limitada.

A maioria dos casos clínicos de infecções por WN é pouco evidente e apresentam sintomas gripais, incluindo febre, dor de cabeça e dores no corpo. Podem também ser observadas fraqueza, mal-estar, anorexia, linfadenopatia, náuseas e vômitos.

Uma erupção cutânea eritematosa maculopapular ou morbiliforme ocasionalmente desenvolve-se no pescoço, tronco, braços ou pernas. A maioria das infecções não complicadas resolve-se em 3-6 dias. Em casos mais graves, pode haver sinais de encefalite, meningoencefalite ou meningite. Os sintomas podem incluir febre alta, dor de cabeça, rigidez do pescoço, estupor, desorientação, tremores, convulsões, fraqueza muscular grave, paralisia flácida e coma. Ataxia, anormalidades do nervo craniano, mielite, dor ocular, polirradiculite e convulsões também foram observadas. Em alguns surtos, ocorrem miocardite, pancreatite e hepatite fulminante. Estima-se que 1 em 140 a 320 infecções resulte em meningite ou encefalite. A taxa de letalidade em pacientes com doença neuro-invasiva varia de 4% a 14%; Pode chegar a 15-29% em pacientes com mais de 70 anos. Há evidências de que a doença concomitante, como diabetes ou imunossupressão, aumenta o risco de morte. Os doentes graves podem sofrer uma morbidade substancial a longo prazo após a recuperação; fadiga, perda de memória, dificuldade para andar, fraqueza muscular e depressão. (38)

Menos de 1% (cerca de 1/150) das pessoas infetadas pelo WNV apresentam Doença Neuroinvasiva (DNI), a qual se pode dividir genericamente em três entidades clínicas: Meningite, Encefalite e Paralisia Flácida Aguda. Algumas séries de casos apontam para que 35% de casos de DNI pelo WNV sejam de MNO, 55% de WNE, com a percentagem de casos de PFA a ocupar um subgrupo de cada uma das outras duas categorias, embora possa também ocorrer isoladamente em cerca de 10% dos doentes com DNI. Na prática pode ocorrer alguma sobreposição destas entidades. (44)

## G. TRATAMENTO CLÍNICO

Até à data, não existe fármacos comprovadamente eficazes *in vivo* no tratamento da infecção por WNV. O tratamento inclui medidas de suporte, muitas vezes em regime de internamento, com administração endovenosa de soros, correção eletrolítica, suporte ventilatório, quando indicado e prevenção das infecções secundárias, nomeadamente nosocomiais nos doentes internados. A administração de ribavirina, em elevadas doses, o interferão alfa 2b mostraram alguma atividade *in vitro* contra o WNV, mas não há estudos controlados que confirmem a eficácia destes fármacos, ou de outros (corticosteroides, imunoglobulinas, anticonvulsivantes, agentes osmóticos) no tratamento da encefalite por este vírus. (49)

## H. VACINA

As vacinas humanas para infecções por Flavivírus estão atualmente disponíveis apenas para a Febre-Amarela, encefalite japonesa e encefalite transmitida por carraças. Como as proteínas pré-membrana e de envoltório são altamente antigênicas e provocam respostas imunológicas fortes e duradouras, várias abordagens têm sido exploradas para fornecer essas Antígenos em animais para o desenvolvimento de vacinas.

A primeira abordagem baseia-se em vírus quiméricos<sup>1</sup> que fornecem antígenos do vírus do *West Nile*. A estirpe da vacina da febre-amarela 17D, que tem sido seguramente utilizada para imunização humana em larga escala há mais de 60 anos, é um excelente vetor para a libertação de antígenos protetores de Flavivírus. As vacinas quiméricas foram construídas substituindo a pré-membrana 17D da febre-amarela e os genes dos envoltórios com os genes correspondentes de outros Flavivírus, incluindo o vírus da encefalite japonesa, *Dengue*, e *West Nile*. Em ratos, a expressão dos genes pré-membrana e envoltório do vírus *West Nile*, através do vírus atenuado do sarampo, conferiu proteção contra uma dose letal de vírus *West Nile*. Entre estes candidatos à vacina, os vírus quiméricos de WNV e do vírus da febre-amarela e ainda do vírus da *Dengue* estão na fase I dos ensaios clínicos. Os resultados recentes dos ensaios clínicos mostraram que o vírus quimérico da febre-amarela provoca fortes respostas imunitárias sem efeitos adversos aparentes após uma única dose. Após inoculação de 30 adultos saudáveis com 105 unidades formadoras de placas ou 15 pessoas com 103 unidades formadoras de placas (n = 15) do vírus quimérico da febre-amarela-*West Nile*, todos os adultos desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o vírus e a maioria desenvolveu uma resposta específica das células T.

A segunda abordagem baseia-se na imunização de animais com proteínas virais recombinantes, vírus *West Nile* inativado ou ADN que expressa antígenos virais. O vírus inativado com formalina, um vetor recombinante do vírus do canário e um plasmídeo de ADN que expressa as proteínas da pré-membrana e do envoltório do vírus *West Nile* foram desenvolvidos e aprovados para utilização equina. Num modelo de *hamster*, os animais imunizados com 1 µg de proteína de envoltório recombinante foram completamente protegidos contra a exposição letal com o vírus *West Nile* durante pelo menos 6 meses. Nenhuma virémia ou doença clínica foi relatada e altos títulos de anticorpos neutralizantes virais foram obtidos. Estes resultados promissores justificam a avaliação adicional do envoltório recombinante como uma vacina candidata em macacos e seres humanos.

A terceira abordagem baseia-se em isolados do vírus do Nilo Ocidental atenuados.

---

<sup>1</sup> Que combinam genes de mais do que um vírus em uma vacina única (63)

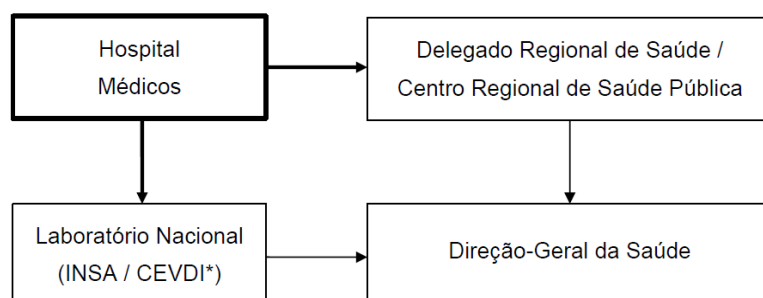
O vírus *Kunjin* é um subtipo do WNV naturalmente atenuado que poderia proporcionar imunidade protetora em ratos contra a estirpe virulenta do vírus *West Nile* de Nova Iorque. Uma estirpe atenuada não-epidémica do WNV (linhagem II) também mostrou ser uma vacina efetiva contra a estirpe epidémica virulenta (linhagem I) em camundongos. Para outros Flavivírus, a introdução de deleções na proteína da cápside do TBEV tem sido relatada como uma forma promissora de criar Flavivírus atenuados, ainda altamente imunogénicos. Deleções dentro do 3' não traduzida também demonstraram atenuar o vírus da dengue e o vírus da encefalite transmitida por carraças. Essas abordagens poderiam, alternativamente, ser usadas para o desenvolvimento de vacinas do WNV. (58)

## VII. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO VÍRUS WEST NILE

O diagnóstico de infeções pelo WNV deve basear-se principalmente na evidência clínica e nos dados laboratoriais obtidos a partir de procedimentos padronizados e controlados. O laboratório requer informações mínimas (como o aparecimento de sintomas, principais características clínicas e informações demográficas) para realizar os ensaios adequados de acordo com a fase clínica. Muitas vezes, o uso de vários ensaios é necessário para confirmar a deteção da infeção por WNV. Além disso, a diversidade e a evolução contínua das espécies circulantes requerem uma revisão regular dos ensaios moleculares aplicados. (45)

Os programas de vigilância ao nível da saúde pública responsáveis pela monitorização da atividade do WNV e pela implementação de intervenções eficazes contam com informações precisas sobre as infeções humanas e indicadores ambientais de risco, revelando-se uma mais-valia em termos de deteção de situações de risco e infeção por este vírus. Para serem bem-sucedidos, esses programas devem ser suportados por laboratórios de diagnóstico capazes de realizar a gama de testes exigida. Deste modo, foram desenvolvidos numerosos protocolos de testes serológicos e de deteção de vírus para diagnosticar infeções em casos humanos e permitir, igualmente, que programas de vigilância ambiental monitorizem a presença de WNV em mosquitos vetores e hospedeiros não vertebrados. (46)

Em Portugal e de acordo com a Circular Normativa da Direção-Geral da Saúde– n.º 16/DT - *Vigilância epidemiológica da infeção por vírus do West Nile*, emitida a 06/08/04, sempre que se identifique um caso suspeito o mesmo deve ser imediatamente comunicado ao Delegado Regional de Saúde da zona onde foi deteada a situação, através do sistema SARA, acompanhado de formulário epidemiológico próprio. Posteriormente, deverá ser providenciada a realização dos exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico, observando o fluxograma seguinte.



\*CEVDI – Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

De acordo com a Circular Normativa acima referida, o diagnóstico de infecção por vírus *West Nile* é baseado num elevado índice de suspeição e nos resultados dos exames laboratoriais específicos.

- Infecção por vírus *West Nile* ou outra infecção por arbovírus deve ser fortemente considerada em adultos com idade superior a 50 anos que desenvolvem encefalite ou meningite, por agente não identificado, no Verão ou no início do Outono.
- A presença de atividade enzoótica do vírus *West Nile* ou de outros casos humanos reforça o índice de suspeição clínica.
- A colheita de história detalhada de viagens e de deslocações internas é fundamental.

Podem ser considerados três tipos de caso de diagnóstico, de acordo com a seguinte definição preconizada pela Direção-Geral da Saúde:

- **Caso suspeito:** *qualquer pessoa da população alvo, internada ou não, que procure cuidados médicos por febre de início súbito e manifestações neurológicas sugestivas de encefalite ou de meningite, ou por febre com início súbito e qualquer manifestação neurológica aguda atípica, sem nenhuma causa identificada.*
- **Caso provável:** *qualquer caso suspeito que apresente anticorpos Ig M contra o vírus do Nilo Ocidental no soro, ou seroconversão ou aumento quatro vezes do título de anticorpos Ig G contra o vírus do Nilo Ocidental no soro em fase de convalescença.*
- **Caso confirmado:** *qualquer caso suspeito no qual tenha sido isolado o vírus do Nilo Ocidental, ou identificado antigénios ou sequências de nucleótidos daquele vírus, no soro ou no líquido, ou com identificação de anticorpos Ig M contra o vírus do Nilo Ocidental no líquido, ou com um aumento de quatro vezes no título de anticorpos neutralizantes contra o vírus do Nilo Ocidental, no soro ou no líquido, em duas colheitas efectuadas com intervalo de duas a três semanas, ou, ainda, título elevado de anticorpos Ig M e Ig G contra o vírus do Nilo Ocidental, no soro e confirmados por teste de neutralização na mesma amostra.*

(Circular Normativa da Direção-Geral da Saúde– n.º 16/DT - *Vigilância epidemiológica da infecção por vírus do West Nile*, emitida a 06/08/04, consultada em Maio 2017)

## **MÉTODOS DE DETECÇÃO LABORATORIAL DO WNV**

Os métodos de detecção laboratorial podem ser diretos, quando ocorre a identificação ou o isolamento do agente viral da amostra, ou indiretos, quando se baseiam na pesquisa de anticorpos específicos, representando frequentemente casos de infecções passadas, antigas ou recentes. Os primeiros usam métodos de biologia molecular para a detecção de ácidos nucleicos e métodos de cultura celular para o isolamento do agente. Uma vez detectado por RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) é tentado o isolamento em cultura celular (linhas celulares de mosquito ou de macaco). O isolamento permite o estudo aprofundado do agente a nível genético (sequenciação do genoma) e a identificação da estirpe a nível morfológico e estrutural (microscopia electrónica, proteómica e biologia molecular).

Os métodos de diagnóstico indireto abrangem principalmente as técnicas laboratoriais de Imunofluorescência Indireta (IFA), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), mas outras técnicas serológicas como EpB-ELISA (*Epitope-Blocking ELISA*), *Immunoblotting*, técnicas de Inibição da hemaglutinação e **neutralização de redução em placas (PRNT, *Plaque-Reduction Neutralizing Test*)**, também estão disponíveis para o diagnóstico de *West Nile*. (20)

Deste modo, o diagnóstico laboratorial direto de arbovírus pode ser efetuado pelo isolamento, a partir do tecido cerebral, sangue ou líquido cefalorraquidiano, do agente e detecção molecular do RNA viral (baseado em técnicas derivadas da reação da polimerase em cadeia [**PCR, RT-PCR e PCR quantitativo, em tempo real**]) ou pela detecção de antígeno viral no sangue. Um resultado positivo por diagnóstico direto permite a confirmação de caso, no entanto, face à evolução clínica destas infecções, e considerando o curto período de viremia (apenas cerca de 5 a 7 dias) esta abordagem só é adequada durante os primeiros dias após início dos sintomas. (45,47)

### a) Métodos de Diagnóstico em Humanos

#### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Na maioria dos pacientes, a infeção pelo WNV e muitos dos outros arbovírus que causam encefalite é clinicamente inaparente ou causa uma síndrome viral inespecífica. Numerosos agentes patogénicos causam encefalite, meningite asséptica e doença febril com sintomas clínicos e apresentações semelhantes às causadas pelo WNV e devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

O diagnóstico definitivo do WNV só pode ser feito através de testes laboratoriais utilizando reagentes específicos. A seleção dos procedimentos de teste de diagnóstico deve levar em consideração a faixa de agentes patogénicos no diagnóstico diferencial, os critérios para classificar um caso de WNV como confirmado ou provável, bem como a capacidade dos laboratórios de diagnóstico primário e de confirmação.

No caso dos humanos, os seguintes dados devem acompanhar os soros, LCR ou amostras de tecido para que os resultados sejam devidamente interpretados e relatados:

- 1) Data de início dos sintomas (quando conhecida);
- 2) Data da colheita da amostra;
- 3) Estado imunológico invulgar do indivíduo infetado (por exemplo, imunossupressão);
- 4) Local de residência;
- 5) História de viagem (especialmente em áreas endémicas de Flavivírus);
- 6) História de vacinação prévia (por exemplo, febre amarela, encefalite japonesa ou vírus da encefalite transmitida por carraça);
- 7) Resumo clínico breve incluindo diagnóstico clínico (por exemplo, encefalite, meningite asséptica).

No mínimo, são necessárias as datas de início e de colheita de amostras para realizar e interpretar os testes de rastreio iniciais. A informação restante é necessária para avaliar os espécimes positivos no rastreio inicial. Se possível, deve ser obtida uma amostra de soro de convalescença tomada pelo menos 14 dias após a amostra aguda para permitir a confirmação através de testes serológicos. (46)

Com base nos resultados do diagnóstico serológico e face a um contexto epidemiológico e clínico compatível, um caso de infeção ativa é definido por demonstração de seroconversão; ou aumento do título de anticorpos, de pelo menos quatro vezes, relativamente a duas amostras consecutivas com duas a quatro semanas de intervalo. Um título único, IgM positivo, pode também ser sugestivo de doença. Pela facilidade de execução e rapidez, a IFA surge como o método de eleição para o diagnóstico serológico, não sendo, todavia, como técnica de diagnóstico indireto isenta de dificuldades nomeadamente a nível da interpretação de resultados, devido à existência de reações cruzadas por infeções passadas com vírus semelhantes (destacando-se os Flavivírus) e/ou imunidade por vacinação com Flavivírus como Febre-amarela, Encefalite Japonesa e Encefalite Transmitida por Carraças. (4)

As amostras biológicas mais frequentemente analisadas são o sangue, soro e/ou LCR (no casos dos agentes de encefalites), sendo para diagnóstico molecular preferencial amostras de sangue total ou LCR manipuladas e transportadas em ambiente refrigerado, uma vez que sendo estes vírus de RNA, a garantia da qualidade da amostra e cuidados para prevenção da degradação evitam a obtenção de resultados falsos negativos. (4,46)

#### DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

A detecção específica de anticorpos continua a ser a abordagem mais utilizada para o diagnóstico da infecção por WNV em seres humanos. Para entender a aplicação da serologia para o diagnóstico do WNV é útil lembrar que os tempos médios da seroconversão IgM e IgG são de aproximadamente 4 e 8 dias respectivamente. A principal deficiência que limita a relevância clínica dos métodos serológicos é a ampla reatividade cruzada que existe entre todos os Flavivírus: a resposta do anticorpo neutralizante da proteína do invólucro viral bastante específica (E) é frequentemente combinada com testes menos específicos baseados na detecção de anticorpos contra a Membrana (M) e proteínas Não Estruturais (NS) das quais as sequências de aminoácidos são mais conservadas entre os Flavivírus. Com base nesta consideração. Os principais métodos serológicos podem ser subdivididos em dois grupos principais: o primeiro inclui os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs) e imunofluorescência (IF); o segundo inclui o Teste de Neutralização de Redução de Placa que pode ser realizado utilizando um ponto final de 90% altamente sensível a 50% ou menos sensível (PRNT50 e PRNT90, respectivamente), os quais requerem a disponibilidade constante de vírus infecciosos validados padronizados e culturas de células apropriadas. (45)

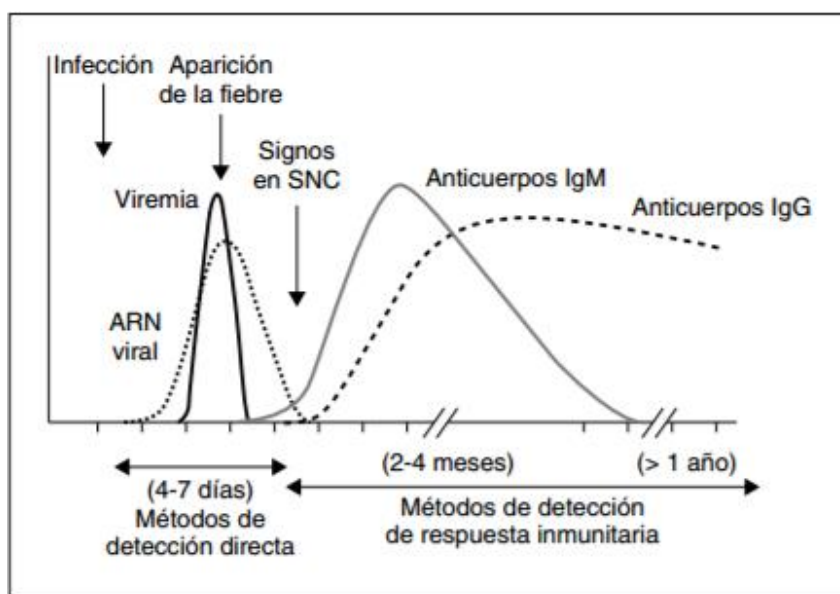


Figura 11 - Cinética de início de virémia e resposta imunológica a Arbovírus

[Adaptado de: Sánchez-Seco, Mari Paz et al, *Infecciones por el virus de Toscana, el virus del Nilo occidental y otros arbovirus de interés en Europa*, Enferm Infecc Microbiol Clin, 2005. (51)]

Por outro lado, os ensaios que detetam imunoglobulina M (IgM) específica são vantajosos porque detetam anticorpos produzidos durante os primeiros dias após o início de sintomas clínicos numa infecção primária, evidenciando a necessidade de amostras na fase de convalescência em muitos casos. A captura de IgM é a abordagem ideal para a detecção de IgM porque é simples, sensível e aplicável a amostras de LCR e de soro de uma variedade de espécies animais (ex. humanos, equinos, aves). O ensaio de imunoabsorção enzimática para captura de anticorpos de IgM (MAC-ELISA) fornece uma alternativa útil à imunofluorescência para documentação de uma resposta serológica. O anti-IgM (o anticorpo de captura) é revestido em placas de 96 poços. Isso é seguido sequencialmente pela adição do soro do paciente e, a seguir, do antígeno viral não infeccioso. A presença de antígeno é detetada usando anticorpo antiviral conjugado enzimático. Um resultado colorimétrico é gerado pela interação da enzima e um substrato cromogénico. Essa alteração colorimétrica é detetada por um espectrofotómetro (leitor de ELISA). (48)

## DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Vários procedimentos foram desenvolvidos para a detecção de WNV viável, antígeno de WNV ou ARN de WNV em amostras de diagnóstico humano, muitas das quais foram adaptadas para detetar WNV em outros vertebrados e em amostras de mosquitos. Estes procedimentos variam na sua sensibilidade, especificidade e tempo necessários para realizar o teste. Entre os testes disponíveis, *VectorTest*®, *Antigen Capture ELISA* e *Rapid Analyte Measurement Platform* foram desenvolvidos especificamente para testar mosquitos para o antígeno WNV, foram posteriormente adaptados para testar aves e outras amostras de vertebrados e não são usados para testes de diagnóstico humano. (46)

Os testes específicos para o diagnóstico serológico de infeção por vírus *West Nile*, em humanos, são efetuados no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas (CEVDI) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), em Águas de Moura, sendo este o Laboratório de referência a nível nacional. O método de diagnóstico considerado mais eficiente é a detecção pela técnica MAC-ELISA (ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM), de anticorpos IgM contra o vírus *West Nile*, no soro ou no líquido, nos primeiros 8 dias após o início dos sintomas. A presença de anticorpos IgM no líquido é fortemente sugestiva de infeção do sistema nervoso central por aquele vírus, porque os anticorpos IgM não atravessam a barreira hematoencefálica. Note-se que, no entanto, os doentes que tenham sido vacinados recentemente contra a febre-amarela ou contra a encefalite japonesa e aqueles que tenham contraído infeção por outros Flavivírus (por exemplo *Dengue*), podem apresentar resultados falsos positivos, na serologia por MAC-ELISA. (49)

Os achados laboratoriais verificados nos exames de rotina nos doentes infetados pelo vírus *West Nile* incluem:

- Contagem de leucócitos totais no sangue periférico normal ou ligeiramente aumentada, com linfopenia e, em alguns casos, anemia.
- Hiponatremia em alguns doentes, particularmente, naqueles com encefalite.
- Exame citoquímico do líquido: pleocitose, geralmente, com predomínio de linfócitos, proteinorraquia aumentada em todos os doentes e a glicorraquia normal.
- A tomografia computadorizada cranioencefálica não revela sinais de doença aguda e a ressonância magnética nuclear pode ser normal durante o período inicial de encefalite. A partir do 8º dia de doença começam a ser visíveis sinais de envolvimento progressivo da substância cinzenta profunda, na ressonância magnética nuclear. (49)

b) Diagnóstico Laboratorial de Vetores

De seguida são apresentadas as técnicas que podem ser aplicadas a mosquitos e espécimes de vertebrados não humanos que são colhidos com a finalidade de diagnosticar infeções por WNV. Muitos dos procedimentos de deteção de vírus são idênticos aos anteriormente descritos, mas vários procedimentos foram desenvolvidos especificamente para estes tipos de amostras.

IDENTIFICAÇÃO DE MOSQUITOS VETORES

Os mosquitos devem ser identificados para espécies ou unidade taxonómica mais baixa. Os espécimes são colocados em *pools* de 50 espécimes ou menos com base na espécie, sexo, localização, tipo de armadilha e data de coleta. Tamanhos maiores podem ser usados em alguns ensaios com perda de sensibilidade. Se os recursos forem limitados, o teste de mosquitos para fins de vigilância pode ser limitado às espécies primárias do vetor. (46)

Os principais procedimentos laboratoriais de identificação de vetores culicídeos são:

- Identificação taxonómica
- Pools
- Extração de RNA viral
- RT-PCR
- Sequenciação
- Análise filogenética (31)

## VIII. CONTROLO E PREVENÇÃO DO VÍRUS WEST NILE

Até à data não existe nenhum fármaco antiviral que seja inteiramente eficaz para tratar a infeção por WNV grave, de modo que o tratamento é principalmente sintomático e de suporte. Para além disso, e ao contrário do que acontece com outros Flavivírus, como o vírus da Febre-Amarela, atualmente não existe nenhuma vacina eficaz para a infeção WNV. Assim, a prevenção baseia-se principalmente no uso de medidas específicas para minimizar o possível risco de contacto com vetores infetados em áreas de risco. (51)

Na ausência de uma vacina humana eficaz, a prevenção da infeção por vírus WN, em seres humanos, baseia-se em duas estratégias fundamentais, tal como descrito na Circular Normativa da Direção-Geral da Saúde n.º 16/DT - Vigilância epidemiológica da infeção por vírus do *West Nile*, emitida a 06/08/04:

### A- Prevenção da picada dos insetos em humanos através de:

- Aplicação de repelente nas áreas expostas do corpo (braços, pernas, tornozelos, pescoço e face), evitando o contacto com as mucosas ou zonas sensíveis da pele:
  1. Recomenda-se a aplicação de repelentes contendo N,N-dietil-m-toluamida (DEET) numa concentração entre 20% e 50%, que deve ser repetida de acordo com a concentração do princípio ativo:
  2. Produtos contendo DEET numa concentração de 23,8% asseguram, em média, 5 horas de proteção contra a picada dos mosquitos, daí que a aplicação do repelente deva ser efetuada de 5/5 horas.
  3. Produtos contendo DEET numa concentração de 20% oferecem uma proteção de, aproximadamente, 4 horas contra a picada dos mosquitos.
  4. Produtos contendo DEET numa concentração de 6,65%, oferecem uma proteção contra a picada dos mosquitos de cerca de 2 horas.
- Em meio tropical, deve-se renovar a aplicação do repelente de quatro em quatro horas.
- Em caso de uso de protetor solar e repelente simultaneamente, deve-se aplicar primeiro o protetor e, de seguida, o repelente.
- Aconselha-se o uso de vestuário de cores claras e de fibras naturais, protegendo o mais possível a superfície do corpo. As calças e o calçado fechado, em conjunto com aplicação de repelente nos tornozelos..

- Para proteção adicional, regra geral, pode-se aplicar repelente ou inseticida como permetrina ou deltametrina no vestuário.
- No local de acomodação, sugere-se a utilização de sistema de ar condicionado, sprays inseticidas ou difusores elétricos ou serpentinas.
- Manter as portas e janelas fechadas se não estiveram protegidas por rede mosquiteira, sobretudo nos períodos de maior atividade dos insetos.
- Evitar a concentração de mosquitos dentro e fora da habitação através da eliminação de todos os recipientes com água parada, como vasos e os pratos de plantas.
- No destino, seguir rigorosamente as recomendações das autoridades locais no que à prevenção de doenças transmitidas por vetores dizem respeito.
- Antes da viagem, procurar aconselhamento na Consulta do Viajante, em especial, os grupos mais vulneráveis como as mulheres grávidas. (52,49)

O Centro de Medicina do Viajante e Clínica de Medicina Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em parceria com a Associação para o Desenvolvimento da Medicina Tropical (ADMT) disponibiliza consultas de referência a nível nacional – consulta do viajante. Em viagem, o viajante contacta com novos ambientes, expondo-se a novos agentes transmissores de doenças, clima e altitudes distintas, que podem por em risco a sua saúde. Estes riscos podem ser minimizados se o viajante agir de forma preventiva, informando-se sobre as precauções a adotar antes, durante, e mesmo após a viagem.

O aconselhamento ao viajante, efetuado por médicos com competência na área em várias unidades de saúde, deve ser realizada preferencialmente 4 a 8 semanas antes da partida para países endémicos, é determinado pelo destino e características específicas da viagem, assim como pelo perfil e estado de saúde do viajante (avaliação individual dos riscos associados à viagem) e compreende:

1. Educação e aconselhamento sobre os riscos para a saúde relacionados com a viagem e as medidas e atitudes preventivas adequadas
2. Revisão do estado de vacinação do viajante com recomendação e prescrição das vacinações indicadas para a viagem
3. Informação sobre risco e prevenção de doenças transmitidas pelo consumo de águas e alimentos contaminados, nomeadamente como atuar em caso de diarreia do viajante

4. Informação sobre outras doenças endémicas ou surtos e sua prevenção geral ou específica, consoante indicado
5. Recomendação e prescrição do estojo médico de acordo com as necessidades individuais do viajante
6. Aconselhamento específico a viajantes com características especiais (crianças, grávidas, idosos) ou com doença crónica
7. Aconselhamento sobre precauções e onde recorrer em caso de doença após a viagem. (53)

**B- Redução da densidade populacional de insetos vetores** através de ações tomadas por autoridades de saúde e municipais, com o objetivo de eliminar os criadouros, controlar o desenvolvimento das larvas dos mosquitos (larvicidas químicos ou biológicos) e reduzir o índice de vetores adultos (pulverização do meio ambiente com inseticidas). (49)

Deste modo, a vigilância das populações de mosquitos começa com programas de identificação das espécies de uma determinada área, com o estudo cartográfico e ecológico da área (que tipo de sistema se trata: arrozal, sapal, sistemas de saneamento, salinas etc.) e levantamento de todos os potenciais criadouros, para finalmente se reunirem as condições necessárias a uma intervenção eficiente. O controlo de mosquitos deverá ser integrado, tendo em conta o maior número de variáveis ambientais, de modo a permitir que se obtenham os níveis mais baixos possíveis das populações, respeitando o meio ambiente. Tendo em conta o ciclo biológico dos mosquitos é no estágio aquático de ovo, larva e pupa, em que se aplicam os maiores esforços para controlar as populações. Cada vez mais se têm utilizado métodos de controlo físico (como limpeza de canais de drenagem de água; eliminação de recipientes abandonados ao ar livre; manutenção de poços e fossas sanitárias, etc.) e biológico (envolve a utilização cuidada de um predador, agente patogénico, parasita, competidor ou toxina produzida por um microrganismo para reduzir a densidade de uma população alvo) em substituição aos métodos de controlo químico (aplicação de pesticidas de origem sintética em populações de larvas e de adultos).

As Ações de divulgação sobre o ciclo biológico dos mosquitos e de métodos preventivos para evitar a proliferação de mosquitos em propriedades privadas são muito úteis à população que, geralmente, se mostra interessada em perpetrar pequenas modificações e a adotar novos comportamentos nas suas casas e localidades para reduzir o número de mosquitos adultos. (20)

Um programa de vigilância de uma doença transmitida por vetores é um sistema organizado de recolha de dados, que compreende várias componentes. O Programa **REVIVE** (REde de vlgilância de VEtores) foi criado em 2007 como resultado de uma pareceria entre várias entidades, nomeadamente, a Direção-Geral da Saúde, as Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e vale do Tejo e Norte e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (6). O programa teve início em 2008 com a vigilância de vetores culicídeos em Portugal, e em 2011 foi estabelecido o segundo protocolo para o horizonte temporal de 2011 a 2020. A sua implementação a nível nacional deveu-se, sobretudo, à necessidade de instalar capacidades para melhorar o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes no país, a sua distribuição e abundância, esclarecer o seu papel como vetor de agentes de doença, assim como detetar atempadamente a introdução de espécies invasoras com importância em Saúde Pública (55).

O método REVIVE inicia-se com a seleção dos locais e periodicidade da amostragem, tendo como critérios fundamentais a proximidade à população humana, o historial da presença de mosquitos, o impacto nas atividades humanas, a presença de potenciais criadouros e pontos de entrada de espécies exóticas, assim como a experiência adquirida em anos anteriores (55).

O programa REVIVE, implementado nas diversas Administrações Regionais de Saúde, envolve a captura de ovos, larvas, pupas e adultos de culicídeos entre os meses de maio a outubro. Para a colheita de ovos podem ser utilizadas ovitraps que consistem em recipientes de plástico com água e matéria orgânica, ou infusão atrativa, destinados à postura de ovos pelas fêmeas grávidas, sendo estas, normalmente, colocadas em portos e aeroportos onde se pretende uma monitorização mais permanente. Estas armadilhas são muito úteis em estudos de epidemiologia e ecologia de populações e podem capturar a fêmea grávida ou deixá-la escapar, apenas retendo os ovos. As armadilhas consistem em recipientes de água de plástico (balde) ou de outros materiais (bambu, borracha, metal etc.) onde é colocada água com matéria orgânica ou com uma infusão atrativa (para as espécies *Culex* spp.). A cor e o contraste são importantes para atrair mais efetivamente algumas espécies. (6)

Para além deste método, também podem ser colhidos ovos diretamente do seu habitat natural recorrendo à utilização de caços, redes de malha ou passadores, sendo que esta técnica está acoplada à colheita de larvas e pupas. Os mosquitos em fase adulta são capturados com recurso a armadilhas luminosas tipo CDC (Centers of Disease Control) colocadas estrategicamente em locais onde exista vegetação e, preferencialmente, ao entardecer, dado que a maioria dos alvos são espécies com atividade noturna.

Junto a esta armadilha é colocado gelo seco, para simular a respiração humana/animal, através da libertação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), aumentando a eficiência da captura, que termina no início do dia seguinte com a recolha da armadilha. (6,17)

Para uma efetiva verificação das condições ambientais em que ocorre a captura, é efetuado o registo da temperatura e humidade durante a noite em que é realizada a colheita, através da utilização do termo higrómetro. Após a recolha de ovos, larvas, pupas, as amostras são transferidas para frascos com meio líquido e, por forma a assegurar o triple packaging para o transporte de produtos biológicos, são posteriormente colocadas em saco de plástico e depois em caixas de esferovite contendo um termoacumulador. Seguidamente são enviadas para o laboratório do CEVDI para identificação taxonómica. No que respeita aos mosquitos em fase adulta, as amostras colhidas são colocadas no frigorífico durante cerca de 30 minutos para anestésiar os mosquitos e facilitar a sua transferência para os frascos de transporte, que são posteriormente colocados em saco de plástico e em caixas de esferovite (assegurando o triple *packaging*) com um termoacumulador e enviadas para o CEVDI. Em laboratório, o processo de identificação de mosquitos adultos passa pela transferência para tubos em pools até um máximo de 50 espécimes, de acordo com a espécie, género, data e local de colheita, posteriormente deixam-se eclodir para confirmar a identificação. Em fase adulta, para a deteção de Flavivírus, efetua-se a pesquisa direta da presença de RNA viral em RNA total extraído das pools de mosquitos macerados em azoto líquido, com a amplificação parcial por RT-PCR do gene NS5, com recurso a primers específicos para Flavivírus. Os produtos de RT-PCR são re-amplificados numa segunda reação de PCR de forma a aumentar a sensibilidade da deteção e analisados em gel de agarose. (6)

Para identificação molecular dos Flavivírus detetados, os produtos de Nested-PCR são purificados e sequenciados num sequenciador automático. Para os casos positivos, as sequências parciais do gene NS5 são obtidas combinando as sequências geradas com ambos os primers recorrendo ao software BioEdit. As pesquisas de semelhanças com sequências em bases de dados (GenBank) são efetuadas recorrendo ao algoritmo BLASTN. No caso de serem identificados agentes patogénicos nas amostras, as respetivas Administrações Regional de Saúde, bem como a Direção-Geral da Saúde são informadas imediatamente (20,55)

No período 2011-2015, em 3472 colheitas de mosquitos adultos foram capturados 53459 mosquitos e em 6043 colheitas de imaturos foram recolhidos 116580 larvas e pupas de mosquito, num universo de 177 concelhos participantes do programa àquela data – Figura 12. Desde o início do programa REVIVE foram colhidos e identificados 308930 espécimes de mosquitos em 190 concelhos de Portugal continental e Madeira, sendo importante realçar que na pesquisa de Flavivírus não foram identificados vírus patogénicos durante este período. (40)

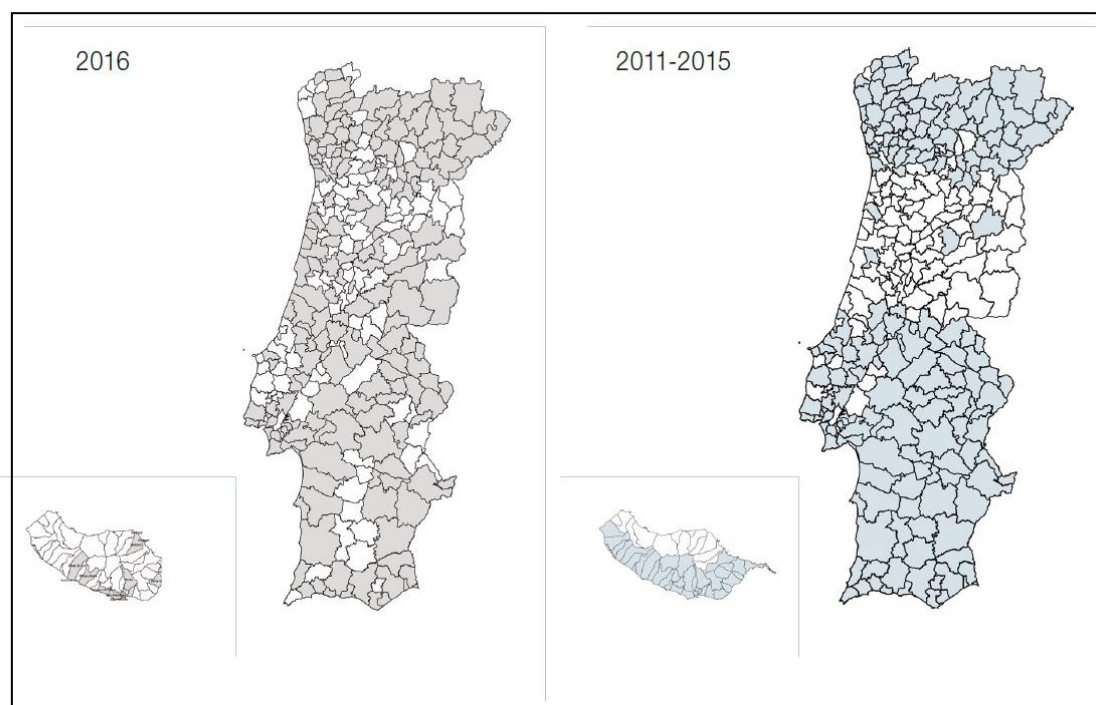


Figura 12 - Concelhos com colheitas de mosquitos adultos e imaturos no âmbito do REVIVE (2011-2016)

[Adaptado de: Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. *Relatório REVIVE 2016 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP), 2017 (64)]

Dos mosquitos colhidos como adultos em 2015 e no total 2011-2015, 92 e 91%, respetivamente, eram fêmeas devido ao método de captura mais utilizado, nomeadamente as armadilhas CDC desenhadas para atrair fêmeas, e prováveis vetores de agentes patogénicos. De 2011 a 2015 foram identificadas 25 espécies do total das 40 espécies referenciadas para o território português. (40)

No que concerne às espécies encontradas, segundo os dados do Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac, verifica-se que a espécie *Cx. pipiens* é a mais comum e a sua distribuição é verificada em praticamente todas as regiões do país abrangidas pelo REVIVE—(Figura 13 - a azul estão representados os concelhos onde foi encontrada a espécie *Cx pipiens*). (55)

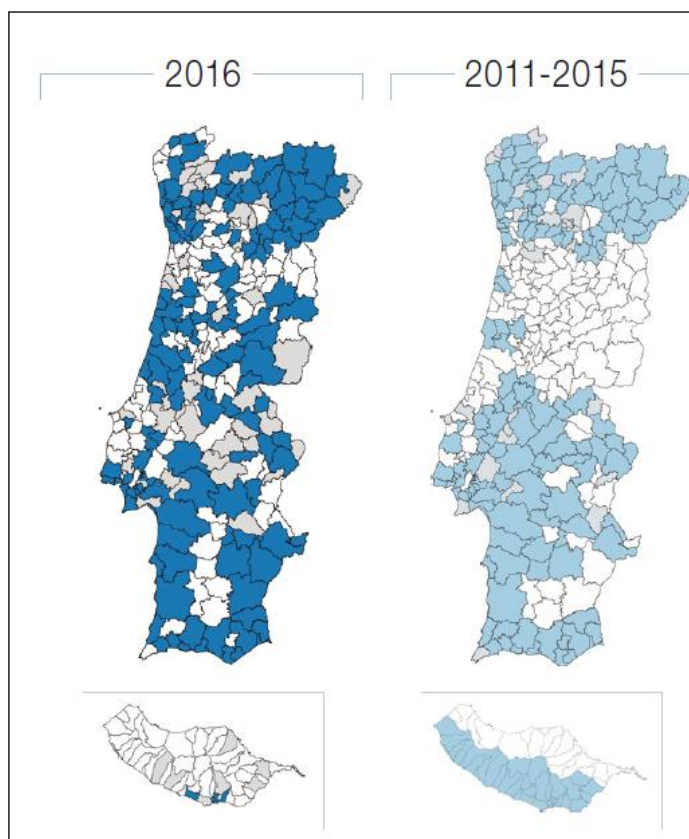


Figura 13 - Distribuição geográfica de *Culex pipiens*  
Anos 2011-2015 e em 2016 em Portugal

[Adaptado de: Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. *Relatório REVIVE 2016- Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP), 2017 (64)]

A análise criteriosa dos dados obtidos permite aferir a diversidade de espécies encontradas, a sua distribuição no país e a presença de agentes patogénicos, possibilitando a deteção atempada da sua circulação e concertando esforços para o efetivo controlo dos mesmos. A vigilância em portos e aeroportos é uma aposta crucial do REVIVE para o controlo de fronteiras, já que a circulação de pessoas e bens é uma das formas de introdução de espécies invasoras (6). Adicionalmente, o Regulamento Sanitário Internacional (D.R. 1.<sup>a</sup> série, N.º 16, de 23 de Janeiro de 2008) preconiza, nos Anexos 1 e 5, o estabelecimento de programas de vigilância e controlo de vetores no perímetro dos portos e aeroportos, locais privilegiados para os processos de invasão e estabelecimento de espécies exóticas de importação. (20)

A necessidade de vigiar continuamente locais de possível entrada de vetores em Portugal, torna o Programa REVIVE uma ferramenta fundamental para a defesa da Saúde Pública. Para além disso, este programa tem contribuído com dados para a criação de mapas no âmbito da rede VBORNET (*European Centre for Disease Prevention and Control no Programme on emerging and vector-borne diseases*), evidenciando a monitorização efetuada na Europa e a importância que as Administrações Regionais de Saúde, a DGS e o INSA dão à vigilância de vetores a nível nacional. (5)

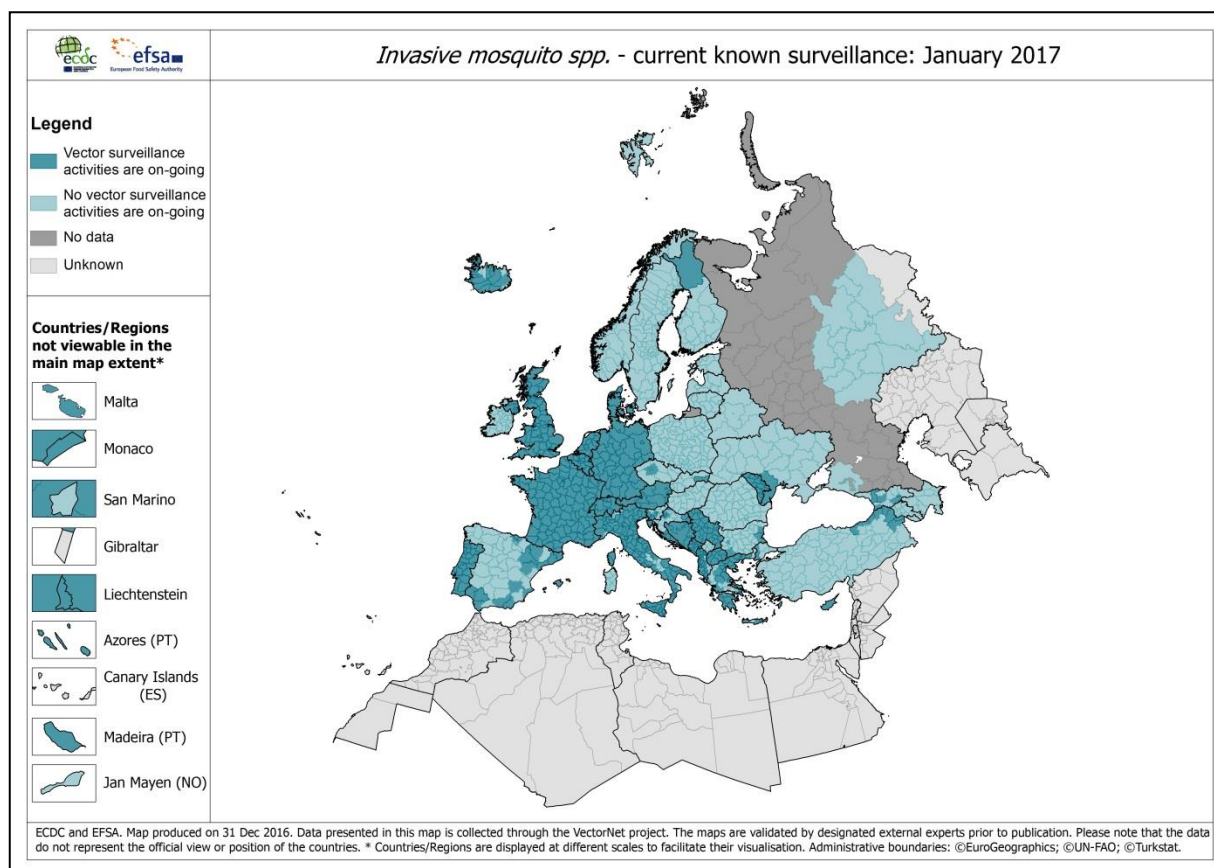


Figura 14 - Situação atual da vigilância de vetores de espécies invasivos na Europa

Atualizado a Janeiro de 2017

[Adaptado de: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET\\_maps.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx) (57)]

## IX. CONCLUSÃO

As doenças transmitidas por vetores são reconhecidas, atualmente, como emergentes ou re-emergentes, em resultado de mudanças nas políticas de Saúde, resistência a medicamentos e a inseticidas, mudanças demográficas, climáticas, sociais e modificações genéticas de organismos patogénicos (11). As atuais dinâmicas dos ciclos biológicos de transmissão do vírus WN incrementam alterações na propagação e distribuição das diferentes linhagens do vírus WN pelo mundo, comprovando a emergência em que as doenças transmitidas por vetores se tornaram. De facto, as alterações climáticas e ambientais a nível mundial, a adaptação dos vetores, a circulação de aves migratórias, a vasta troca de bens nos mercados, tanto a nível portuário como aeroportuário, bem como o incremento do turismo aliado às variações demográficas são fatores que apontam para uma possibilidade de circulação de novos Flavivírus (15,11)

Em Portugal, ainda que a deteção da presença do vírus WN seja esporádica e inesperada, continuamos a reunir condições favoráveis para a criação de nichos ecológicos localizados geograficamente que possibilitam a manutenção do vírus. A elevada capacidade de dispersão deste arbovírus, bem como a grande densidade de mosquitos Da espécie *Cx. pipiens* distribuídos no país e a sua versatilidade são fatores que fomentam a possível introdução do vírus. (2)

O diagnóstico laboratorial revela-se de grande importância no acompanhamento e monitorização das atuais infeções pelo vírus *West Nile* uma vez que, muitas das manifestações clínicas não são exclusivas deste tipo de vírus, e podem ser facilmente confundidas com outras doenças. A verdadeira assunção da metodologia a recorrer de acordo com a evolução da infeção e características individuais e imunológicas assume-se como necessária e elementar. Não é possível restringir o diagnóstico a apenas a uma técnica, devendo-se incluir a avaliação da situação clínica e o histórico do paciente numa primeira abordagem. A identificação do agente vetor em meio laboratorial auxilia na obtenção de dados epidemiológicos relevantes para a implementação de medidas de controlo e prevenção de doenças transmitidas por vetores, urgentes no atual panorama mundial socioeconómico e ambiental em constante mudança.

Na ausência de uma vacina, a única forma de reduzir a infeção nos humanos é através da sensibilização para os fatores de risco e educar as populações mais expostas sobre as medidas que podem tomar para reduzir a exposição ao agente vetor e conseqüentemente ao vírus. (33)

## X. BIBLIOGRAFIA

1. Flores EF. O vírus do Nilo Ocidental. *Ciência Rural*. 2009 Abril; 39: p. 604-612.
2. Alves MJ, Poças JMD, Luz T, Amaro F, Zé-Zé L, Osório H. Infecção por vírus *West Nile* (Flavivírus) em Portugal Considerações acerca de um caso clínico de síndrome febril com exantema. *Revista Portuguesa de Doenças Infeciosas* V8, Nº1. 2012 Janeiro > Abril: p. 46-51.
3. Githeko AK. *Bulletin of the World Health Organization*. [Online].; 2000 [consultado em Dezembro 2016]. Disponível em: [http://www.who.int/bulletin/archive/78\(9\)1136.pdf](http://www.who.int/bulletin/archive/78(9)1136.pdf)
4. Osório, H, Amaro F. Zé-Zé Líbia. Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP; 2014; p.43-74
5. Woodring JL HSB. Natural cycles of vectorborne Colorado UPo, editor. Niwot, CO , USA: In BJ Beaty, WC Marquardt (eds); 1996.
6. Osório H, Zé-Zé L, Amaro F, Alves MJ. Mosquito Surveillance for Prevention and Control of Emerging Mosquito-Borne Diseases in Portugal - 2008–2014. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Novembro 2014; p.11584-11592.
7. Fevereiro M. Elsevier - *Veterinary Microbiology* 152 (2011) 407–410. [Online].; 2011 [consultado em Janeiro 2017]. Disponível em: <http://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/4919/1/VETMIC5310%20PUBLICA%C3%87%C3%83O.pdf>
8. Komar N. *West Nile virus: epidemiology and ecology in North America*. *Advances in Virus Research*. 2003, p: 35-55
9. Londono-Renteria B, Colpitts TM. A Brief Review of *West Nile Virus* Biology. *West Nile Virus: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology* Springer. 2016 Junho; 1435.
10. Andrew K. Githeko SWLUEC&JAP. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2000. p. 1136-1143.
11. Semenza J, Menne B. Climate Change and Infectious Diseases in Europe. *Lancet ID*. 2009: p. 365-375.
12. Abrantes P, Silveira H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa De Saúde Pública*. Julho/Dezembro 2009: p. 71-86.
13. Pugliese A, Beltramo T, Torre D. Emerging and re-emerging viral infections in Europe. *Cell biochemistry and function*. 2007 Agosto : p. 1-13.
14. Bale Jr JF. Emerging Viral Infections. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2012: p. 152-157.
15. Semenza J, Suk J, Johannesson M. Climate change and communicable diseases in the EU Member States. In ECDC. Estocolmo ; 2010. p. 2.

16. Lemon SM, Sparling PF, Hamburg MA, Relman DA. Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections Sciences NAO, editor. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2008.
17. Almeida A. Paulo, Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a Sua Importância Médica em Portugal. Acta Médica Portuguesa. 2011: p. 961-974.
18. Rey L. Base Da Parasitologia Médica. 3rd ed.: Editora Guanabara-Koogan; 2011.
19. Harbach ER. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa 1668. 2007 Dezembro: p. 591-629.
20. Osório H, Zé-Zé L, Alves MJ. Manual Revive - Mosquitos. In Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac; 2011; Águas de Moura. p. 8-10.
21. Marquardt WH. Biology of Disease Vectors. 2nd ed. Sonnack KD, editor. London : Elsevier Inc. ; 2005.
22. Pinto AM. Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações. 2nd ed. Lisboa: Lidel; 2013.
23. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The Global Ecology and Epidemiology of *West Nile* Virus - Review Article. BioMed Research International. 2014 Junho: p. 1-20.
24. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. *West Nile* Virus. Elsevier Inc. 2010 Março: p. 47–65.
25. Colpitts T, Conway M, Montgomery RR, Fikriga , Erol. *West Nile* Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. Clinical Microbiology Reviews, Journal ASM. 2012 Outubro; 25.
26. Suthar MS, Diamond MS, Gale M. *West Nile* virus infection and immunity. Vector-Borne Diseases, Nature Reviews | Microbiology. 2013 Fevereiro; 11
27. World Health Organization - *West Nile* virus – Portugal. [Online].; 2015 [consultado em Fevereiro 2017]. Disponível em: [http://www.who.int/csr/don/17-septemb"r-2015-wnv/en/](http://www.who.int/csr/don/17-septemb)  
<http://www.who.int/csr/don/17-september-2015-wnv/en/>
28. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR *et al.* Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of *West Nile* Virus Disease. Emerging Infectious Diseases. 2005 Agosto: p. 1174–1179.
29. Alves MJ, Filipe AR. O VÍRUS *WEST NILE* EM PORTUGAL. Revista ABO. 2003 Junho ; 14.
30. Connell F, McKeown ,P, Garvey ,P, Cotter ,S, Conway A, Flanagan D, et al. Two linked cases of *West Nile* virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. Euro Surveill. 2014; 8.
31. Osório H, Amaro F, Zé-Zé L, Alves MJ, Luz T. Flavivírus transmitidos por mosquitos: um risco potencial para Portugal. In Projectos de Saúde Pública, Estudos Epidemiológicos, prevenção e diagnóstico de novas doenças, designadamente doenças transmissíveis e doenças iatrogénicas; Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

32. Barros SC, Ramos F, Fagulha T, Duarte M, Henriques M, et al. Serological evidence of *West Nile* virus circulation in Portugal. *Veterinary Microbiology*. 2011 Setembro; 151.
33. Organization WH. World Health Organization - *West Nile* virus Fact sheet N°354. [Online].; 2011 [consultado em Fevereiro 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>
34. Zé-Zé L, Proença P, Osório H, Gomes S, Luz T, Parreira P, et al. Euro Surveill - Human case of *West Nile* neuroinvasive disease in Portugal, summer 2015. [Online].; 2015 [consultado em Janeiro 2017]. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21249>
35. ECDC. Epidemiological update: *West Nile* virus transmission season in Europe, 2016. [Online].; 2016 [consultado em Março 2016]. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/press/news/\\_layouts/forms/News\\_DispatchForm.aspx?ID=1524&List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&Source=http%3A%2F%2Fecdc.europa.eu%2Fen%2Fhealthtopics%2Fwest\\_nile\\_fever%2Fpages%2Findex%2Easpx](http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispatchForm.aspx?ID=1524&List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&Source=http%3A%2F%2Fecdc.europa.eu%2Fen%2Fhealthtopics%2Fwest_nile_fever%2Fpages%2Findex%2Easpx)
36. ECDC. *West Nile* fever maps. [Online].; 2016 [consultado 2017 Janeiro 18]. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west\\_nile\\_fever/West-Nile-fever-maps/pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/pages/index.aspx)
37. Direção-Geral da Saúde, Memorando sobre o Vector Transmissor do Vírus do Nilo Ocidental (VNO). Ministério da Saúde [Online]; [consultado em Março 2017]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/memorando-sobre-o-vector-transmissor-do-virus-do-nilo-ocidental-vno.aspx>
38. CDC. *West Nile* Virus Transmission Cycle [Online]; 2015 [consultado em Janeiro 2017]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13\\_240124\\_west\\_nile\\_lifecycle\\_birds\\_plainlanguage\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf)
39. Pinheiro CA, Carvalho LM, Tavares L, et al. FEBRE DO NILO OCIDENTAL. In Apifarma Mirror Group Portugal; 2014; Lisboa.
40. CEVDI. REVIVE 2016 Culicídeos e Ixodídeos. Relatório. Lisboa: Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac - INSA, Departamento de Doenças Infecciosas; 2017.
41. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of *West Nile* Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *Journal of Virology* (American Society for Microbiology). 2006 Outubro; 80.
42. Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol*, Springer. 2015 Dezembro.
43. Petersen LR, Marfin AA. *West Nile* Virus: A Primer for the Clinician. *Annals of Internal Medicine*. Fort Collins, Colorado: Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vectorborne Infectious Diseases; 2002.

44. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, *et al.* West Nile Virus Neuroinvasive Disease. American Neurological Association, Annals of neurology 2006 Setembro; 60.
45. Sambri V, Capobianchi MR, *et al.* Diagnosis of West Nile Virus Human Infections: Overview and Proposal of Diagnostic Protocols Considering the Results of External Quality Assessment Studies. Viruses. 2013 Setembro; 5.
46. eCDC. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. 4th ed. Diseases DoVB, editor. Fort Collins, Colorado; 2013.
47. Levinson W. Microbiologia Médica e Imunologia. 13th ed. Editora A, São Paulo - Brasil: Simone de Fraga; 2016.
48. CDC. MAC-ELISA para zika [Online].; 2016 [consultado em Fevereiro 2017]. Disponível em: [https://portugues.cdc.gov/img/cdc/PT\\_55945.pdf](https://portugues.cdc.gov/img/cdc/PT_55945.pdf)
49. Mansinho K. Circular Normativa– Direção-Geral da Saúde N.º16/DT - *Vigilância epidemiológica da infecção por vírus do Nilo Ocidental*. 2004.
50. Commission decision of 28/IV/2008 amending decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision N° 2119/98/EC. 2008.
51. Sánchez-Seco MP, NAVARRO JM. Infecciones por el virus de Toscana, el virus del Nilo occidental y otros arbovirus de interés en Europa. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005 Maio: p. 560-8.
52. IHMT. IHMT - Consulta do Viajante (Prevenção da picada de insetos). [Online].; 2015 [consultado em Maio 2017]. Disponível em: <http://www.ihmt.unl.pt/consulta-do-viajante/prevencao-da-picada-de-insetos/>
53. IHMT. IHMT – Consulta de Medicina do Viajante (Pré-viagem). [Online]; 2017 [consultado em Fevereiro 2017]. Disponível em: <http://www.ihmt.unl.pt/consulta-do-viajante/consulta-de-medicina-viajante/>
54. Semenza JC, Zeller H. Integrated surveillance for preventions and control of emerging vector-borne diseases in Europe. Eurosurveillance. 2014 Março.
55. CEVDI. Relatório REVIVE 2013 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Relatório. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. INSA, IP, Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac; 2014.
56. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, *et al.* Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2012: p. 435-447.
57. eCDC. VectorNet. [Online].; 2017 [consultado em Janeiro 2017]. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET\\_maps.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx).

58. Kramer LD, Li J, Shi PY. *West Nile virus*. The Lancet Neurology. Neurology 2007 Fevereiro; 6.
59. Pauvolid-Corrêa A, Varella, R. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste d– vero. Scielo - Rev Bras Epidemiol. 2008; p. 463-471.
60. Marquardt W. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. 2nd ed. U.S.A.: Elsevier ; 2004.
61. Osório H, Zé-Zé L, Alves MJ– Formação Revive - Mosquitos. In Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infeciosas Dr. Francisco Cambournac; 2011; Águas de Moura. p. 8-10.
62. eCDC. Infographic Mosquito-Borne-Diseases of European Centre for Disease Prevention and Control. [Online].; 2017 [consultado em Janeiro 2017]. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/infographics/PublishingImages/mosquito-borne-diseases-infographic-downloadable.pdf>
63. Sterner FJ, Goovaerts DGE, Lum MA, *et al.* Inactivated chimeric and related methods of use. United States patent 11/473.600. 2007 Janeiro 11.
64. CEVDI. REVIVE 2016 Culicídeos e Ixodídeos. Lisboa: Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac - INSA, Departamento de Doenças Infeciosas; 2017.
65. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, *et al.* A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. American Journal of Tropical Medicine. 1940;20:471-92.
66. Filipe AR. Isolamento do vírus West Nile em Portugal. Sep J Soc Cien Med Lis, 1971; 9: 603-609
67. Agência Portuguesa do Ambiente (APA) - Estratégia Nacional de Adaptação às Alterações Climáticas. [Online].; 2015 [consultado em Julho 2017]. Disponível em: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=81&sub2ref=118&sub3ref=391>



# *Parte IV*



## CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A concretização do estágio curricular no Laboratório Dr. Joaquim Chaves, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, permitiu-me tomar um contacto estreito com as diversas valências que compõem um Laboratório Clínico, através da realização quer de técnicas manuais, que atualmente são cada vez mais raras de executar, quer de manipulação automática com recurso a tecnologia de ponta, tecnologia esta que se revela uma mais-valia num laboratório de excelência e de elevado reconhecimento como é o Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

O acompanhamento das atividades laboratoriais nos diversos sectores e em diferentes fases do processo analítico possibilitou a aplicação prática e profissional de grande parte dos conhecimentos adquiridos ao nível académico. Enaltece-se ainda a amabilidade e disponibilidade demonstrada pelos profissionais que me acompanharam em cada departamento, revelando-se a vertente humana e social um fator crucial no crescimento enquanto profissional de saúde.

Infelizmente, por ter realizado o estágio em horário pós-laboral (17h-21h) não me foi possível contactar de forma profícua com alguns atividades e métodos laboratoriais que por norma decorrem no período laboral e portanto muitas foram as valências e componentes técnicas não abrangidas ou insuficientemente assimiladas durante o período de estágio. Não obstante, julgo ter cumprido assertivamente os pressupostos que este encerra, sendo que nas áreas laboratoriais que tomei maior contacto, foi possível a aprendizagem profunda sobre os métodos e estratégias de diagnóstico, suficiente para possibilitar a compreensão da sua complexidade e das implicações da divulgação de resultados fidedignos e exatos ao utente/cliente.