

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Anabela Franco Enes
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, 2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

UNIDADE LOCAL DE SAÚDE DO ALTO MINHO
VIANA DO CASTELO

Relatório de estágio orientado pelo

Doutor Ricardo Luz

Anabela Franco Enes

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, 2015

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ABREVIATURAS	viii

PARTE I – Relatório de Estágio

RESUMO/ABSTRACT	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
1. PRÉ-ANALÍTICA	2
1.1. COLHEITA DE AMOSTRAS	3
1.2. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	5
2. HEMATOLOGIA	5
2.1. HEMOGRAMA	6
2.1.1. Princípio de Funcionamento	7
2.1.2. Interpretação de Histograma	13
2.1.3. Gestão de Resultados	16
2.2. ESFREGAÇOS DE SANGUE PERIFÉRICO	17
2.2.1. Preparação de Esfregaço de Sangue	18
2.2.2. Princípio da Coloração de Lâminas	19
2.2.3. Situações que Requerem Confirmação	20
2.3. LÍQUIDOS BIOLÓGICOS	21
2.3.1. Líquido Cefalorraquidiano	21
2.3.2. Líquido Seminal	23
2.4. LÍQUIDOS BIOLÓGICOS PATOGENICOS	28
2.4.1. Líquido Ascítico, Líquido Pleural, Líquido Sinovial	28
2.5. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO GLOBULAR	31
2.5.1. Analisador Automático	32
2.5.2. Método Clássico de Westergren	33
2.6. HEMOGLOBINA GLICADA	34
2.6.1. Princípio de Funcionamento	35
2.7. FRAGILIDADE OSMÓTICA	35
2.7.1. Princípio do Método	36
2.8. GASIMETRIA ARTERIAL	36
2.8.1. Princípios de Funcionamento	37
2.8.2. Interesse Clínico	38
2.9. CONTROLO DE QUALIDADE	39
2.9.1. Controlo de Qualidade Interno	39
2.9.2. Controlo de Qualidade Externo	40
3. MICROBIOLOGIA	41
3.1. MEIOS DE CULTURA	42
3.2. EXAME BACTERIOLÓGICO	44
3.2.1. Exame Direto	44
3.2.2. Exame Cultural	45

3.2.3. Identificação dos Organismos	65
3.2.4. Teste de Sensibilidade a Antibióticos.....	71
3.3. EXAME MICOLÓGICO.....	72
3.3.1. Exame Direto	73
3.3.2. Exame Cultural	73
3.3.3. Identificação dos Organismos	74
3.4. EXAME PARASITOLÓGICO E VIROLÓGICO.....	76
3.4.1. Parasitológico.....	76
3.4.2. Virológico	80
3.5. EXAME MICOBACTERIOLÓGICO	83
3.5.1. Descontaminação das Amostras	83
3.5.2. Exame Direto	84
3.5.3. Exame Cultural	86
3.5.4. Identificação e Antibiógrama de Micobactérias.....	87
3.6. CONTROLO DE QUALIDADE	87
4. IMUNOQUÍMICA.....	88
4.1. COLHEITA DE AMOSTRAS	89
4.2. TRIAGEM DE AMOSTRAS.....	89
4.3. QUÍMICA CLÍNICA.....	90
4.3.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento.....	91
4.3.2. Processamento de Amostras	93
4.3.3. Interesse Clínico	95
4.4. ENDOCRINOLOGIA E SEROLOGIA INFECIOSA.....	100
4.4.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento	101
4.4.2. Interesse Clínico	101
4.5. IMUNOALERGOLOGIA	104
4.5.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento.....	104
4.5.2. Interesse Clínico	106
4.6. ELETROFORESE.....	106
4.6.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento.....	107
4.6.2. Proteínas Séricas	107
4.7. IMUNOLOGIA	110
4.7.1. Métodos Utilizados e Princípio de funcionamento	111
4.7.2. Interesse Clínico	113
4.8. URINANÁLISES	118
4.8.1. Urina Tipo II e Sedimento Urinário.....	118
4.8.2. Urina 24h.....	127
4.8.3. Outras Pesquisas Urinárias.....	128
4.8.4. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes	129
4.9. SEROLOGIA MANUAL	129
4.9.1. Sífilis	129
4.9.2. Sorodiagnóstico Febril	132
4.9.3. Reação de Waaler-Rose.....	132
4.9.4. Reação de Paul-Bunnell.....	133
4.10. CALIBRAÇÕES E CONTROLOS DE QUALIDADE	134
4.10.1. Calibração	134
4.10.2. Controlo de Qualidade Interno.....	134
4.10.3. Controlo de Qualidade Externo	135
5. CONCLUSÃO	136
6. BIBLIOGRAFIA	137

Parte II - Tireoide na Grávida e na Criança

RESUMO/ABSTRACT.....	141
INTRODUÇÃO	143
A GLÂNDULA DA TIROIDE.....	143
HORMONAS E SUA BIOSÍNTESE.....	144
Vias Metabólicas.....	146
TRANSPORTE HORMONAL	148
REGULAÇÃO HORMONAL	148
EFEITOS DAS HORMONAS	150
DISFUNÇÃO DA TIROIDE	151
Tirotoxicose e Hipertireoidismo	152
Hipotireoidismo	153
Inflamação da Tireoide.....	154
Doença Autoimune da Tireoide	156
Disponibilidade de Iodo.....	158
TIROIDE NA GRÁVIDA.....	159
PRINCIPAIS ALTERAÇÕES DURANTE A GRAVIDEZ	160
DISFUNÇÕES NA GRÁVIDA	164
Hipertireoidismo na Grávida	164
Hipotireoidismo na Grávida.....	167
Disponibilidade de Iodo na Grávida	169
TIROIDE NO FETO.....	172
IMPORTÂNCIA DAS HORMONAS DA TIROIDE NO FETO.....	172
DESENVOLVIMENTO DA TIROIDE NO FETO	173
EFEITO DA DISFUNÇÃO MATERNA NO FETO	176
Hipertireoidismo Fetal	177
Hipotireoidismo Fetal.....	177
Efeito da Disponibilidade de iodo no Feto	178
CONSEQUÊNCIAS DA DISFUNÇÃO DA TIROIDE NO RECÉM-NASCIDO	179
Hipertireoidismo e Tirotoxicose no Recém-Nascido	179
Hipotireoidismo no Recém-Nascido	180
Disponibilidade de Iodo no Recém-Nascido.....	181
DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA	183
HIPERTIREOIDISMO.....	183
HIPOTIREOIDISMO	185
DISPONIBILIDADE DE IODO	187
CONCLUSÃO	190
BIBLIOGRAFIA.....	192
ANEXOS	198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Analisador automático de hemogramas <i>Sysmex XE-2100</i> .	7
Figura 2 - Composição de fosfolípidos nos granulócitos imaturos e maduros.	8
Figura 3 - Mecanismo de ação do canal 5Diff.	11
Figura 4 - Mecanismo de ação no canal WBC/BASO.	11
Figura 5 - Mecanismo de ação no canal NRBC.	12
Figura 6 - Mecanismo de ação do canal RET.	13
Figura 7 - Exemplo de um resultado de hemograma de uma amostra normal: (1) Dados de análise; (2) Diagrama de dispersão 5Diff; (3) Diagrama de dispersão WBC/BASO; (4) Diagrama de dispersão IMI; (5) Diagrama de dispersão NRBC; (6) Diagrama de dispersão RET; (7) Diagrama de dispersão PLT-O; (8) Histograma de RBC; (9) Histograma de PLT; (10) Mensagem do sistema de WBC; (11) Mensagem do sistema de RBC/RET e (12) Mensagem do sistema de PLT.	14
Figura 8 - Esfregaço de sangue periférico com o auxílio de um aplicador de gota de sangue com espalhador, <i>Haemo-Diff</i> da SARSTEDT. 1. Colocar aplicador no tubo; 2. Tudo é invertido para dispensar uma gota de sangue na lâmina; 3. Usar o espalhador para fazer o esfregaço. ⁽²⁾	18
Figura 9 - (A) Esfregaço bem preparado; (B) e (C) Esfregaços mal preparados. ⁽²⁾	19
Figura 10 - Câmara de <i>Neubauer</i> .	21
Figura 11 - Representação da câmara de contagem de <i>Neubauer</i> com os nove quadrantes de contagem. Para uma amostra de LCR, a contagem de células é feita nos quadrantes 1, 3, 7 e 9. ⁽⁵⁾	22
Figura 12 - A) Citocentrífuga <i>Shandon Cytospin 2</i> . B) Procedimento da montagem da amostra para a citocentrífuga. ⁽⁵⁾	23
Figura 13 - A – Estrutura normal de um espermatozoide. ⁽⁶⁾ B – Espermatozoides corados com coloração de papanicolau. ⁽⁷⁾	27
Figura 14 - Possíveis alterações morfológicas dos espermatozoides. ⁽⁷⁾	28
Figura 15 - Aparelho automático de velocidade de sedimentação globular <i>VES-MATIC 20</i> .	32
Figura 16 - Suporte graduado vertical <i>Microvette</i> [®] , capilar e tubo <i>Microvette</i> [®] 100/200 de citrato de sódio para o método de <i>Westergren</i> da SARSTEDT.	33
Figura 17 - Analisador automático de hemoglobina glicada <i>ARKRAY ADAMS A_{1c} HA-8160</i> .	34
Figura 18 - Aparelho automático de gasimetrias <i>GEM Premier (3500 e 4000)</i> .	37
Figura 19 - Esquema de como estriar as placas de modo a obter colônias isoladas e unidades formadoras de colônias (UFC) contáveis.	48
Figura 20 - Esquema do sentido de migração da amostra numa tira de membrana imunocromatográfica com partículas de ouro coloidal e anticorpos monoclonais/policlonais específicos para Adenovírus (1) e Rotavírus (2).	81
Figura 21 - Sistema integrado <i>Architect Ci8200</i> da <i>Abbott Diagnostics</i> .	90
Figura 22 Esquema explicativo do princípio de detecção do método de CMIA para determinar a presença de antígenos, anticorpos e analitos em amostras.	92
Figura 23 - Evolução dos anticorpos Ig M e Ig G, ao longo do tempo, de uma primo-infecção e reinfeção do vírus da rubéola.	103
Figura 24 – Esquema de imunoensaio em <i>sandwich</i> realizado no <i>ImmunoCAP</i> TM 250 para a quantificação de Ig E total.	105
Figura 25 – Esquema de imunoensaio em <i>sandwich</i> realizado no <i>ImmunoCAP</i> TM 250 para a quantificação de Ig E específica.	105
Figura 26 - Aparelho automático para eletroforese capilar, <i>MINICAP</i> da <i>Sebia</i> .	107
Figura 27 - Electroforegrama normal de proteínas do soro humano usando <i>MINICAP</i> da <i>Sebia</i> .	108
Figura 28 - Esquema do princípio do método de imunofluorescência indireta.	112
Figura 29 - Analisador de bancada para a análise totalmente automática de urinas tipo II, <i>URISYS 2400</i> da <i>Roche Diagnostics</i> .	119
Figura 30 - Analisador de partículas da urina automatizado <i>UF-1000i</i> da <i>Sysmex Corporation</i> .	124
Figura 31- A tiroide humana. ⁽²⁾	143

Figura 32 A e B - Diferentes ampliações dos folículos da tireoide. C - Célula folicular: a) superfície apical da célula; b) membrana basal; c) célula capilar; d) gotas coloidais; e) retículo endoplasmático; g) complexo de Golgi; m) mitocôndria; n) núcleo; o) célula endotelial com poro aberto; p) membrana plasmática; r) ribossomos no retículo endoplasmático; v) microvilosidade. ⁽⁵⁾	144
Figura 33 - Estrutura das hormonas da tireoide e seus precursores. MIT, moniodotirosina; DIT, diiodotironina; rT3, 3,3',5'-L-triiodotironina; T3, 3,5,3'-L-triiodotironina; T4, 3,5,3',5'-L-tetraiodotironina ⁽⁴⁾	145
Figura 34 - Síntese das hormonas da tireoide nas células foliculares O iodo circulante é capturado pela glândula da tireoide que se concentra nas células foliculares e é transportado para o coloide. A TPO catalisa a iodação dos resíduos de tirosina no esqueleto da Tg, para formar MIT e DIT. Quando as células foliculares são estimuladas, gotículas de coloide são envolvidas por endocitose que, por sua vez, funde com lisossomas onde são quebradas as ligações peptídicas entre os resíduos iodados e Tg, de modo a libertar T3 e T4. ⁽⁸⁾	146
Figura 35 - Reações básicas de desidrogenases. A D1 catalisa tanto a desidiodação do anel externo (ORD) como do anel interno (IRD) dos vários derivados de iodotironinas; D2 tem apenas atividade ORD, com afinidade ligeiramente superior para a T4 em relação a rT3; D3 tem apenas atividade IRD e catalisa a inativação da T3 de uma forma mais eficiente que a T4. ⁽¹⁰⁾	147
Figura 36 - Regulação das hormonas da tireoide no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e mecanismos de feedback envolvidos ⁽¹²⁾ A principal regulação da atividade das hormonas da tireoide é efetuada através da secreção da TSH pela hipófise que, por sua vez, é regulada pela TRH, libertada pelo hipotálamo. Um aumento de TRH vai estimular a libertação da TSH. ^(1, 2) A TSH liga-se ao receptor específico TSHr, na membrana da tireoide, ativando o AMPc que, por sua vez, tem um efeito direto na produção de T3 e T4. Os níveis de T4 e T3 em circulação têm um efeito de feedback negativo inibindo diretamente a secreção de TSH, ou indiretamente através da regulação da biossíntese de TRH no hipotálamo. ^(2, 14)	149
Figura 37 - Relação inversa entre TSH no soro (expresso em log10) e fT4 em eutiroides, hipotireoide (primária), hipertireoide, e indivíduos eutiroides T4 suprimidos. Com a diminuição de T4, há um aumento dos níveis de TSH como resposta compensatória pela glândula pituitária. Por outro lado, com o aumento de T4 a glândula responde com a diminuição de TSH. ⁽¹²⁾	150
Figura 38 - Alterações dos níveis das hormonas da tireoide durante a gravidez. O aumento acentuado de hCG estabelece uma reação cruzada com TSHr, levando a um ligeiro aumento de fT4 e uma diminuição de TSH na primeira metade de gestação. O aumento acentuado de estrogénio estimula a produção de TBG e consequentemente o aumento de T4 total (TT4). Tg e o volume da tireoide (TV) mantêm-se praticamente inalterados ao longo da gestação. ⁽¹²⁾	161
Figura 39 - Variação dos níveis de hCG e TSH durante a gestação. No primeiro trimestre, há um aumento significativo na produção de hCG pela placenta, atingindo o seu pico máximo entre as 9 e 11 semanas de gestação. A concentração de hCG começa a diminuir gradualmente até atingir o ponto mais baixo às 20 semanas, teor que se mantém até ao final da gravidez. Ao longo da gravidez, a TSH tem uma evolução inversa. TSH diminui até às 10 semanas, a partir da qual começa a aumentar. ⁽⁴³⁾	162
Figura 40 - Metabolismo do iodo na grávida. A necessidade aumentada no abastecimento de iodo, para responder às necessidades de produção das hormonas da tireoide, deve-se ao aumento na produção das hormonas, na depuração renal de iodo elevada e à transferência transplacentária de hormonas e iodo. ⁽⁹⁾	163
Figura 41 - Algoritmo usado na avaliação de hipertireoidismo durante a gravidez. ⁽¹⁰⁾	165
Figura 42 - Algoritmo usado na avaliação de hipotireoidismo durante a gravidez. ⁽¹⁰⁾	168
Figura 43 - Transferência das hormonas maternas com um papel fundamental no desenvolvimento neurológico do feto. ⁽¹⁰⁾ A placenta é permeável à passagem da iodotironina T4 mas é impermeável a TSH e T3. ⁽³⁵⁾ Uma vez atravessada a barreira transplacentária, as hormonas da tireoide são transportadas pela TBPA para o cérebro do feto. ⁽¹⁰⁾	172
Figura 44 - Os gráficos A – F correspondem aos diferentes parâmetros da tireoide desde as 12 semanas após concepção até ao nascimento. Estes resultados foram obtidos <i>in vivo</i> por cordocentese, sem interferir com a ligação normal entre a mãe e o feto. As áreas sombreadas nos gráficos A e B	

mostram que T4 e fT4 fetal atingem concentrações maternas após o segundo trimestre, enquanto T3 e, especialmente, fT3 permanecem baixas durante toda a gravidez. O gráfico E chama especial atenção para os níveis muito elevados de TSH fetal que, na sua maioria, estão sempre superiores aos níveis maternos.⁽⁵⁶⁾ 175

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Procedimentos de colheitas para os diferentes tipos de amostras.	3
Tabela 2 - Equipamentos disponíveis na secção de Hematologia.	5
Tabela 3 - Métodos de deteção usados nos aparelhos <i>Sysmex XE-2100</i> e <i>XE-5000</i> para diferenciar e contabilizar as diferentes populações.	8
Tabela 4 - Canais de diferenciação por citometria de fluxo por laser semiconductor.	10
Tabela 5 - Alguns exemplos de <i>flags</i> dado pelo aparelho <i>Sysmex</i> e alarmes no SIS.	16
Tabela 6 - Alguns cenários que exigem confirmação por esfregaço de sangue.	20
Tabela 7 - Características macroscópicas avaliadas no exame macroscópico do líquido seminal. ^(6, 7)	24
Tabela 8 - Características microscópicas avaliadas no líquido seminal.	25
Tabela 9 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido pleural, associado a parâmetros bioquímicos, e respetivas considerações clínicas. ⁽⁸⁾	30
Tabela 10 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido ascítico, associado a parâmetros bioquímicos, e respetivas considerações clínicas. ⁽⁸⁾	30
Tabela 11 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido sinovial, associado a parâmetros bioquímicos, e respetivas considerações clínicas. ⁽⁹⁾	31
Tabela 12 - Valores de referência de velocidades de sedimentação. ⁽¹⁰⁾	32
Tabela 13 - Alguns parâmetros metabólicos de interesse da gasimetria.	38
Tabela 14 - Situações clínicas associadas às trocas gasosas e parâmetros metabólicos.	38
Tabela 15 - Possíveis causas associadas à rejeição de controlo.	39
Tabela 16 - Controlo de qualidade interno dos aparelhos usados na Hematologia.	40
Tabela 17 - Equipamentos disponíveis na secção de Microbiologia.	41
Tabela 18 - Critério de classificação das contagens de colónias nas placas de amostras de urina.	48
Tabela 19 - Meios a semear após positividade nos diferentes frascos de hemocultura.	57
Tabela 20 - Principais infeções oculares e auriculares e respetivos agentes etiológicos responsáveis. ⁽²⁷⁾ .	64
Tabela 21 - Alguns dos possíveis organismos fúngicos que podem causar infeção no Homem e as suas formas clínicas encontradas nos diferentes tipos de amostra. ⁽²⁸⁾	72
Tabela 22 - Locais de infeção onde possíveis parasitas podem ser encontrados, desde trofozoítos,istos, oócitos, esporos, formas adultas, larvas ou ovos, amastigotas e tripomastigotas. ⁽²⁹⁾	77
Tabela 23 - Equipamentos disponíveis na secção de Imunoquímica.	88
Tabela 24 - Parâmetros e respetivas metodologias processados nos aparelhos de química clínica <i>Architect Ci8200 #1</i> e <i>#2</i> da <i>Abbott Diagnostics</i>	93
Tabela 25 - Considerações clínicas de alguns parâmetros de bioquímica geral.	95
Tabela 26 - Considerações clínicas de algumas enzimas.	96
Tabela 27 - Considerações clínicas de alguns eletrólitos e iões.	97
Tabela 28 - Alguns parâmetros do metabolismo do ferro, estudo de anemias não-ferropénicas e ósseo, assim como respetivas considerações clínicas.	98
Tabela 29 - Marcadores cardíacos e respetivas considerações clínicas.	98
Tabela 30 - Marcadores tumorais e respetivos cancros onde os marcadores podem estar presentes.	99
Tabela 31 - Ação dos fármacos avaliados na monitorização terapêutica.	99

Tabela 32 - Parâmetros da função tiroideia, fertilidade e gravidez, DPN e serologia infecciosa analisados por CMIA no <i>Architect i2000 e Ci8200</i> da <i>Abbott Diagnostics</i> , e por EQL no <i>COBAS e411</i> da <i>Roche Diagnostics</i>	100
Tabela 33 - Possíveis doenças da função tiroideia diagnosticada com o auxílio dos parâmetros da função tiroideia.	101
Tabela 34 - Diferentes sintomas com causas alérgicas e possíveis Ig E específicos.	106
Tabela 35 - Zonas proteicas individuais e respetivas concentrações relativas (percentagem), detetadas por eletroforese capilar a 200 nm, no aparelho <i>Minicap Sebia</i>	108
Tabela 36 Diferentes frações separadas por eletroforese capilar das proteínas do soro e respetivas considerações clínicas. ⁽³²⁾	109
Tabela 37 - Listagem de autoanticorpos quantificados por ELISA e autoanticorpos pesquisados e titulados por IFI em lâmina.	111
Tabela 38 - Padrões de reconhecimento dos anticorpos antinucleares (ANA) em células HEp-2. Estes padrões podem incluir padrões homogêneos, periféricos, pontilhado e nucleolares.....	114
Tabela 39 - Alguns dos autoanticorpos detetados e titulados por IFI a partir das lâminas com secções criostáticas de tecidos de rim, fígado e estômago de rato.	116
Tabela 40 - Possíveis resultados das características macroscópicas da urina tipo II, obtidos pelo aparelho <i>URISYS 2400</i> , e respetivas considerações clínicas.....	121
Tabela 41 - Considerações clínicas e características macroscópicas da urina tipo II, obtidos pelo aparelho <i>URISYS 2400</i> , e respetivas considerações clínicas. ⁽³³⁾	122
Tabela 42 - Possíveis elementos figurados na urina observados no sedimento urinário e respetivas considerações clínicas. ⁽³⁴⁾	125
Tabela 43 - Testes por aglutinação direta para a pesquisa de antigénios febris segundo o <i>kit Serodiagnóstico Febril</i> da <i>BioSystems S.A.</i>	132
Tabela 44 - Calibração e Controlo de Qualidade Interno dos aparelhos usados na Imunoquímica.	134
Tabela 45 - Diagnóstico diferencial de tirotoxicose derivado da hiperfunção da tiroide e excesso de hormonas livre da tiroide em circulação não derivado da hiperfunção da glândula. ⁽¹⁹⁾	152
Tabela 46 - Diagnóstico diferencial de hipotiroidismo primário e hipotiroidismo secundário. ⁽¹⁹⁾	153
Tabela 47 - Intervalos de referência da função da tiroide recomendados para grávidas. ^(34, 38)	160
Tabela 48 - Principais alterações encontradas na função da tiroide ao longo da gravidez. ⁽¹⁰⁾	160
Tabela 49 - Riscos de doença na população associado à disponibilidade de iodo fora do intervalo recomendado. ⁽¹⁷⁾	171
Tabela 50 - Limites para suficiência de iodo numa população baseado na média da concentração de iodo urinário. ⁽⁶⁹⁾	188

ABREVIATURAS

- A -

Ab	Anticorpo
AFP	α -fetoproteína
Ag	Antigénio
ABBA	Anticorpos anti-banda em escova
AMA	Anticorpos anti-mitocôndrias
AMP	Anfetaminas
ANA	Anticorpos anti-nucleares
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
APCA	Anticorpos anti-parietais
ARA	Anticorpos anti-reticulina
ASMA	Anticorpos anti-músculo liso
ATPase	Adenosina Trifosfatase

- B -

BAR	Barbitúricos
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BASO	Basófilo
BD	Becton-Dickinson
BHI	Caldo de enriquecimento (<i>Brain and Heart Infusion</i>)
BNP	Péptido natriurético cerebral (<i>Brain Natriuretic Peptide</i>)
bpm	Batimentos por minuto
BZO	Benzodiazepinas

- C -

Ca²⁺	Cálcio Ionizado
CA 15.3	Antigénio hidrocarbonado 15.3
CA 19.9	Antigénio hidrocarbonado 19.9
CA 125	Antigénio hidrocarbonado 125
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos com padrão citoplasmático
CBC	Contagem de Sangue Completo (<i>Cell Blood Count</i>)
CEA	Antigénio carcinoembrionário
CIN	Gelose Yersinia
Cl⁻	Ião cloreto
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CMi	Concentração mínima inibitória
CMIA	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (<i>Chemiluminescent Microparticles Immunoassay</i>)
CMZ	Carbimazol
CO₂	Dióxido de Carbono
COC	Cocaína
COHb	Carboxi-hemoglobina
COS	Gelose de sangue
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno

- D -

D1	Iodotironina desiodase tipo I
D2	Iodotironina desiodase tipo II
D3	Iodotironina desiodase tipo III
DC	Corrente Contínua (<i>Direct Current</i>)
DI	Deficiência em Iodo
DIT	Diiodotirosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPN	Diagnóstico Pré-Natal

- E -

EBV	Vírus de Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
EDTA K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
EO	Eosinófilo
EQL	Eletroquimioluminescência
EUCAST	Comité Europeu de Avaliação de Susceptibilidade Antimicrobiana (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)

- F -

FSH	Hormona Foliculoestimulante
ft3	Triiodotironina livre
ft4	Tiroxina livre

- G -

GALT	Galactose-1-fosfato uridil-transferase
GGT	Gama-glutamil transferase
GVPC	Gelose Legionella

- H -

H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
H₂S	Sulfeto de hidrogénio
Hb	Hemoglobina
Hb A_{1c}	Hemoglobina Glicada
HBG	Hemoglobina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
HCO₃⁻	Ião Bicarbonato
HCT	Hematócrito
HDF	Focagem Hidrodinâmica (<i>Hydrodynamic Focusing</i>)
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
Hekt	Gelose Hektoen
HFR	Taxa de Alta Fluorescência (<i>High Fluorescence Ratio</i>)
HG	Hiperémese Gravídica (<i>Hyperemesis gravidarum</i>)
HHb	Deoxi-hemoglobina ou Hemoglobina Reduzida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPC	Células Progenitoras Hematopoiéticas
HPLC	Cromatografia Líquida de alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSV	Vírus Herpes Simplex
Ht	Hematócrito

- I -	
I	Intermédio
ICCIDD	<i>International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders</i>
ICT	Tecnologia de chip integrado (<i>Integrated Chip Technology</i>)
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IMC	Índice de Massa Corporal
IRD	Desiodação do anel interno (<i>Inner ring deiodination</i>)
IRF	Fração de Reticulócitos Imaturos (<i>Immature Reticulocyte Fraction</i>)
iQM	Gestão Inteligente da Qualidade (<i>Intelligent Quality Management</i>)
IMI	Canal das Células Progenitoras Hematopoiéticas
IG	Granulócito Imaturo (<i>Immature Granulocyte</i>)
ITU	Infeção do Trato Urinário
- K -	
K⁺	Ião potássio
KDa	KiloDalton
- L -	
LB	Lavado brônquico
LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano ou Liquor
LED	Díodo emissor de luz (<i>Light Emitting Diode</i>)
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
LH	Hormona Luteinizante
LFR	Taxa de Fluorescência Baixa (<i>Low Fluorescence Ratio</i>)
LJ-T	Meio de <i>Lowenstein-Jensen</i>
LYMPH	Linfócitos
- M -	
MCH	Hemoglobina Globular Média (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	Concentração de Hemoglobina Média (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)
MCK	Gelose MacConkey
MCV	Volume Globular Médio (<i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
MET	Metanfetaminas
MetHb	Metemoglobina
MFR	Taxa de Fluorescência Média (<i>Middle Fluorescence Ratio</i>)
MGIT	Tubos indicadores de crescimento de micobactérias (<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>)
MH2	Gelose Mueller Hinton 2
MIT	Monoiodotirosina
MMZ	Metimazol
MONO	Monócito
MPV	Volume Plaquetário Médio (<i>Mean Platelet Volume</i>)
MTD	Metadona
- N -	
Na⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NALC-NaOH	N-acetil-L-cisteína com hidróxido de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
nDNA	DNA nativo
NEUT	Neutrófilos
NH₃	Amônia
NRBC	Eritroblastos
- O -	
O₂Hb	Oxi-hemoglobina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPI	Opiáceos
ORD	Desiodação do anel externo (<i>Outter ring deiodination</i>)
OTV	Antibióticos oxecilina, teicoplanina e vancomicina
- P -	
pANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos com padrão perinuclear
PAPP-A	Proteína plasmática A associada à gravidez (<i>Pregnancy-associated plasma protein A</i>)
pCO₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCT	Plaquetócrito (<i>Plateletcrit</i>)
PDW	Coeficiente de Dispersão Plaquetária (<i>Platelet Distribution Width</i>)
PLT	Plaquetas
PLT-O	Contagem Ótica de Plaquetas
pO₂	Pressão parcial de oxigênio
PTH	Hormona Paratiroide
PVX	Gelose de chocolate e PolyViteX
- R -	
R	Resistente
RBC	Eritrócitos (<i>Red Blood Cells</i>)
RDW	Coeficiente de Dispersão Eritrocitária (<i>Red Cell Distribution Width</i>)
RET	Reticulócitos
RF	Corrente Radio-frequência (<i>Radio-frequency</i>)
RIQAS	Esquema de Avaliação de Qualidade Internacional da Randox (<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
RSV	Vírus Sincicial Respiratório (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)
rT3	Triiodotironina Reversa (3,3',5'-L-triiodotironina)
- S -	
S	Sensível
SB	Secreções Brônquicas
SCS	Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Carneiro
SGC	Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol
SIS	Programa de Validação Automática de Resultados
SLS	Surfatante Laurilsulfato de Sódio
SMAC	Gelose SMAC (MacConkey com sorbitol)
SNC	Sistema Nervoso Central
- T -	
T2	Diiodotironina (3,3'-diiodotironina)
T3	Triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina)

T4	Tiroxina (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina)
TACSP	Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública
TBG	Globulina de ligação à Tiroxina (<i>Thyroxine-Binding Globulin</i>)
TBPA	Transtiretina ou Pré-albumina de ligação à Tiroide (<i>Thyroid-Binding Prealbumin</i>)
TCA	Antidepressivos tricíclicos
TCBS	Meio TCBS (Tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose)
TFG	Taxa de filtração glomerular
Tg	Tiroglobulina
TgAb	Autoanticorpo de Tg
tHb	Hemoglobina Total
THC	Tetrahidrocanabinol
TPO	Tiroperoxidase
TPOAb	Autoanticorpo de TPO
TRE	Elemento Sensível da Tiroide (<i>Thyroid Responsive Elements</i>)
TRH	Hormona de libertação de Tirotropina (Tiroliberina)
TSH	Hormona Tiroestimulante (Tirotropina)
TSHr	Recetor da Hormona Tiroestimulante
TSHrAb	Autoanticorpos de TSHr
TSS	Técnica Superior de Saúde
TT4	T4 Total
 - U -	
UFC	Unidades Formadoras de colónias
ULSAM	Unidade Local de Saúde do Alto Minho
UK NEQAS	Serviço Nacional de Avaliação de Qualidade Externa do Reino Unido (<i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>)
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
 - V -	
VCA3	Gelose Chocolate e PolyViteX VCAT3
VS	Velocidade de Sedimentação
 - W -	
WBC	Leucócitos (<i>White Blood Cells</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
 - Z -	
ZN	Ziehl-Neelsen

RESUMO

O estágio profissional em Análises Clínicas, como parte integrante do plano de estudos do curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, teve lugar no Serviço de Patologia Clínica integrado na Unidade Local de Saúde do Alto Minho - ULSAM, em Viana do Castelo. Consistiu num período de trabalho nas áreas de Hematologia, Microbiologia e Imunoquímica.

O presente relatório tem como objetivo, transmitir a experiência adquirida, ao longo de mais de sete meses (aproximadamente 1080 horas), na execução das técnicas laboratoriais associada a todo o conhecimento teórico para permitir a interpretação dos resultados. Estão descritos todas as metodologias e fundamentos do laboratório nas diferentes áreas.

ABSTRACT

The internship in Clinical Laboratory, integrated in the studies plan of the Master course in Clinical Laboratory from the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon, took place in the Clinical Pathology Service integrated in the Alto Minho's Local Health Unit - ULSAM, in Viana do Castelo. It consisted in a working period in the Hematology, Microbiology and Immunochemistry sections.

This report intends to transmit the acquired experience, throughout more than seven months (approximately 1080 hours), on carrying out the laboratory techniques associated with all the theoretical knowledge to allow the interpretation of results. All the methodologies are described as well as the laboratory grounds in the different sections.

INTRODUÇÃO GERAL

O Serviço de Patologia Clínica do ULSAM é constituído por quatro secções: Hematologia, Microbiologia, Imunoquímica e Imuno-Hemoterapia, que tem como diretor de serviço o Doutor José António Mota Freitas. Aquando do estágio, a secção de Hematologia estava sob a orientação da Doutora Maria José Gaião, a secção de Microbiologia da Doutora Adelina Santos, a secção de Imunoquímica da Doutora Cristina Maldonado e a secção de Imuno-Hemoterapia da Doutora Graça Soberal. Além das secções descritas, o serviço conta com a colaboração do pessoal administrativo, sala de colheitas, receção, gabinete do Diretor Técnico, biblioteca e armazém.

A principal função do Serviço de Patologia clínica consiste em dar resposta aos pedidos solicitados pelos clínicos, executando ensaios laboratoriais de forma fiável e atempada, assim como esclarecer os clínicos a nível do painel analítico, princípios de metodologia de diagnóstico e colaboração na interpretação dos resultados analíticos.

No ULSAM está integrado o Hospital de Dia, de modo que amostras vindas deste serviço têm prioridade para assegurar que os doentes se encontram nas condições ideais antes de iniciar os tratamentos. Além do hospital de dia, outros serviços poderão apresentar urgência nas amostras vindas dos cuidados intensivos e intermédios e unidade polivalente.

1. PRÉ-ANALÍTICA

A fase pré-analítica compreende a preparação do doente, a anamnese, a colheita, o registo, a triagem e armazenamento das amostras, ou seja, todo o processo que antecede o processamento das amostras. Regra geral, é na fase pré-analítica que ocorre um maior número de erros daí que é necessário tomar as devidas precauções para os evitar. No laboratório cada fase é importante visto que os erros poderão levar a alterações dos resultados e, consequentemente, a sua interpretação será errada.

1.1. COLHEITA DE AMOSTRAS

O processo de colheita de amostras é um dos passos mais importantes a executar (Tabela 1). Qualquer erro neste processo vai originar resultados não reais podendo levar a falsos diagnósticos. No caso particular de colheita de uma amostra para exame microbiológico deve se ter os devidos cuidados de assepsia, de forma a reduzir possíveis contaminações e ser representativa do local em estudo; e deve ser transportada em tempo adequado ao laboratório em meio e recipiente estéril.

Tabela 1 Procedimentos de colheitas para os diferentes tipos de amostras.

Amostras	Procedimento de Colheita
Sangue	A colheita é feita por punção venosa pela técnica de colheitas. Deve garrotar o braço acima da zona da punção e selecionar uma veia palpável. Desinfeta-se o local da punção com álcool a 70% e introduz-se a agulha num ângulo de 15 a 45°. Assim que o tubo começar a fluir para o tubo, o doente deve abrir a mão. Assim que possível retirar o garrote (o braço não deve permanecer garrotado mais de 1 minuto). Após colher a quantidade necessária, retirar a agulha e fazer pressão sobre a punção com uma compressa.
Urina	<i>Jacto médio</i>: Imediatamente após a higiene com água e sabão não desinfetante, rejeitar o primeiro jacto para remover a maioria dos contaminantes da uretra; colhe-se o segundo jacto sem interrupções da micção para um recipiente estéril; <i>Saco coletor</i>: É ideal para crianças. Após lavagem cuidadosa adapta-se o coletor aos genitais. Deverão ser substituídos a cada 30 minutos, procedendo sempre a nova lavagem; <i>Algáliação</i>: A colheita é feita através de cateterização uretral. Colhe-se diretamente do tubo da algália e nunca do saco coletor. Deve-se clampar o cateter, nunca por mais de 30 minutos, desinfetar o local da amostragem para punção com álcool a 70% e colher a urina. Transfere-se a urina para um recipiente estéril; <i>Punção suprapúbica</i>: Para colheitas difíceis procede-se à punção externa do abdómen para a bexiga, após desinfecção com álcool. Para exame bacteriológico, fornece uma amostra completamente livre de contaminações. Esta é a única amostra própria para cultura de anaeróbios.
Fezes	- Sempre que possível colher três amostras em dias consecutivos, do tamanho de uma noz, para uma embalagem esterilizada ou em zaragatoa rectal. - Transporte: enviar para o laboratório dentro de uma hora para ser processado.

Tabela 1 (Continuação)

Amostras	Procedimento de Colheita
Vias Respiratórias	▪ <i>Secreções brônquicas</i>: são feitas em frascos esterilizados, podendo ou não ser induzida com soro fisiológico mas o importante é não conter saliva. ▪ Transporte: enviados para o laboratório no máximo até uma hora. Se o envio para o laboratório for superior a uma hora, devem ser refrigeradas a 4° a 8° C, no máximo durante 24h.
Hemoculturas	▪ Amostras colhidas por punção venosa após desinfecção da zona a picar com álcool e de seguida, com solução iodada. Antes de injetar o sangue nos frascos, desinfeta-se a boca do frasco com álcool (ANEXO 1); ▪ Nos adultos são colhidos três frascos, um frasco para anaeróbios e dois frascos para aeróbios, aproximadamente 8 mL cada. Nas crianças é colhido apenas um frasco para aeróbios, aproximadamente 3 mL.
LCR	▪ Colheita por punção lombar entre a terceira, quarta ou quinta vertebra lombar, ou por punção suboccipital. Este procedimento é feito pelo clínico ou outro profissional competente. São colhidos três tubos estéreis, o primeiro para a bioquímica, o segundo para hematologia e o terceiro para a microbiologia (amostra menos contaminada). ▪ Transporte: Devem ser enviados imediatamente para o laboratório para serem processados.
Líquidos Ascítico, Pleural e Sinovial	▪ Colheita por meio de punção na cavidade peritoneal (paracentese), na cavidade pleural (toracentese) e na cavidade da articulação (artrocentese) efetuada pelo próprio clínico ou profissional competente para a função. ▪ Transporte: Devem ser enviados de imediato para o laboratório para serem processados.
Exsudados Vaginais e Endocervicais	▪ A mulher não deve fazer a sua higiene íntima de manhã, não deve usar cremes vaginais na véspera e abster-se de relações sexuais nas 24h precedentes; ▪ Nos exsudados cérvico-vaginais, as secreções vaginais são obtidas por zaragatoa, que é inserida no meio de transporte adequado, enquanto exsudados endocervical, a mucosa ectocervical é obtido por zaragatoa, com o colo do útero exposto com um espéculo; ▪ Transporte: Devem ser transportadas de imediato para o laboratório.
Exsudados Purulentos	▪ Muitas vezes, a quantidade de amostra possível a colher é muito pequena, daí que é preferível obter a amostra por aspiração, biopsia ou raspagem do que por zaragatoa, após desinfecção para aspiração (processo fechado) ou lavagem das infeções superficiais com soro fisiológico (processo aberto).
Cateter Intravenoso	▪ Desinfeta-se a pele junto ao cateter com solução de iodo e remove-se do cateter. Este é enviado ao laboratório em frasco esterilizado. Este procedimento é realizado por um profissional competente.

1.2. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

Antes de processar qualquer amostra, é necessário confirmar que determinadas condições são cumpridas, nomeadamente requisição completa idealmente com as indicações clínicas do diagnóstico e terapêutica; produtos devidamente identificados e acondicionamentos em recipientes estéreis e bem fechados; transporte para o laboratório em tempo adequado; amostras não contaminadas como, por exemplo, urina contaminada com fezes ou vice-versa; uso de anticoagulantes corretos e volume adequado. Amostras hemolisada ou lipémicas passam nos critérios. Caso algum destes critérios não seja cumprido, a amostra é rejeitada e não processado devendo pedir-se nova amostra.

2. HEMATOLOGIA

À secção de Hematologia chegam vários tipos de amostras biológicas para análise, desde tubos de sangue total em EDTA tripotássico (EDTA K3) para contagens hematológicas e quantificação de hemoglobina glicada (Hb A_{1c}), em citrato para velocidades de sedimentação, tubos de heparina lítio para quantificação de cálcio ionizado (Ca²⁺) e gasimetrias; amostras de líquidos biológicos patogénicos (ascítico, sinovial e pleural) em tubos com EDTA K3 e ainda, líquidos biológicos (liquor e seminal) em tubos e frasco estéreis, respetivamente.

Esta secção encontra-se dividida em duas salas: a sala principal onde estão disponibilizados todos os equipamentos para análise (Tabela 2) e a sala de microscópios para observação de esfregaços de sangue.

Tabela 2 - Equipamentos disponíveis na secção de Hematologia.

Equipamento	Funcionalidade
<i>AdamsTM A_{1c} HA-8160</i>	Hb A _{1c} ; Frações de Hb
<i>GEM Premier 3500</i>	Gasimetria
<i>GEM Premier 4000</i>	
<i>Hematek[®]</i>	Corar esfregaços de sangue
<i>Shadon Cytospin 2</i>	Citocentrífuga
<i>Sysmex XE-2100</i>	Contagem celulares: Hemograma
<i>Sysmex XE-5000</i>	Contagens celulares: Hemograma; Líquidos Biológicos
<i>VES-MATIC 20</i>	Velocidade de Sedimentação

Durante o período de tempo na secção foi possível integrar a rotina manuseando os diferentes equipamentos, tanto no processamento das amostras, como na sua manutenção na execução e observação de esfregaços de sangue periférico e dos diversos líquidos biológicos.

A secção de Hematologia é constituída por dois Técnicos Superiores de Saúde (TSS) e dois Técnicos da Análises Clínicas e Saúde Pública (TACSP). As funções estão distribuídas, mais ou menos, de igual forma pelos técnicos. Os TACSP têm como função a verificação da integridade e qualidade das amostras, assim como, a triagem das amostras e distribuição das mesmas pelos diferentes aparelhos automáticos. Coram e observam lâminas de esfregaços de sangue e líquidos biológicos. Procedem à manutenção dos aparelhos e executam os respetivos CQI. Asseguram ainda, a execução analítica das amostras mediante as listas de trabalho e validam os vários resultados, assim como verificam as faltas no final do dia ou turno, para garantir que todos os testes foram efetuados. Finalmente, devem garantir que as amostras são devidamente acondicionadas e conservadas. Relativamente aos TSS, além das funções mencionadas anteriormente, estes têm responsabilidade de organizar e coordenar a secção, assim como tomar notas das ocorrências ao longo do dia. Avaliam os resultados do controlo de qualidade e, sempre que necessário, entram em contato com os vários representantes dos sistemas utilizados no laboratório.

2.1. HEMOGRAMA

O hemograma é dos testes mais solicitados e mais completos na hematologia. Este fornece informações qualitativas e quantitativas sobre as características das células sanguíneas de um indivíduo. A análise do sangue periférico pretende responder a questões como; se a medula está a produzir um número suficiente de células maduras das diferentes linhagens; se os processos de proliferação, diferenciação e aquisição de funções de cada tipo celular estão a desenvolver-se de maneira adequada. O hemograma permite a contagem, o estudo da morfologia e constituição dos diferentes elementos figurados no sangue.

A amostra é colhida segundo o Manual de Colheitas em tubos de EDTA K3, devidamente identificado com etiqueta com código de barras para facilitar a leitura pelo

equipamento automatizado. Os aparelhos destinados para os hemogramas são o *Sysmex XE-2100* (Figura 1) e *XE-5000*, ambos acoplados a um computador. *XE-2100* e *XE-5000* fornecem uma contagem completa do sangue com o diferencial dos leucócitos, incluindo granulócitos imaturos, células progenitoras hematopoiéticas, e ainda glóbulos vermelhos nucleados e parâmetros de reticulócitos.



Figura 1 - Analisador automático de hemogramas *Sysmex XE-2100*.

As amostras são processadas no *Sysmex XE-2100* para obter hemogramas e contagem de plaquetas, mas na suspeita da presença de células vermelhas imaturas ou por pedido do clínico, são processados no *Sysmex XE-5000*.

2.1.1. Princípio de Funcionamento

O sistema automatizado do *XE-2100* e *XE-5000* da *Sysmex Corporation* utiliza o poder das tecnologias de citometria de fluxo fluorescente e focagem hidrodinâmica permitindo classificar populações normais de leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT), diferenciando-as das populações anormais reduzindo assim o número de intervenções manuais. Dependendo do que é solicitado pelo clínico o processamento da amostra pode ser dividido em 7 partes, com diluições e métodos de detecção diferentes.

Tabela 3 - Métodos de detecção usados nos aparelhos *Sysmex XE-2100* e *XE-5000* para diferenciar e contabilizar as diferentes populações.

Canal	Método de Detecção	Parâmetros*	
IMI	RF/DC	HPC	
RBC/PLT	Focagem Hidrodinâmico	RBC, HCT, MCV, RDW, PCT, PDW, MPV	MCH MCHC
HGB	SLS-Hb	HBG	
5Diff	Citometria de Fluxo com Laser Semicondutor	NEUT, LYMPH, MONO, EO, IG	
WBC/BASO		WBC, BASO	
NRBC		NRBC	
RET/PLT-O		RET, PLT-O	

*Não estão incluídos todos os parâmetros quantificados.

I. Canal IMI - Detecção RF/DC

O aparelho está equipado com um canal de informação mieloide imatura (IMI) onde são detetadas seletivamente células da série granulocítica imatura que, normalmente, não estão em circulação no sangue periférico. Este canal usa rádio-frequência e corrente contínua (RF/DC) como método de detecção (ANEXO 2). As células suspensas em reagente hemolítico atravessam o orifício no interior da câmara de detecção alterando as correntes. O tamanho das células vai alterar a DC enquanto RF é alterada pela estrutura e densidade celular. Estas alterações são detetadas e registadas sob a forma de impulsos elétricos. Por fim, atendendo à amplitude destes impulsos, o detetor combina os métodos de modo a formar um diagrama de dispersão (*scattergram*), refletindo o tamanho e densidade celular simultaneamente.

O canal IMI explora a diferença entre granulócitos maduros dos imaturos, sendo que estes últimos possuem menor teor em colesterol e maior em fosfolípidos (Figura 2).

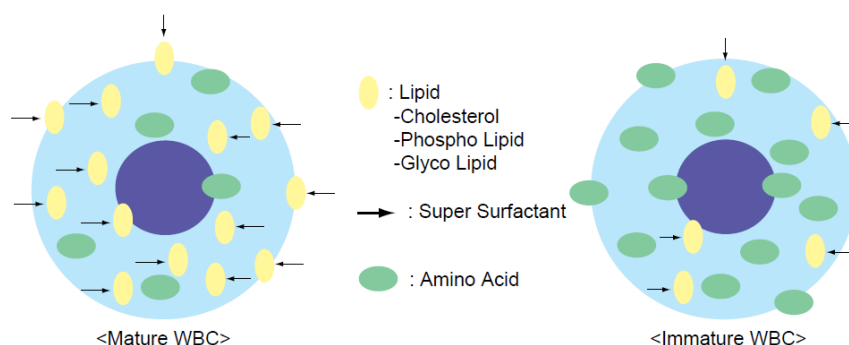


Figura 2 - Composição de fosfolípidos nos granulócitos imaturos e maduros.

Após exposição ao reagente hemolítico, a membrana das células granulocíticas é danificada. O surfatante não-iónico polioxietileno e os aminoácidos contendo enxofre

presentes repõem a membrana dos imaturos, ficando apenas o núcleo dos maturos exposto, permitindo uma distribuição diferente no *scattergram*.

II. Canal RBC/PLT - Focagem Hidrodinâmica

O canal RBC/PLT faz a contagem e determina o tamanho dos eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT) usando os métodos de impedância e focagem hidrodinâmica (HDF) (ANEXO 3), tendo como objetivo minimizar os fenômenos de perda e variação de impulsos devido ao fluxo não axial e a recirculação de células.

III. Canal HBG – Método de SLS-Hb

O canal HBG usa o método de SLS-Hb para determinação da hemoglobina. O método utiliza o surfatante Laurilsulfato de Sódio (SLS) livre de cianeto, para não correr o risco de toxicidade. A hemoglobina (Hb) é analisada num canal separadominimizando a interferência de concentrações elevadas de leucócitos.

Na presença do reagente hemolítico dá-se a lise dos eritrócitos, a alteração da conformação da molécula de globina, a oxidação do ferro e a formação do complexo SLS-Hb (ANEXO 4). O produto final é um composto colorido que é medido espectrofotometricamente pela leitura da absorvância do pico a 535 nm e do pico adjacente a 560 nm.

IV. Canal 5Diff, WBC/BASO, NRBC e RET/PLT-O - Citometria de Fluxo por Laser Semicondutor

Os canais 5Diff, WBC/BASO, NRBC e RET/PLT-O usam como método de detecção a citometria de fluxo por laser semicondutor (ANEXO 5) com o corante altamente específico de polimetina.

O feixe de laser semicondutor é emitido para as células sanguíneas que atravessam a câmara de fluxo separando-as usando três sinais:

- *forward scatter*: indica o volume da célula, sinal recebido pelo fotodíodo;

- *side scatter*: indica estrutura interna da célula, como a lobularidade e grânulos no citoplasma, sinal recebido pelo fotomultiplicador;

- *side fluorescence*: indica a quantidade de material genético presente (DNA e RNA), sinal recebido pelo fotomultiplicador.

A luz recebida pelo detetor é convertida em impulsos elétricos de modo a formar um *scattergram* para análise de acordo com as diferentes características celulares. Os diferentes canais de diferenciação celular usam diferentes sinais para a separação celular (Tabela 4).

Tabela 4 - Canais de diferenciação por citometria de fluxo por laser semiconductor.

Canal	Células Diferenciadas	Sinais
5Diff	Neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e granulócitos imaturos.	<i>Side scatter e side fluorescence</i>
WBC/BASO	Diferenciação entre as células leucocitárias e os basófilos	<i>Forward scatter e side scatter</i>
NRBC	Eritroblastos (NRBC)	<i>Side fluorescence e forward scatter</i>
RET	Reticulócitos	<i>Forward scatter e side fluorescence</i>

Canal 5Diff

No canal 5Diff é feita a diferenciação leucocitária em linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e granulócitos imaturos. Neste canal são analisados sinais de *side scatter* e *side fluorescence*.

O reagente hemolítico leva à lise completa dos eritrócitos e plaquetas e à lise parcial das células leucocitárias. Um segundo reagente, com corante de polimetina, cora os ácidos nucleicos e organelos citoplasmáticos dos leucócitos. Um ácido orgânico presente no reagente liga-se aos grânulos dos eosinófilos, permitindo a sua diferenciação dos neutrófilos, por meio de um sinal de *side scatter* maior.

Quando as células são expostas ao laser a 633 nm, a intensidade do sinal *side scatter* é tanto maior quanto maior a complexidade nuclear e de granulação, assim como o *side fluorescence* é tanto maior quanto maior o seu conteúdo em RNA/DNA (Figura 3).

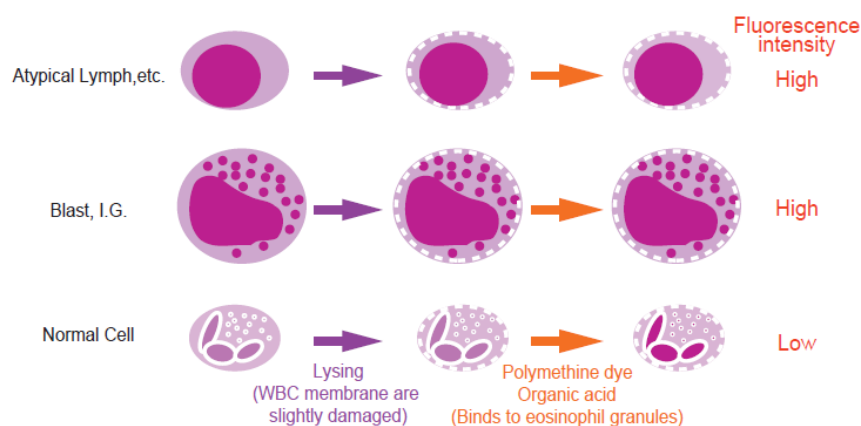


Figura 3 - Mecanismo de ação do canal 5Diff.

Canal WBC/BASO

No canal WBC/BASO é feita a diferenciação entre as células leucocitárias e os basófilos usando sinais *forward scatter* e *side scatter*.

Um reagente hemolítico com pH ácido causa a lise e redução do volume dos eritrócitos, plaquetas e células brancas à exceção dos basófilos. São produzidos eritrócitos e plaquetas fantasmas e os núcleos dos leucócitos ficam desprotegidos (Figura 4).

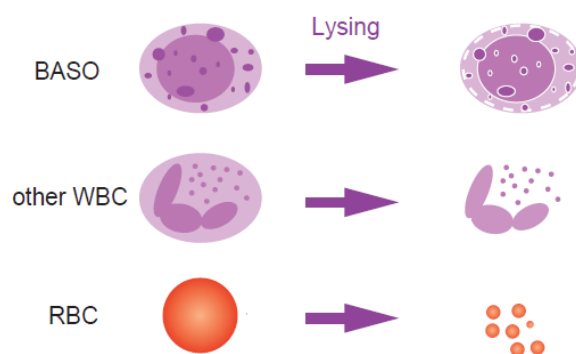


Figura 4 - Mecanismo de ação no canal WBC/BASO.

Assim sendo, os basófilos e as outras células são diferenciadas pelas diferenças volumétricas encontradas e o total da contagem de leucócitos resulta do somatório de basófilos e núcleos desprotegidos.

Canal NRBC

No canal NRBC é feita a diferenciação dos eritroblastos (NRBC) em circulação no sangue periférico usando a informação de *side fluorescence* e *forward scatter*.

O reagente hemolítico com pH ácido causa a redução do volume dos eritrócitos e plaquetas, e lise parcial da membrana dos leucócitos. A membrana dos eritroblastos é hemolisada ficando apenas o núcleo (Figura 5). Um segundo reagente, com corante fluorescente polimetina, cora os ácidos nucleicos das células brancas e eritroblastos. Deste modo, com base nas diferenças da intensidade de fluorescência, surgem duas populações distintas.

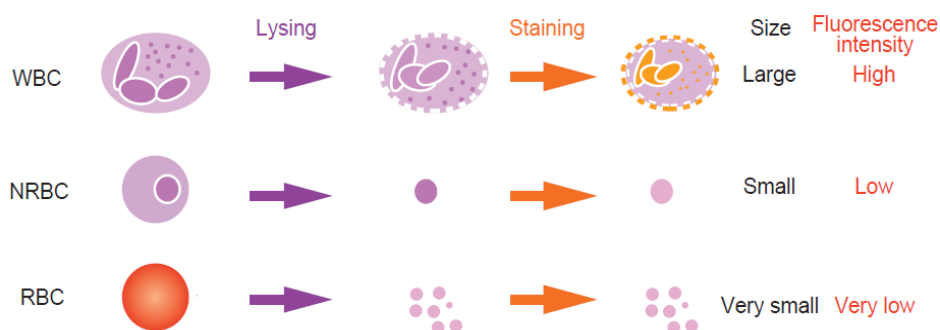


Figura 5 - Mecanismo de ação no canal NRBC.

Este canal permite a separação dos leucócitos e eritroblastos de forma confiável, dado que os leucócitos apresentam uma maior quantidade de material genético e, conseqüentemente, maior fluorescência que os eritroblastos, recebida pelo *side fluorescence*. Por outro lado, como os eritroblastos são menores do que os leucócitos, na separação destas populações resulta um padrão distinto. O equipamento tem a particularidade de corrigir automaticamente a contagem de WBC e linfócitos quando os eritroblastos estão presentes.

Canal RET

No canal RET são diferenciados os reticulócitos em circulação usando os sinais *forward scatter* e *side fluorescence*. Não havendo interferências na análise por células nucleadas como leucócitos, eritroblastos e inclusões citoplasmáticas como é o caso de corpúsculos de Howel-Jolly, a contagem de reticulócitos torna-se mais precisa.

Os corantes presentes no reagente penetram a membrana das células corando o RNA nos reticulócitos e DNA/RNA nas restantes células nucleadas (Figura 6). Os reticulócitos são separados das células vermelhas maduras de acordo com as diferenças no conteúdo em RNA e das células nucleadas pelas diferenças no conteúdo em DNA/RNA.

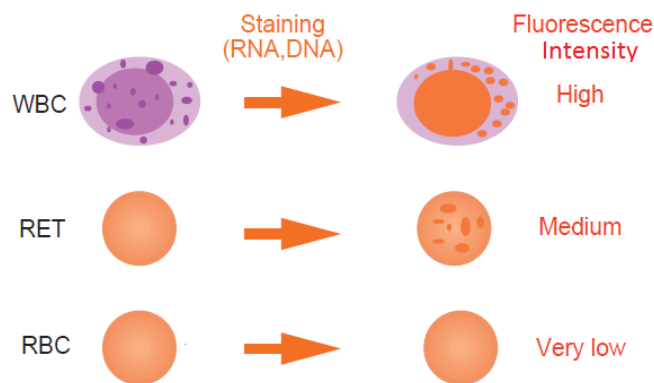


Figura 6 - Mecanismo de ação do canal RET.

Quanto maior a quantidade em ácidos nucleicos numa célula, mais forte será o sinal *side fluorescence*. Por sua vez, quanto maior a célula, mais forte será o sinal de *forward scatter*. A quantidade de RNA presente nos reticulócitos provoca diferenças nas quantidade de fluorescência útil para diferenciar os reticulócitos imaturos (IRF), parâmetro útil para fornecer informação sobre a atividade medular. Além disso, a contagem ótica de plaquetas (PLT-O) permite uma contagem mais precisa das plaquetas quando o método de impedância apresenta interferências, tais como, plaquetas gigantes e/ou eritrócitos macrocíticos.

2.1.2. Interpretação de Histograma

A interpretação de um hemograma (Figura 7), tanto na série vermelha como na série branca ou até plaquetária, pode ajudar a estabelecer diagnóstico. Pode ser útil no seguimento de tratamentos como radio ou quimioterapia e, é um indicador de bom prognóstico na terapêutica de alguns destes estados patológicos. O resultado de um hemograma é composto por eritograma, leucograma, plaquetas, reticulócitos e granulócitos imaturos.

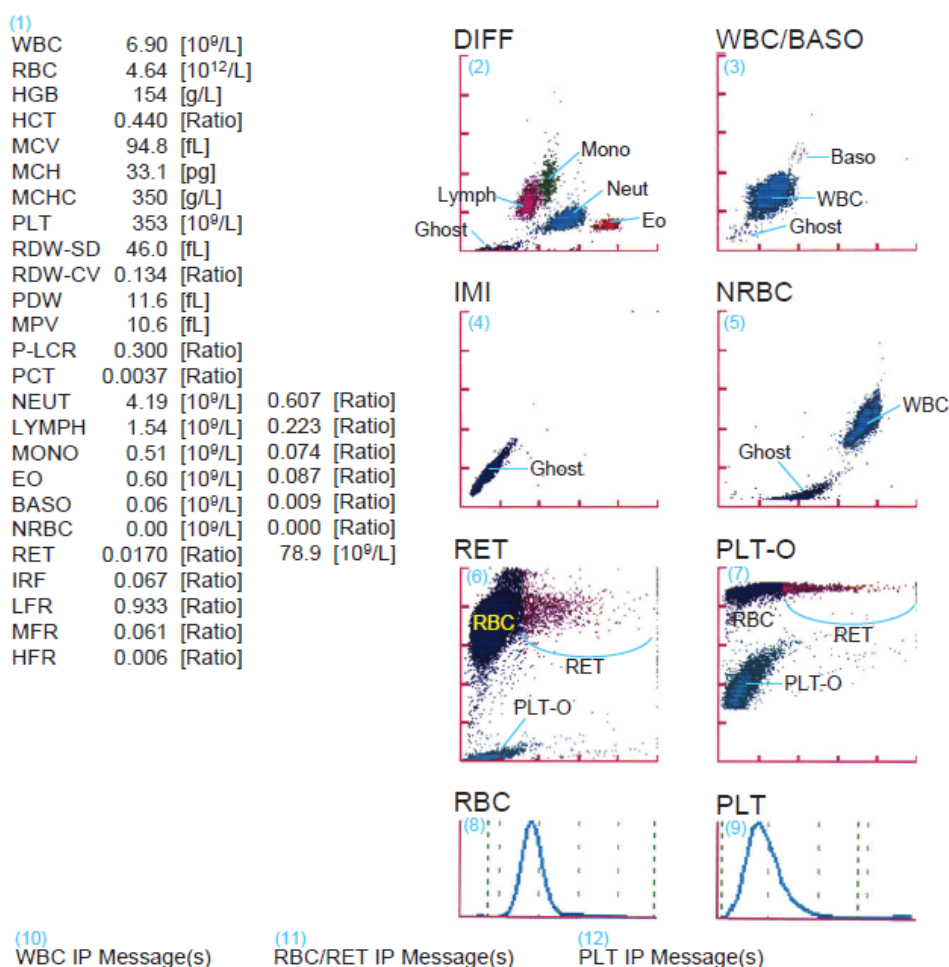


Figura 7 - Exemplo de um resultado de hemograma de uma amostra normal: (1) Dados de análise; (2) Diagrama de dispersão 5Diff; (3) Diagrama de dispersão WBC/BASO; (4) Diagrama de dispersão IMI; (5) Diagrama de dispersão NRBC; (6) Diagrama de dispersão RET; (7) Diagrama de dispersão PLT-O; (8) Histograma de RBC; (9) Histograma de PLT; (10) Mensagem do sistema de WBC; (11) Mensagem do sistema de RBC/RET e (12) Mensagem do sistema de PLT.

Por sua vez, os resultados de hemograma são construídos a partir de histogramas (Figura 7(8)). Estes histogramas correspondem a representações gráficas de frequência de células *versus* tamanho fornecendo informações sobre as diferentes populações celulares, podendo retratar a presença de subpopulações servindo como meio de comparação dos tamanhos de células do paciente com os da população normal. Desvios num sentido ou outro da média pode ser importante para o diagnóstico. Numa população de células homogênea a curva assume uma distribuição gaussiana.⁽¹⁾

Na presença de eritrócitos maiores do que o normal a curva do histograma está mais desviada para a direita, como acontece em anemias megaloblásticas. Se os eritrócitos são menores que o normal, a curva está mais desviada para a esquerda, como

é o caso de anemia ferropénica não tratada que pode ser confirmada com hemoglobina e hematócrito baixo. Após tratamento adequado a curva move-se em direção da normalidade. Uma distribuição bimodal pode ser vista em situações de doença de aglutininas frias, após uma transfusão de eritrócitos normal numa pessoa com eritrócitos com tamanho anormal, na presença de fragmentos eritrocitários ou aglutinação.⁽¹⁾

Os índices hematimétricos são úteis na avaliação e no acompanhamento destas alterações eritrocitárias. O conhecimento dos valores de referência permite classificar tais aumentos ou diminuições em qualquer um desses parâmetros e associá-los a alguma eventual patologia.

O equipamento quantifica os parâmetros RBC, hematócrito (HCT), volume globular médio (MCV) por HDF e HGB por SLS-Hb necessários para a determinação da hemoglobina globular média (MCH) e a concentração de hemoglobina globular média (MCHC). O coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW) em conjunto com MCV refletem variações no tamanho dos eritrócitos onde estão correlacionados em vários tipos de anemias. Eritrócitos com RDW normal são de natureza homogênea e apresentam muito pouca anisocitose no esfregaço de sangue periférico. Eritrócitos com RDW aumentado são heterógenos e exibem um elevado grau de anisocitose. O RDW encontra-se aumentado em situações de deficiência de ferro, vitamina B₁₂ e ácido fólico. Em hemoglobinopatias, o RDW encontra-se aumentado em proporção do grau de anemia que acompanha a doença.⁽¹⁾

Quanto à série branca, apesar de todos os leucócitos agirem na defesa do organismo, as suas funções diferem e permitem diferenciar estados infecciosos, leucémicos ou traumatológicos. Nos diagramas de dispersão existe uma correlação entre os sinais recebidos e a distribuição das populações. Os linfócitos são tipicamente pequenos e com forma regular. Em comparação com as outras células, são menores em volume e absorvem menos daí que se encontram distribuídos na parte inferior do *scattergram*. Nos neutrófilos a absorvância é tanto maior quanto maior for a presença de grânulos citoplasmáticos e núcleos segmentados.⁽¹⁾

Nos resultados do hemograma aparecem as mensagens do sistema quando são ativados *flags*, os quais alertam para resultados fora dos valores de referência ou para alterações nos histogramas que evidenciam possíveis alterações morfológicas. A continuação do estudo do hemograma é feita, quando necessário, através da observação

de esfregaço de sangue periférico e por interação com resultados obtidos nas outras secções.

2.1.3. Gestão de Resultados

Quando os resultados obtidos no *Sysmex XE-2100* e/ou *XE-5000* se encontram fora dos limites de referência para qualquer dos parâmetros, pode ser necessário repetir a análise, de preferência no *XE-5000*, para confirmação ou rejeição do resultado. O equipamento para além de sinalizar os parâmetros quando se encontram altos ou baixos também apresenta *flags* para diversas patologias associadas. Os *delta checks* são outro método de controlo para comparação dos leucócitos, hemoglobina, MCV e valores de plaquetas dos pacientes com resultados anteriores. Se a diferença entre as duas leituras for maior que os limites definidos pelo laboratório, o resultado é marcado e retido na bolsa do SIS para revisão.

Foram estabelecidos uma série de regras como critérios de validação para detetar irregularidades e quando uma regra é violada é ativado um alarme no SIS. Assim, um resultado fora dos intervalos de referência ativa *flags* no aparelho e/ou alarmes no SIS (Tabela 5). Estes resultados ficando presos na bolsa do SIS para se proceder à devida ação e ser validado manualmente pela técnica. Se não for detetada nenhuma irregularidade pelo aparelho, nem nenhuma regra violada no SIS, todos os resultados serão validados automaticamente.

Tabela 5 - Alguns exemplos de *flags* dado pelo aparelho *Sysmex* e alarmes no SIS.

Flags/Alarmes	Valores	Observações
Microcitose	MCV < 70 fL	-
Macrocitose	MCV > 110 fL	-
Hipocromia	MCHC < 290 g/L	-
Anemia	HGB < 100 g/L	-
Eritrocitose	RBC > $6,50 \times 10^{12}/L$	-
Agregação RBC?	MCHC > 40 g/dL RBC $\leq 0,5 \times 10^{12}/L$	Repetir amostra após aquecimento a 37°C.
Interferência de HGB/turvação?	MCHC > 365 g/L (Sem aglutinação)	HGB falsamente elevado devido a lípidos elevados, proteínas no plasma, WBC elevado. Causas prováveis: hemólise, lipémia, RBC: aglutininas frias.

Tabela 5 (Contiunuação)

Flags/Alarmes	Valores	Observações
Deficiência em ferro?	MCHC < 310 g/L MCV < 75fL RDW > 15,0%	-
Deficiência em HGB?	RDW ≤ 15,0% MCV < 75fL	-
Fragmentos?	-	Fazer esfregaço para observar a morfologia dos eritrócitos.
Trombocitose	PLT > 450 × 10 ⁹ /L	Pseudotrombocitose: devido a fragmentos RBC ou extrema microcitose.
Trombocitopenia	PLT < 150 × 10 ⁹ /L	Possível aglutinação plaquetária. Fazer esfregaço. Pseudotrombocitopenia: devido a plaquetas gigantes ou agregados de plaquetas.
Agregados plaquetários?	-	Fazer esfregaço.
Blastos?	-	Fazer esfregaço.
IG?	>3%	Fazer esfregaço.
Desvio à esquerda?	-	Possível presença de neutrófilos em banda. Fazer esfregaço.
Delta check + MCV	-	Confirmar a identidade do doente. Erro pode ser devido a má agitação, erros de aspiração ou aglutininas frias. Deve-se confirmar a identidade pois pode corresponder a uma troca de amostra.

2.2. ESFREGAÇOS DE SANGUE PERIFÉRICO

Sempre que necessário, quer seja a pedido do clinico devido a alarmes dado pelo equipamento ou outras suspeitas, é efetuado o esfregaço de sangue periférico e a observação ao microscópio ótico com contagem manual do diferencial leucocitário e observação da morfologia celular. A observação microscópica do esfregaço de sangue fornece informação relevante sobre todos os elementos figurados no sangue.

É importante ter em atenção alterações nas três linhagens. Na linhagem eritrocitária podem observar-se alterações morfológicas, nomeadamente no tamanho, cor e presença de inclusões e alterações no estado de maturação. Na linhagem leucocitária faz-se a contagem leucocitária e observam-se alterações morfológicas, como tamanho, aspeto da cromatina, forma do núcleo, presença de nucléolos, razão núcleo/citoplasma, presença ou ausência de grânulos, basofilia do citoplasma e o estado de maturação dos leucócitos. Na linhagem plaquetária, observam-se alterações

morfológicas, como o tamanho, a presença de agregados plaquetários e alterações relativamente ao número de plaquetas.

2.2.1. Preparação de Esfregaço de Sangue

Podem ser usadas amostras de sangue fresco ou então com anticoagulante EDTA K3. No caso deste último, idealmente, o esfregaço deve ser feito até 1 – 2h após colheita, caso contrário, os elementos figurados do sangue total começam a ficar distorcidos quando expostos ao anticoagulante durante muito tempo. Antes de preparar o esfregaço de sangue a amostra deve estar entre 18°C a 25°C e devidamente homogeneizada.

Numa lâmina devidamente identificada coloca-se na margem uma gota de sangue, usando um aplicador de gota (Figura 8).

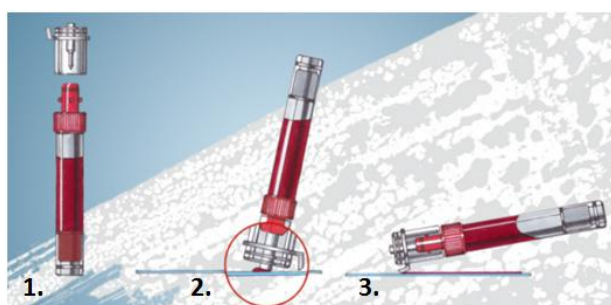


Figura 8 - Esfregaço de sangue periférico com o auxílio de um aplicador de gota de sangue com espalhador, *Haemo-Diff* da SARSTEDT. **1.** Colocar aplicador no tubo; **2.** Tudo é invertido para dispensar uma gota de sangue na lâmina; **3.** Usar o espalhador para fazer o esfregaço.⁽²⁾

Os aplicadores *Haemo-Diff* da SARSTEDT têm uma cânula que penetra a membrana na tampa do tubo de colheita onde dispensa uma gota de sangue na lâmina. A utilização destes aplicadores eliminam a necessidade de abrir os tubos de colheita e contaminar a amostra e o desperdício de mais material para transferir a gota.⁽²⁾

Um esfregaço bem preparado deve apresentar as margens da lâmina livres, deve ficar mais fino desde o ponto de origem até a extremidade e terminar em franja (Figura 9).⁽³⁾



Figura 9 - (A) Esfregaço bem preparado; (B) e (C) Esfregaços mal preparados.⁽²⁾

Ao exercer muita pressão sobre o espalhador a maioria dos leucócitos podem ser arrastados para a extremidade da lâmina, afetando deste modo a distribuição dos diferentes tipos de leucócitos e diminuindo a contagem de leucócitos no resto do esfregaço.⁽²⁾

2.2.2. Princípio da Coloração de Lâminas

A coloração usada para a observação microscópica dos elementos figurados do sangue é do tipo *Romanowsky*, baseado em soluções alcoólicas com componentes básicos e ácidos. Este, consiste num método de coloração policromático contendo azul-de-metileno e/ou os seus produtos de oxidação, como o Azur B (Trimetiltionina) e, um corante de halogenado de fluoresceína, normalmente eosina Y (Tetrabromofluoresceína). O efeito de *Romanowsky* concede uma cor típica a determinados componentes celulares e reflete a ação combinada da coloração contida no corante a pH compreendido entre 6,7 e 7,0. O núcleo celular cora de roxo, o citoplasma de azul e rosa, e os diferentes grânulos de outras cores específicas.⁽³⁾

O azul-de-metileno é um corante básico que cora o núcleo e algumas estruturas citoplasmáticas de azul ou roxo. Estas estruturas coradas são estruturas basófilas, como é o caso de DNA e RNA. Por sua vez, a eosina é um corante ácido que cora algumas estruturas citoplasmáticas de vermelho alaranjado. Estas estruturas coradas são acidófilas, como é o caso de algumas proteínas. Quando ambos os componentes, básico e ácido, coram uma estrutura citoplasmática este adquire a cor rosa ou lilás.⁽³⁾

Atendendo ao fluxo diário de amostras recebidas no laboratório a secção de Hematologia tem à sua disposição um corador de lâminas automático *Hematek*. Trata-se de um aparelho de bancada totalmente automatizado que transporta, fixa e cora lâminas de esfregaços. A coloração utilizada com o aparelho automático é o método de *Wright* modificado que contem uma combinação de azul-de-metileno e eosina, e metanol como fixador.

2.2.3. Situações que Requerem Confirmação

Um resultado fora dos intervalos de referência definidos para os diferentes elementos sanguíneos ativam *flags* no aparelho e/ou alarmes no programa de validação automática de resultados (SIS) (Tabela 6).

Tabela 6 - Alguns cenários que exigem confirmação por esfregaço de sangue.

<i>Flags</i> /Alarmes	Valores	Observações
Trombocitopenia	$PLT < 150 \times 10^9/L$	Possíveis agregados plaquetários ou diminuição no número de plaquetas em circulação.
Scattergram anormal de NRBC	$NRBC \geq 1\%$	Possível presença de eritroblastos. Confirma-se a presença de eritroblasto e corrige-se a contagem de WBC. Pode haver interferência de linfócitos frágeis ou partículas de lípidos que podem impedir uma clara separação entre os WBC e NRBC.
Desvio à esquerda	-	Possível presença de neutrófilos em banda ou neutrofilia.
Granulócitos imaturos	$\geq 3\%$	Confirmar presença de granulócitos imaturos.
Linfocitose	$> 3,5 \times 10^9/L$	Para despiste de leucemia linfoide crônica e linfomas.
Fórmula invertida	-	Para indivíduos com idades superiores a 18 anos
Linfoblastos	$HGB \leq 11,5 \text{ g/dL}$	Os linfoblastos têm um comportamento perante o reagente do canal IMI idêntico ao dos leucócitos maduros. Assim sendo, o canal IMI apresentará um diagrama normal e o canal 5Diff apresentará anormalidade na zona de separação entre linfócitos e monócitos.
Linfócitos atípicos	$\geq 1,5\%$	São células mononucleares com uma atividade aumentada em RNA. No <i>scattergram</i> encontram-se na zona dos linfócitos com elevada fluorescência. Pode haver interferência de plasmócitos e imunócitos com elevada produção de imunoglobulinas e elevada quantidade de retículo endoplasmático.
Eosinofilia	$> 20\%$ ou $> 1,5 \times 10^3/\mu L$	Devido a alergias ou parasitas, ou síndrome hipereosinofílica.
Basofilia	$\geq 2\%$	Para despiste de leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda.

2.3. LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

A análise de líquidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano ou líquido seminal, é de extrema importância no diagnóstico e na avaliação da terapêutica de algumas patologias e, no caso do líquido seminal, na avaliação de fertilidade masculina.

2.3.1. Líquido Cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano ou líquor (LCR) é um dos principais fluidos do corpo. Ele oferece um sistema fisiológico para fornecer nutrientes ao sistema nervoso e eliminar resíduos metabólicos, mantém a homeostase iônica do sistema nervoso central, produz uma barreira para amortecer o cérebro e a medula espinal contra traumas, entre outros.^(4, 5)

I. Contagem Manual de Células

A fim de se fazer contagens celulares utiliza-se o segundo tubo dos três, mencionado nos procedimentos de colheita para LCR. Por rotina, quando se recebe uma amostra de LCR na secção de Hematologia procede-se à contagem manual de leucócitos numa câmara de *Neubauer* (Figura 10). Normalmente, LCR apresenta um aspeto cristalino mas em colheitas traumáticas a amostra pode aparecer sanguinolenta. Nestes casos, processa-se a amostra no *Sysmex XE-5000* no modo específico para líquidos biológicos para fazer uma contagem de eritrócitos e contagem total. Considerando uma proporção de 1 leucócito por cada 700 eritrócitos, para uma contagem de RBC superior a 700 células, não se faz contagem manual uma vez que não se consegue diferenciar os brancos dos rubros. No entanto, para contagens de RBC inferior a 700 células, faz-se a contagem manual na câmara de *Neubauer*.⁽⁵⁾



Figura 10 - Câmara de *Neubauer*.

Prepara-se a câmara de *Neubauer* fixando a lamela sobre a zona central com o retículo e adiciona-se 10 µL de amostra sem diluição. A contagem celular é feita nos 4 quadrantes dos cantos, onde cada quadrante tem um volume de 0,1 µL (Figura 11).

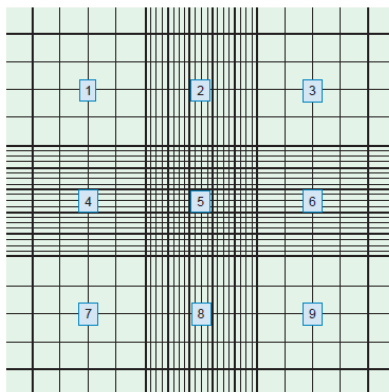


Figura 11 - Representação da câmara de contagem de *Neubauer* com os nove quadrantes de contagem. Para uma amostra de LCR, a contagem de células é feita nos quadrantes 1, 3, 7 e 9. ⁽⁵⁾

Quando a contagem manual é superior a 10 WBC/µL procede-se à contagem diferencial. De modo a obter o número de células presentes em 1 µL é necessário aplicar a fórmula (1) ⁽⁵⁾:

$$\frac{\text{Número de Células Contadas} \times \text{Diluição}}{\text{Número de Quadrantes Contados} \times \text{Volume do Quadrante}} = \text{células}/\mu\text{L} \quad (1)$$

Na observação microscópica da câmara de *Neubauer* é possível encontrar eritrócitos, leucócitos, bactérias e leveduras. A contagem celular é feita e, mediante o número total de WBC, procede-se ao citoesfregaço para a contagem diferencial.

II. Contagem Diferencial

Identificar o tipo de células presentes no LCR é de extrema importância, sendo a contagem diferencial feita num esfregaço corado. De forma a assegurar um número máximo de células disponível para análise, esta deve ser concentrada. Para tal usa-se a citocentrífuga *Shandon Cytospin 2* (Figura 12-A). Adiciona-se umas gotas no citofunil descartável (Figura 12-B) e à medida que a amostra é centrifugada as células presentes no LCR são forçadas para uma monocamada de 6 mm de diâmetro na lâmina de vidro.

O fluido é absorvido pelo papel de filtro oferecendo uma área mais concentrada de células.⁽⁵⁾

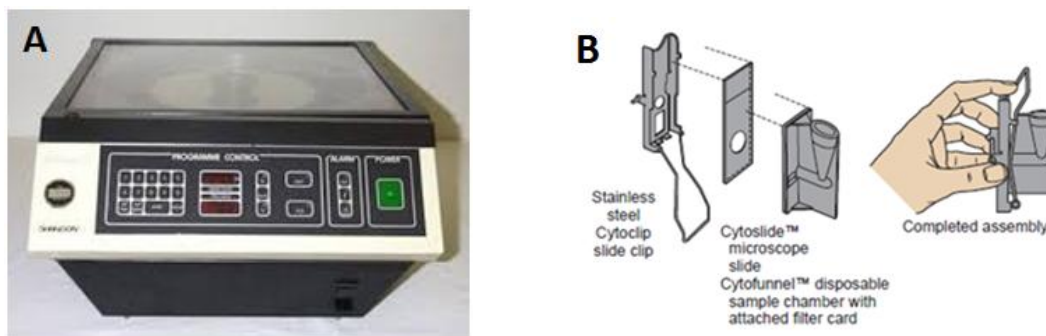


Figura 12 - A) Citocentrífuga *Shandon Cytospin 2*. B) Procedimento da montagem da amostra para a citocentrífuga.⁽⁵⁾

A amostra é centrifugada durante 5 minutos a 800 rpm iniciando com um ciclo lento para evitar destruição celular. Destaca-se a lâmina do citofunil e deixa-se secar o citoesfregaço ao ar para ser corada no corador de lâminas automático.

As células que se encontram normalmente no LCR são essencialmente linfócitos e monócitos, podendo aparecer um ou outro neutrófilo. A presença de um número elevado destas células, tal como encontrar eosinófilos, plasmócitos, células mononucleares e polimorfonucleares, é considerado anormal. Uma contagem diferencial com um número aumentado de neutrófilos, linfócitos e monócitos fornece informação sobre o tipo de microrganismo que está a causar a infeção das meninges. Quando predomina a presença de neutrófilos é indicativo de meningite bacteriana; quando o predomínio é de linfócitos e monócitos, é sugestivo de meningite de origem viral, tuberculosa, fúngica ou parasitária.⁽⁵⁾ As células podem aparecer com um aspeto distorcido incluindo vacúolos citoplasmáticos e aglomerados celulares assemelhando-se a características malignas. Uma vez que as características celulares podem variar ao longo da lâmina, deve-se fazer contagem no centro e periferia da lâmina.

2.3.2. Líquido Seminal

A realização do espermograma tem o particular interesse na avaliação da fertilidade masculina e de monitorização de pós-vasectomia.⁽⁶⁾

I. Colheita da Amostra

A variedade na composição do sémen torna a necessidade de uma colheita adequada essencial para uma avaliação precisa da fertilidade masculina. Assim sendo, o paciente deve ser devidamente informado das instruções para a colheita da amostra de sémen. O paciente deve estar em abstinência sexual num período mínimo de 2 dias e máximo de 7 dias.

A amostra é obtida por masturbação para um frasco estéril, devidamente identificado com data e hora da colheita, numa sala disponibilizada pelo laboratório. Após recolha, a amostra permanece à temperatura ambiente ou idealmente a 37°C durante 30 minutos para liquefação. Durante este período deve-se homogeneizar a amostra com agitação ligeira. Na maioria dos casos, a amostra passa de um estado gelatinoso, com aspeto heterogéneo e espesso, a um estado liquefeito, muito fluido e homogéneo. Se durante os 30 minutos a amostra não ficar liquefeita, deve-se esperar mais 30 minutos e só iniciar a avaliação aos 60 minutos.⁽⁷⁾

A análise do sémen para a avaliação da fertilidade consiste num exame macroscópico e exame microscópico executado pela TSS especializada para esta função.

II. Exame Macroscópico

O exame macroscópico consiste na avaliação do aspeto, cor e cheiro da amostra, medição do volume, classificar a viscosidade e liquefação e pH (Tabela 7).

Tabela 7 - Caraterísticas macroscópicas avaliadas no exame macroscópico do líquido seminal.^(6, 7)

Caraterísticas	Descrição
Aspeto	Sémen liquefeito normal tem uma aparência homogénea opalescente. Podendo pode aparecer menos opaca se a concentração de espermatozoides for baixa.
Cor	Tem cor esbranquiçada, podendo apresentar com uma cor vermelho-acastanhado, indicativo de presença de RBC; ou amarelado, sugestivo de período de abstinência prolongado, contaminação por urina ou medicação.
Cheiro	Tem cheiro <i>sui generis</i> , podendo ser ausente ou fétido.

Tabela 7 (Continuação)

Caraterísticas	Descrição
Liquefação	Decorrido o período de repouso, a liquefação é completa se não existir grânulos, ou incompleta se existir grânulos.
Volume	É medido com uma pipeta graduada de escoamento total. A referência limite inferior é de 1,5 mL. Baixo volume de líquido seminal é frequentemente associado a infertilidade e pode indicar disfunção das vesículas seminais. Ou então, uma colheita inadequada também pode ser considerada. Por outro lado, elevado volume de líquido seminal pode refletir uma inflamação.
Viscosidade	Viscosidade é normal quando o líquido cai gota a gota. É considerada uma viscosidade aumentada quando ao retirar a pipeta da amostra se formam fios superiores a 2 cm. Uma viscosidade muito aumentada pode interferir posteriormente na determinação da motilidade e concentração de espermatozoides.
pH	O pH normal está compreendido entre 7,2 e 8,0. Uma amostra com pH baixo pode ser indicativo de um processo obstrutivo. Por outro lado, pH alto pode ser sugestivo de infecção.

III. Exame Microscópico

O exame microscópico consiste em avaliar a presença de agregados, a motilidade, vitalidade, concentração e morfologia dos espermatozoides (Tabela 8). Este exame fornece uma visão geral para revelar a agregação ou aglutinação dos espermatozoides, a presença de outras células além de espermatozoides como células epiteliais, leucócitos, células germinativas imaturas e cabeças ou caudas isoladas.

Tabela 8 - Caraterísticas microscópicas avaliadas no líquido seminal.

Características	Descrição
Agregados/Aglutinados	▪ Agregação refere-se a espermatozoides mortos aderentes uns aos outros ou com mobilidade aderentes a células não espermáticas ou detritos é considerado como agregação não específico; ▪ Aglutinação refere-se especificamente a espermatozoides móveis agarrados uns aos outros, pela cabeça, cauda ou peça intermédia. A presença de aglutinação é sugestiva de presença de anticorpos anti-espermatozoides.
Motilidade	▪ É utilizado um sistema de classificação da motilidade dos espermatozoides que distingue espermatozoides com motilidade progressiva (rápidos e lentos) e não progressiva dos imóveis (ANEXO 6); ▪ O somatório das percentagens de progressivos rápidos e progressivos lentos deve ser igual ou superior a 32%. Este parâmetro é importante no diagnóstico de astenozoospermia, ou seja, diminuição da mobilidade progressiva dos espermatozoides.

Tabela 8 (Continuação)

Características	Descrição
Vitalidade	▪ A vitalidade dos espermatozoides, avaliada a partir da integridade da membrana das células, distingue os espermatozoides imóveis dos mortos. ▪ Permite confirmar a avaliação da motilidade, onde a percentagem de mortos não deve ultrapassar a percentagem de imóveis. ▪ A vitalidade é avaliada colocando em contacto a amostra com solução de eosina na mesma proporção. Os espermatozoides com membrana íntegra não coram, e os que têm a membrana não íntegra (ou mortos) coram de rosa. ▪ Considera-se uma avaliação de vitalidade normal para espermatozoides vivos superiores a 58%. Em combinação com a motilidade, este parâmetro é importante no diagnóstico de necrozoospermia, ou seja, imobilidade total por morte dos espermatozoides.
Concentração	▪ Por mL de amostra, espera-se obter um valor igual ou superior a 15×10^6 espermatozoides/mL. O número de espermatozoides ejaculados é calculado a partir do volume total da amostra. Espera-se um valor igual ou superior a 39×10^6 espermatozoides/ejaculados; ▪ A quantificação da concentração de espermatozoides é importante no diagnóstico da oligozoospermia, ou seja, diminuição da concentração dos espermatozoides; e azoospermia, na ausência de espermatozoides. Estes podem estar associados a possíveis desordens ao nível do epidídimo e tubos seminíferos.
Morfologia	▪ A morfologia de um espermatozoide é avaliada com respeito à cabeça, peça intermédia e cauda (Figura 13). Uma morfologia anormal da cabeça está associada a uma pobre penetração no óvulo, enquanto a morfologia anormal do colo, peça intermédia e cauda afeta a motilidade (Figura 14); ▪ A percentagem de referência de espermatozoides normais é igual ou superior a 4%. Este parâmetro é importante no diagnóstico de tetratozoospermia, ou seja, diminuição do número de espermatozoides morfologicamente normais e aumento de espermatozoides anormais.

A avaliação da motilidade e vitalidade consiste na contagem de 200 espermatozoides, em pelo menos 5 campos, com ampliação de 400x. Repete-se a contagem numa segunda lâmina. Não havendo diferenças significativas entre as

contagens das respetivas características microscópicas, o resultado deverá ser dado em percentagem média das duas contagens.

Relativamente à concentração, a contagem é feita por observação microscópica em contraste de fase com ampliação de 400x no quinto quadrante na câmara de *Neubauer*. Para tal, faz-se uma diluição com água destilada (se necessário) e adiciona-se 10µL de amostra diluída na câmara. A avaliação da concentração consiste na contagem de 200 espermatozoides em duplicado e não havendo diferenças significativas entre as contagens, calcula-se o valor médio de espermatozoides por µL segundo a equação (1), tendo em conta a diluição e o volume de amostra contada na câmara.

Na avaliação morfológica, os espermatozoides de uma amostra são fixados numa lâmina com álcool com álcool 96% durante 10 min, passando depois para 70%. Seguidamente, a lâmina é corada com a coloração de papanicolau que cora as zonas acrossomal e pós-acrossomal da cabeça, citoplasma residual, peça intermédia e colo do espermatozoide. Posteriormente, faz-se a contagem de 200 espermatozoides em duplicado com uma ampliação de 1000x. Não havendo diferenças significativas entre as duas contagens determina-se a percentagem de espermatozoides normais e anormais (cabeça, colo, cauda e restos citoplasmáticos) (Figuras 13 e 14).

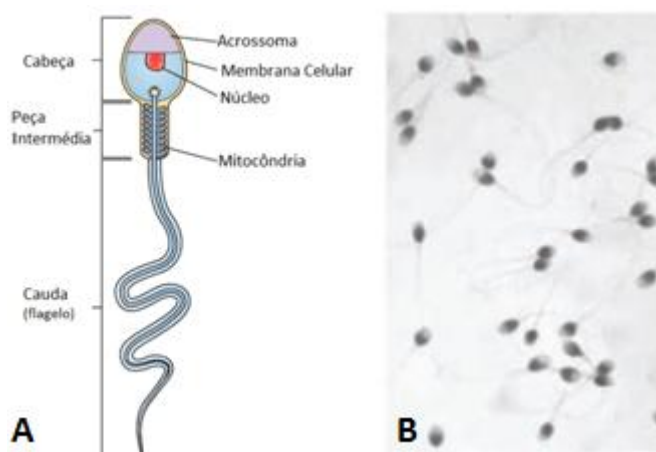


Figura 13 - A – Estrutura normal de um espermatozoide.⁽⁶⁾ **B** – Espermatozoides corados com coloração de papanicolau.⁽⁷⁾

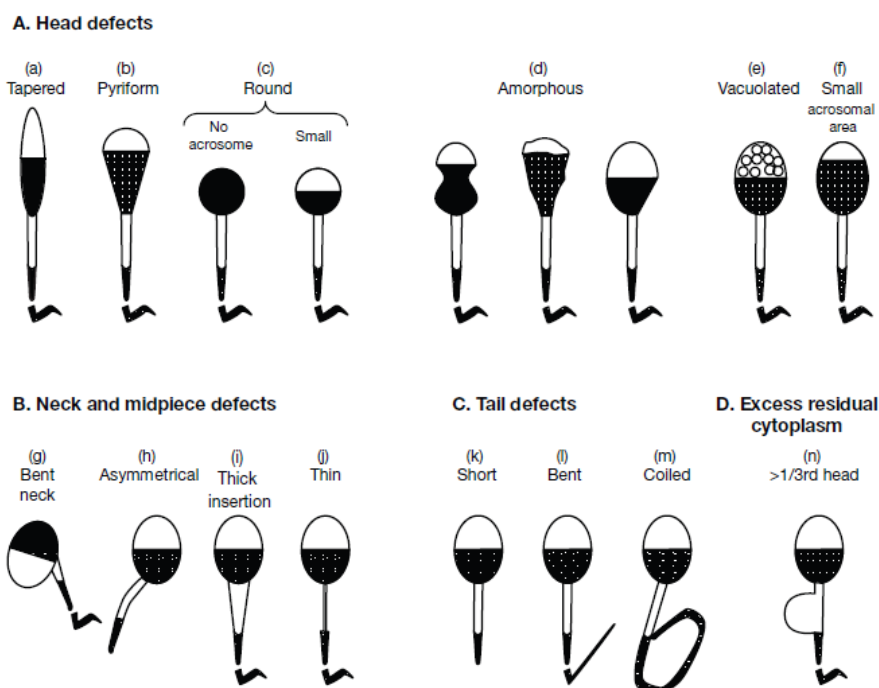


Figura 14 - Possíveis alterações morfológicas dos espermatozoides.⁽⁷⁾

Ainda durante a avaliação morfológica, faz-se a diferenciação e contagem de células redondas, nomeadamente, células espermáticas, leucócitos e células epiteliais, em 100 espermatozoides.⁽⁶⁾ A presença de células germinais imaturas indica descamação do epitélio germinal, ocorrendo normalmente em situações inflamatórias. A presença de leucócitos (leucócitos/ μ L) pode indicar infecção e inflamação nas vesículas seminais. Por outro lado, a presença de células epiteliais poderá estar relacionado com desordens do trato genito-urinário.⁽⁷⁾

2.4. LÍQUIDOS BIOLÓGICOS PATOGENICOS

Determinar a causa etiológica da acumulação de fluídos nas diversas cavidades do corpo é crucial para o tratamento adequado das doenças.

2.4.1. Líquido Ascítico, Líquido Pleural, Líquido Sinovial

As cavidades fechadas no corpo são envolvidas por duas membranas, uma junto à parede da cavidade designada de membrana parietal e outra membrana que envolve os órgãos dentro da cavidade designada de membrana visceral. O líquido ascítico

corresponde ao excesso de fluido acumulado na cavidade peritoneal e o líquido pleural corresponde a uma acumulação de fluido na cavidade pleural. Normalmente, nestas cavidades existe uma pequena quantidade de fluido que facilita o movimento de ambas as membranas, uma contra a outra. No entanto, uma acumulação de fluido resulta do desequilíbrio entre a produção de fluido e reabsorção.^(4, 8)

Relativamente ao líquido sinovial, este corresponde ao líquido encontrado nas cavidades das articulações móveis. Os ossos nestas articulações são revestidos de cartilagem lisa e separados por uma cavidade contendo líquido sinovial o que permite reduzir a fricção entre os ossos durante movimentos da articulação. Além disso, o líquido sinovial fornece nutrientes à cartilagem e diminui o choque de compressão articular durante atividades como caminhadas e corridas.⁽⁹⁾

I. Processamento de Amostras

A colheita destes líquidos para a contagem e diferenciação celular é feita para um tubo de EDTA K3. Em condições normais apresentam um aspeto translúcido, podendo ser incolor a amarelo.^(4, 8, 9)

Como procedimento normal da secção, antes de seguir para a diferenciação celular, a amostra é processada no XE-5000, no modo de líquidos biológicos para a contagem total de células nucleadas na amostra. Nesta categoria estão incluídos os leucócitos e células nucleadas de alta fluorescência (mononucleares e polimorfonucleares). Para uma contagem inferior a 100 células/ μ L não se faz diferencial celular uma vez que o número de células contadas não tem significado clínico. Uma contagem igual ou superior a 100 células/ μ L prepara-se citoesfregaço e faz-se o diferencial celular da amostra.

II. Interesse Clínico

No diferencial celular podem encontrar-se linfócitos, neutrófilos, células mononucleares e polimorfonucleares.^(4, 8) Estas células podem aparecer com um aspeto distorcido, incluindo vacúolos citoplasmáticos, e aglomerados celulares assemelhando-se a características malignas. A presença de células mononucleares, polimorfonucleares e agregados celulares podem ser indicativos de neoplasias (Tabelas 9, 10 e 11). As

características celulares podem variar ao longo da lâmina, daí que é recomendado fazer contagem no centro e periferia da lâmina.

Além da contagem e diferencial celular, para auxiliar o diagnóstico, é importante complementar com a análise de parâmetros bioquímicos.

Tabela 9 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido pleural, associado a parâmetros bioquímicos, e respectivas considerações clínicas.⁽⁸⁾

Líquido Pleural	Considerações Clínicas
Diferencial Celular	
Neutrófilos	↑ Pneumonia, pancreatite, embolia pulmonar
Linfócitos	↑ Tuberculose, infecção viral, doenças autoimunes
Células mesoteliais	↓ Associado com tuberculose
Plasmócitos	Tuberculose
Células malignas	Adenocarcinoma primário e carcinoma de pequenas células; carcinoma metastático
Parâmetros Bioquímicos	
Glucose	↓ Inflamação reumatoide, tuberculose ou infecção purulenta
Lactato	↑ Infecção bacteriana
pH	↓ Pneumonia (sem resposta a antibiótico); ↓↓ Ruptura esofágica
Adenosina desaminase (ADA)	↑ Tuberculose
Amilase	↑ Pancreatite ou ruptura esofágica

Tabela 10 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido ascítico, associado a parâmetros bioquímicos, e respectivas considerações clínicas.⁽⁸⁾

Líquido Ascítico	Considerações Clínicas
Diferencial Celular	
Linfócitos	↑ Peritonite, cirrose
Células malignas	Malignidade de origem gastrointestinal, ovariana e prostático
Parâmetros Bioquímicos	
CEA	Malignidade de origem gastrointestinal
CA 125	Malignidade de origem ovariana
Glucose	↓ Peritonite tuberculosa
Amilase	↑ Pancreatite e perfuração gastrointestinal
Fosfatase alcalina	↑ Perfuração gastrointestinal

Tabela 11 - Possíveis células observadas no citoesfregaço do líquido sinovial, associado a parâmetros bioquímicos, e respectivas considerações clínicas.⁽⁹⁾

Líquido Sinovial	Considerações Clínicas
Diferencial Celular	
Neutrófilos	↑ Sépsis bacteriano
Linfócitos	↑ Inflamação não séptica
Macrófagos (monócitos)	↑ Infecção viral
Células de revestimento sinovial	Normal
Células LE	Lúpus eritematoso
Células <i>Reiter</i>	Síndrome <i>Reiter</i> , inflamação não específica
Células RA	Artrite reumatoide, inflamação imunológica
Células da cartilagem	Osteoartrite
Parâmetros Bioquímicos	
Glucose	↓ Doenças inflamatórias ou sépsis
Proteínas totais	↑ Doenças inflamatórias e hemorrágicas
Ácido Úrico	↑ Gota

2.5. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO GLOBULAR

A Velocidade de Sedimentação (VS) dos eritrócitos é uma medida não-específica na detecção de processos inflamatórios crônicos e agudos. É ainda utilizado na monitorização de doença e triagem de condições inflamatórias e malignas ocultas.⁽¹⁰⁾ As amostras são colhidas diretamente em tubos *Vacu-Tec* com citrato de sódio contudo, no caso de colheitas difíceis, amostras colhidas em EDTA K3 também podem ser usadas.

Este parâmetro corresponde à velocidade à qual os eritrócitos se separam do plasma e se agregam em condições controladas, em milímetro por hora (mm/h) (Tabela 12). A capacidade de agregação depende da presença de certas proteínas que neutralizam as cargas negativas dos eritrócitos e o efeito de repulsão entre si. Este parâmetro tem sensibilidade e especificidade baixa pois é influenciado por vários fatores, tais como, a composição em proteínas plasmáticas (fibrinogénio, albumina e globulinas) que interferem na carga negativa dos eritrócitos, pela hemodiluição, aumentando a VS, pela concentração e a morfologia dos eritrócitos. Alterações morfológicas dos eritrócitos podem conferir-lhes rigidez.⁽¹⁰⁾ Células microcíticas sedimentam mais devagar que células macrocíticas. Eritrócitos com formas anormais e irregulares, como células falciformes ou esferócitos, dificultam a formação de *rouleaux* e diminui a velocidade de sedimentação.⁽³⁾

Tabela 12 - Valores de referência de velocidades de sedimentação.⁽¹⁰⁾

	Homem (mm/h)	Mulher (mm/h)
Adultos	15	20
Idosos	20	30

O aumento da VS pode ser devido a várias condições anormais do sangue como é o caso de *rouleaux*, aumento dos níveis de fibrinogénio, um aumento relativo de globulinas plasmáticas causados pela perda de albumina plasmática e um aumento absoluto de globulinas do plasma; ou devido a infeções, inflamação, necrose tecidular, doenças reumáticas, leucemias, neoplasias, mielomas, anemias e gravidez.⁽³⁾

2.5.1. Analisador Automático

Para a determinação da VS usa-se o *VES-MATIC 20* (Figura 15), um analisador automático desenhado para determinar a velocidade de sedimentação dos eritrócitos numa dada amostra de sangue.



Figura 15 - Aparelho automático de velocidade de sedimentação globular *VES-MATIC 20*.

Princípio de Funcionamento

O sistema automatiza completamente a análise desde a homogeneização do sangue até à leitura e impressão dos resultados. Na homogeneização automática das amostras, o porta-tubos inclina-se 90° e inicia uma série de rotações de 360° durante um período de aproximadamente 2 minutos.

Para a leitura da VS, o aparelho usa sensor de raios IV que calcula a diferença de opacidade da coluna de sangue tendo a particularidade de correção da temperatura. A primeira leitura realiza-se após homogeneização quando o prato volta à sua posição inicial. O leitor ótico eleva-se verticalmente e mede o nível de sangue antes de iniciar a

sedimentação detetando a opacidade da coluna de sangue no tubo; 20 minutos depois é feita a última leitura.

Cada ciclo tem uma duração total de 25 minutos, a 18°C, temperatura a qual facilita o processo de sedimentação, permitindo que os resultados possam ser comparáveis à primeira hora obtida pelo método de Westergren, a 25°C.⁽¹⁰⁾ Estes são gerados automaticamente e lançados manualmente e/ou informaticamente na base de dados *Clinidata*.

2.5.2. Método Clássico de Westergren

Em situações onde o volume de amostra colhido é muito pequeno (inferior a 1 mL) ou existe uma anomalia na leitura da VS, recorre-se ao método de *Westergren* (Figura 16).

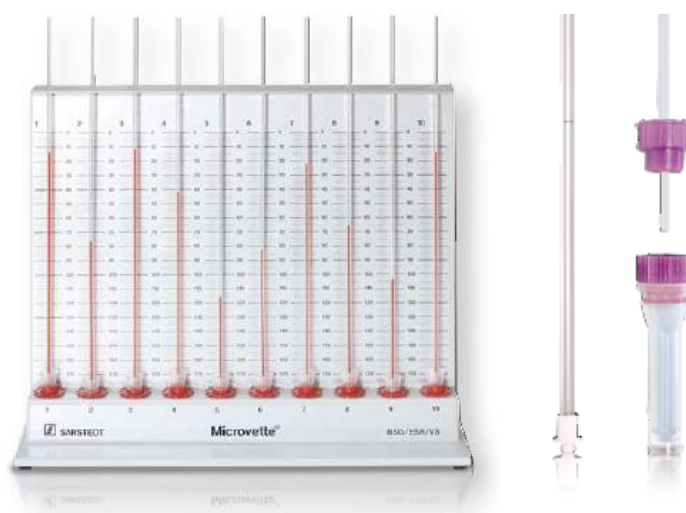


Figura 16 - Suporte graduado vertical *Microvette*®, capilar e tubo *Microvette*® 100/200 de citrato de sódio para o método de *Westergren* da *SARSTEDT*.

Esta técnica manual consiste num suporte graduado *Microvette*® de 0 a 200 mm e um capilar, ideal para medir VS de amostras de 100 ou 200 µL por capilaridade. O capilar com amostra, com citrato de sódio ou EDTA K3, é colocado no suporte em posição vertical, a temperatura ambiente e é registado a leitura em milímetros ao fim de uma hora. A leitura é dada pela altura da coluna de plasma no limite de separação com os eritrócitos sedimentados.^(3, 10)

2.6. HEMOGLOBINA GLICADA

O doseamento de hemoglobina glicada (Hb A_{1c}) é aplicada como teste de rotina para a monitorização de doentes diabéticos, de 3 em 3 meses, aproximadamente. Este parâmetro tem como vantagens não depender de flutuações diárias da glucose, de exercício físico, da recente digestão de alimentos, nem de medicação.

A formação de Hb A_{1c} é irreversível em condições fisiológicas e está dependente da concentração de glucose no sangue e da semivida dos eritrócitos (120 dias). Perante hiperglicemia, os níveis intercelulares de glucose estão elevados, promovendo a ligação não enzimática de glucose ao N-terminal da cadeia β da hemoglobina A dos eritrócitos.

Assim sendo, Hb A_{1c} vai refletir a média de glicémia ao longo dos últimos meses, tendo um valor preditivo forte para complicações em diabéticos. Segundo a Norma 033/2011 da Direção Geral de Saúde, Hb A_{1c} em doentes diabéticos deve ser igual ou inferior a 6,5% em relação ao total de hemoglobina no organismo. Um valor inferior a 6,5% indica que o doente diabético está a controlar eficazmente a sua glicémia. Para valores superiores a 6,5%, é indicativo de um mau controlo da glicémia, podendo futuramente estar associado a doenças cardiovasculares, nefropatias e retinopatias.

O doseamento de Hb A_{1c} é feito usando o aparelho totalmente automatizado *ADAMS A1c HA-8160* (Figura 17), baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Além de monitorizar os diabetes doseando Hb A_{1c}, o aparelho tem ainda a particularidade de dosear Hb A2 (modo talassemia), Hb A1 e Hb F.



Figura 17 - Analisador automático de hemoglobina glicada *ARKRAY ADAMS A_{1c} HA-8160*.

2.6.1. Princípio de Funcionamento

Os doseamentos por HPLC fornecem dados precisos de Hb A_{1c} numa amostra de sangue total (com EDTA K3 ou heparina) ou amostra hemolisada. A coluna é composta por resina de troca iónica de natureza catiónica de fase reversa e encontra-se a uma temperatura de, aproximadamente, 40°C. A leitura das frações mencionadas é a 415 nm e 500 nm.

A demora no processamento da amostra de sangue total com níveis elevados de glucose leva a um aumento de componentes instáveis de Hb A_{1c}. Assim sendo, de forma a reduzir esta interferência, a coluna tem a particularidade de remover esta componente instável da amostra quantificando Hb A_{1c} estável, independentemente do nível de glucose no sangue.

2.7. FRAGILIDADE OSMÓTICA

A fragilidade osmótica corresponde à capacidade ou flexibilidade de uma membrana celular de suportar pressão. As características semipermeáveis da membrana dos eritrócitos faz com que cada célula seja um osmómetro que muda de volume com alterações da pressão osmótica. Quando o grau de hemólise é maior, a fragilidade é elevada; se o grau de hemólise é baixo, a fragilidade do eritrócito é considerada reduzida. Este procedimento tem como interesse clínico diferenciar os diferentes tipos de anemias, nomeadamente, esferocitose hereditária.⁽¹¹⁾

Quando os eritrócitos são colocados numa solução isotónica (0,85%) de cloreto de sódio (NaCl), moléculas de água entram e saem pela membrana em quantidades iguais. Em soluções hipotónicas, os eritrócitos vão lisar dado que existe uma maior entrada de moléculas de água para o interior da célula. Este fluxo de moléculas de água acaba por romper a membrana dos eritrócitos.⁽¹¹⁾

A fragilidade osmótica aumentada ou diminuição da sua resistência é uma característica dos esferócitos e pode ser sugestivo de esferocitose congénita, anemia hemolítica idiopática adquirida, doença hemolítica do recém-nascido e outras anemias hemolíticas. Uma fragilidade osmótica normal é observada em anemias hemolíticas sintomáticas e hemoglobinúria paroxística noturna (anemia hemolítica crónica). Por

outro lado, fragilidade osmótica diminuída é observada em anemia falciforme e anemias hemolíticas caracterizadas por células em alvo anormais, como acontece em algumas hemoglobinopatias.⁽¹²⁾

2.7.1. Princípio do Método

Neste procedimento, o fator principal é a morfologia do eritrócito, que é dependente do volume, área superficial e o estado funcional da membrana do eritrócito. A membrana de um esferócito rompe mais depressa do que um eritrócito normal ou eritrócitos com uma maior área superficial por volume, tal como células em alvo e drepanócitos.⁽¹¹⁾

Os eritrócitos suspensos numa solução hipotônica de NaCl absorvem água até alcançar um volume crítico, adquirindo uma forma esférica para finalmente rebentarem. A célula que mais se aproxima à forma redonda tem uma capacidade de expansão menor e rompe ao absorver pequenas quantidades de água, quando perante soluções levemente hipotônicas. Este comportamento é testado submetendo os eritrócitos de uma amostra heparinizada, a doze soluções hipotônicas de concentração cada vez menor, a temperatura ambiente e em repouso, durante 30 minutos. Se o teste for realizado exatamente de igual modo para a amostra do doente e para o controlo os resultados obtidos serão suficientes para identificar uma fragilidade osmótica anormal.

Regista-se a olho nú ou por espectrofotómetro o grau de hemólise, avaliando o sobrenadante após centrifugação. Em eritrócitos com fragilidade normal espera-se observar lise em soluções hipotônicas inferiores a 0,55% de NaCl, atingindo lise completa a 0,35% de NaCl. Por outro lado, perante esferocitose espera-se observar lise em soluções hipotônicas superiores a 0,55% de NaCl.

2.8. GASIMETRIA ARTERIAL

A gasimetria permite medir as trocas gasosas respiratórias e parâmetros metabólicos (o estado do equilíbrio ácido-base) do paciente. À secção de Hematologia são entregues amostras de sangue arterial em seringa com heparina lítio e sangue

venoso em tubos com heparina lítio. Este último apenas para análise de cálcio ionizado. Outros anticoagulantes não são recomendados uma vez que podem influenciar consideravelmente os resultados. Dois aparelhos portáteis são usados para analisar rapidamente as amostras de sangue total, *GEM Premier 3500* e *4000* (Figura 18). Em poucos minutos a amostra é processada e os resultados são lançados para a bolsa para serem validados manualmente e estarem disponíveis na base de dados *Clinidata*.



Figura 18 - Aparelho automático de gasimetrias *GEM Premier (3500 e 4000)*.

O equipamento quantifica os parâmetros pH sanguíneo, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), pressão parcial de oxigénio ($p\text{O}_2$), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloro (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}), glucose, lactose, hematócrito (Hct), CO-oxímetro e outros parâmetros derivados pelo analisador, como é o caso do ião bicarbonato (HCO_3^-). CO-oxímetro avalia a habilidade do sangue em carregar oxigénio medindo hemoglobina total (tHb) e determinando a percentagem das espécies funcionais e disfuncionais da hemoglobina, tais como, oxi-hemoglobina (O_2Hb), carboxi-hemoglobina (COHb), metemoglobina (MetHb), deoxi-hemoglobina ou hemoglobina reduzida (HHb).

2.8.1. Princípios de Funcionamento

Todos os componentes necessários para efetuar a análise desde soluções, controlo de qualidade, célula ótica, sensores, CO-oxímetro, compartimento para resíduos, estão contidos em cartuchos, que são substituídos a cada 21 dias. Por defeito, o aparelho assume como temperatura do doente 37°C e a pressão barométrica de 760 mmHg.

De forma a determinar os diversos parâmetros são usados quatro métodos de medição. Para medir pH, pCO₂, Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ são usados sensores potenciométricos. Glucose, lactato e pO₂ são medidos com sensores amperimétricos. A condutividade do sangue é usada para medir Ht da amostra. Para as medições de CO-oximetria, a amostra de sangue total é quimicamente lisada e posteriormente medida com espectrofotómetro de largo espectro para avaliar a amostra numa variedade de comprimentos de onda.

Antes de processar a amostra, é de extrema importância que esta esteja completamente homogeneizada para se obter resultados de confiança. Os parâmetros Ht, tHb, derivados de Hb e O₂ são particularmente afetados quando a amostra não está devidamente homogeneizada.⁽¹³⁾

2.8.2. Interesse Clínico

A gasimetria um teste essencial para acompanhar casos clínicos de doenças cardio-respiratórias, quer em fase de agudização, quer a longo prazo em situações crónicas, assim como doenças renais. Permite a determinação de causas de acidose/alcalose metabólicas/respiratória (Tabela 13 e 14).⁽¹³⁾

Tabela 13 - Alguns parâmetros metabólicos de interesse da gasimetria.

Parâmetros	Descrição
pH	Exprime a atividade dos iões de hidrogénio numa solução.
pCO ₂	Exprime a eficácia da ventilação alveolar.
pO ₂	Exprime a eficácia das trocas de oxigénio entre os alvéolos e os capilares pulmonares.
HCO ₃ ⁻	Anião com poder tampão com função de manutenção de pH no sangue.

Tabela 14 - Situações clínicas associadas às trocas gasosas e parâmetros metabólicos.

Situações Clínicas	Descrição	Parâmetros		
		pH	pCO ₂	HCO ₃ ⁻
Acidose Respiratória	Problemas respiratórios com retenção de CO ₂ , levando a hipoventilação.	↓	↑	Normal
Alcalose Respiratória	Problemas respiratórios com perda excessiva de CO ₂ , levando a hiperventilação.	↑	↓	Normal
Acidose Metabólica	Problemas metabólicos: diabetes, insuficiência cardíaca, renal, diarreia.	↓	Normal	↓
Alcalose Metabólica	Problemas metabólicos: perda excessiva de iões de hidrogénio (vómitos)	↑	Normal	↑

2.9. CONTROLO DE QUALIDADE

A fim de monitorizar a precisão da medição, o estado do analisador e reagentes, são processados controlos de qualidade interno (CQI) e também, se procede à avaliação da qualidade ou controlo de qualidade externo (CQE), isto é, avaliação do desempenho do laboratório em comparação direta com outros laboratórios.

2.9.1. Controlo de Qualidade Interno

É importante verificar a precisão dos dados de análise de amostra e monitorizar, a longo prazo, a estabilidade dos valores de análise. Com o CQI é possível identificar e prevenir problemas numa fase inicial. De modo a poder validar um parâmetro é necessário ter o controlo aceitável, de acordo com as regras de *Westgard* e as necessidades do laboratório. Os controlos são monitorizados a partir de cartas de controlo, para os diferentes níveis, representados por gráficos de *Levey-Jennings*. Se um ensaio não cumpre com as regras padronizadas produz alertas.

Se os controlos forem validados procede-se à análise das amostras e quando um controlo é rejeitado é necessário identificar o problema. Os motivos podem ser variados desde calibração, reagentes, equipamento, o controlo até ao operador (Tabela 15).

Tabela 15 - Possíveis causas associadas à rejeição de controlo.

Causa	Exemplos
Calibração	Lote, prazo de validade, degradação da amostra, calibração mal programada
Reagentes	Lote, prazo de validade, degradação do reagente, pouco reagente, muito tempo à temperatura ambiente
Controlo	Lote, prazo de validade, degradação do controlo
Equipamento	Manutenção em falta, problema com pipetador, controlo mal programado
Operador	Troca de controlo, controlo mal programado

Assim sendo, antes de iniciar qualquer análise nos aparelhos, o TACSP ou TSS deve confirmar se existe quantidade de reagentes e consumíveis suficientes e correr os controlos do dia para garantir o correto funcionamento dos aparelhos, procedendo a calibrações, se necessário (Tabela 16).

Tabela 16 - Controlo de qualidade interno dos aparelhos usados na Hematologia.

Aparelhos	Controlo Qualidade Interno
<i>XE-2100</i> <i>XE-5000</i>	Requerem um controlo diariamente, antes da realização dos ensaios, alternando sucessivamente os diferentes níveis, alto e baixo. De preferência são processados após confirmar que foi feita a manutenção diária, o <i>shutdown</i> dos aparelhos, pelo técnico do turno da noite; e confirmar a quantidade de reagentes.
<i>VES-MATIC 20</i>	Requer controlo semanalmente usando um tubo com barra opaca composta por fendas de altura variável para verificar a eficiência do sensor ótico de leitura. Se a eficiência do sensor ótico for inferior a 80%, é necessário chamar a assistência técnica.
<i>ADAMS A1_C</i> <i>HA-8160</i>	Requer controlo duas vezes por semana, níveis alternados (alto e baixo).
<i>GEM Premier</i> <i>3500 e 4000</i>	Um processo ativo de controlo de qualidade, designado de gestão inteligente da qualidade (iQM). Todos os componentes necessários para efetuar o controlo estão contidos nos cartuchos. iQM está desenhado para monitorizar de forma contínua o processo analítico em tempo real, detetar erros automaticamente e corrigi-los, assim como documentar automaticamente todas as ações corretivas substituindo o uso de controlos de qualidade (internos e externos) tradicionais. O controlo de qualidade realiza-se a cada 8h ou sempre que necessário.

2.9.2. Controlo de Qualidade Externo

Como CQE, o laboratório participa no esquema de avaliação internacional de qualidade RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*). Este é processado no Sysmex mensalmente, sem fazer o diferencial leucocitário, ou seja, apenas no modo CBC para hemograma completo; e no *ADAMS A1_C HA-8160* para a determinação da Hb A1_C.

O laboratório participa ainda no serviço de avaliação nacional de qualidade externa do Reino Unido (*UK NEQAS*) para esfregaços de sangue. Duas vezes por mês são avaliadas duas lâminas segundo a morfologia e diferenciação leucocitária manual. Todas as técnicas observam as lâminas e, de acordo com as conclusões tiradas, são enviados os resultados.

3. MICROBIOLOGIA

A esta secção do laboratório chegam vários tipos de amostras biológicas para análise, desde urinas, fezes, líquidos biológicos (LCR, líquido ascítico, líquido pleural e sinovial), secreções brônquicas (SB), lavados brônquicos (LB) e lavados broncoalveolares (LBA), hemoculturas, exsudados purulentos e cérvico-vaginais, tecidos e cateteres.

Este sector encontra-se dividido em três salas: a sala principal com a câmara de fluxo laminar classe II para as sementeiras das amostras, bancadas de trabalho para a observação, valorização das culturas e identificação de microrganismos, incubadoras, bancada do microscópio para observação de lâminas e área de validação; uma segunda sala direccionada para as micobactérias e ainda, uma sala onde se encontram os equipamentos de incubação. Na tabela seguinte estão listados todos os aparelhos disponíveis na secção de Microbiologia.

Tabela 17 - Equipamentos disponíveis na secção de Microbiologia.

Equipamento	Funcionalidade
<i>ATB 1525 Reader BioMérieux</i>	Leitor de galerias
<i>Bactec 9240 Becton-Dickinson (BD)</i>	Incubação e leituras periódicas de frascos de meios líquidos
<i>Bactec MGIT 960 BD</i>	Incubação e leituras periódicas de tubos de meios líquidos
<i>Phoenix 100 BD</i>	Identificação e antibiograma de bactérias
<i>Polystainer IUL Instruments</i>	Corador de lâminas automático

Durante o período de tempo no sector, foi possível integrar a rotina manuseando as diferentes amostras, meios de cultura, galerias e painéis de identificação e testes de sensibilidade, executar e observar de esfregaços corados com Gram e Ziehl-Neelsen (ZN) ou *Kinyoun* a frio.

A secção de Microbiologia é constituída por três TSS e cinco TACSP. As TSS têm a função de observar e valorizar as culturas, avaliar e validar os resultados, observação das lâminas. É da responsabilidade da TSS responsável pelo sector organizar e coordenar a secção. As TACSP têm como função a triagem das amostras e processá-las nos respetivos meios de cultura, coloração de lâminas e executar os exames parasitológicos e virológicos.

No final do dia ou do turno, é da responsabilidade do técnico assegurar que as amostras foram todas guardas e conservadas de forma adequada.

3.1. MEIOS DE CULTURA

Atendendo ao tipo de amostra que chega ao laboratório, estas são processadas em meios de cultura (ANEXO 7) de acordo com o agente etiológico que se pretende isolar. Grande maioria dos meios de cultura são fornecidos pela *BioMérieux* que oferece uma extensa gama de meios adaptados e requisitos específicos, na conformidade com as regras e vão ao encontro dos critérios de qualidade mais estritos.

Todas as placas semeadas devem estar devidamente identificadas. No verso destas, deve constar o número interno atribuído pelo laboratório do doente, o tipo de produto, a data e hora da execução da sementeira.

Sistema BACTEC de Becton-Dickinson

Para amostras de sangue, estas são colhidas em frascos com meios de cultura líquidos, próprios do sistema da série fluorescente *BACTEC 9240 BD*, para aerobiose, anaerobiose, micobactérias e fungos, sendo incubadas segundo diferentes protocolos (ANEXO 8). Foram incorporadas resinas nos meios de cultura aeróbios para potenciar o isolamento de organismos sem necessitar de um processamento especial.

Os frascos BACTEC são introduzidos no aparelho *BACTEC 9240 BD* para incubação e leituras periódicas. Os microrganismos presentes nestas amostras metabolizam nutrientes e O_2 na cultura. Cada frasco contém sensores fluorescentes que respondem a aumentos de CO_2 produzido pelo crescimento dos microrganismos. É então que os fotodetetores do instrumento medem o nível de fluorescência, a cada dez minutos e a uma temperatura constante de $37^\circ C \pm 1,5^\circ C$. O aumento da fluorescência é proporcional à quantidade de CO_2 presente.

A análise da velocidade e a quantidade do aumento do CO_2 permite ao instrumento da série fluorescente BACTEC determinar se a leitura do frasco é positiva, isto é, se a amostra testada contém organismos viáveis, apesar de a deteção estar limitada aos microrganismos que crescem num tipo de meio particular.

Na pesquisa de micobactérias, são usados tubos indicadores de crescimento de micobactérias (MGIT – *Mycobacteria Growth Indicator Tube*) suplementado com BACTEC MGIT *Growth Supplement* e mistura antibiótica BBL MGIT *Panta*, para a detecção e isolamento de micobactérias, utilizando o sistema BACTEC 960 BD.

No fundo dos tubos MGIT existe um composto fluorescente envolvido em silicone, sensível à presença de O₂ dissolvido no caldo. Inicialmente, a grande quantidade de oxigênio dissolvido anula as emissões provenientes do composto sendo detetada apenas uma pequena quantidade de fluorescência. Posteriormente, o consumo de O₂ pelos microrganismos permite que a fluorescência seja detetada. O método de detecção é igual ao sistema BACTEC 9240 BD, com a exceção dos tubos serem monitorizados a cada 60 minutos relativamente ao aumento da fluorescência.

Saquetas Geradores de Gases

Em caso especiais, como por exemplo, incubação das geloses SCS e Campylosel, são usados sistemas de uso único para produzirem os ambientes adequados para suportar o isolamento primário e a cultura de bactérias anaeróbias e microaerofilia, com o uso de saquetas geradoras de gás dentro de sacos seláveis.

O sistema *GasPak EZ* consiste em saquetas geradoras de gases que contêm carbonato inorgânico, carbono ativado, ácido ascórbico e água. Quando a saqueta é removida do seu invólucro ativa-se com exposição ao ar. O reagente ativado da saqueta e o meio inoculado são colocados no interior do saco que é imediatamente selado. A saqueta rapidamente reduz a concentração de oxigênio no interior do saco ao mesmo tempo que o carbonato inorgânico reduz o dióxido de carbono.

Para a cultura de microaerofilia, são usadas as saquetas *GasPak EZ Campy Pouch System Sachets* que produzem uma atmosfera com aproximadamente 5 – 15% de O₂.

3.2. EXAME BACTERIOLÓGICO

O processo envolvido no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas inicia-se com o exame direto das amostras do doente para pesquisa de microrganismos potencialmente patogénicos; o isolamento e crescimento dos agentes etiológicos, a partir das mesmas amostras terminando com a análise dos organismos cultivados para estabelecer a sua identificação e outras características relevantes, tais como, suscetibilidade a agentes antimicrobianos.

3.2.1. Exame Direto

Microscopia é o método mais comum usado tanto para a deteção de microrganismos diretamente em amostras clínicas como para a caracterização de organismos cultivados em cultura. Corantes específicos são aplicados às amostras que, combinados com determinados métodos de microscopia, permitem detetar agentes etiológicos de uma forma rápida, relativamente barata e produtiva.

I. Coloração de Gram

Com uma pipeta de *pasteur* estéril deposita-se uma gota de amostra líquida (não centrifugada) ou com uma zaragatoa numa lâmina. Deixa-se a lâmina secar para de seguida ser fixada à chama e corada pela técnica de Gram.

Para a coloração de Gram de amostras em lâminas de vidro usa-se o corador automático *Polystainer*, contudo, outros métodos de coloração podem ser programados. Contém quatro recipientes para os reagentes, outros dois para lavagem e secagem. As lâminas de vidro são levadas no cesto automaticamente para todas as posições com os respetivos reagentes de coloração nos intervalos programados. O uso do corador aumenta a reprodutibilidade e a qualidade da coloração com um mínimo de intervenção do utilizador.

Para a diferenciação por coloração de Gram das amostras é usado o BD Kit e Reagentes de Coloração de Gram. As bactérias morfológicamente semelhantes e intactas são diferenciadas em dois grupos com base na cor da célula após coloração, evidenciando a forma, tamanho e detalhes estruturais das células.

Os reagentes para a coloração de Gram são o cristal de violeta, iodo estabilizado, descolorante e safranina. Todo o processo consiste em corar um esfregaço fixado com cristal de violeta; aplicar iodo como mordente e descolorar com álcool para de seguida adicionar o corante de contraste com safranina em fucsina básica.

No interior de todos os organismos que coram por este método forma-se um complexo cristal de violeta-iodo. Os organismos capazes de reter este complexo corante, após descoloração, são classificados como Gram-positivo; organismos descolorados e contracolorados são classificados como Gram-negativo. Mediante rutura da parede celular de Gram-positivo, os organismos podem ser descolorados, perdendo a característica de Gram-positivo. O mecanismo de coloração de Gram está relacionado com a presença de uma parede celular intacta com permeabilidade seletiva, capaz de atuar como barreira na descoloração. Durante o processo de coloração de Gram, a parede celular dos organismos Gram-positivo é desidratada pelo álcool do descolorante e perde permeabilidade, mantendo assim a coloração primária. No entanto, organismos Gram-negativo têm um teor lipídico elevado tornando-se mais permeável quando em contato com álcool, o que resulta na perda da coloração primária.

3.2.2. Exame Cultural

O exame bacteriológico é dirigido para o diagnóstico de agentes etiológicos. Realiza-se a pesquisa do agente por exame cultural e por pesquisa de antígenos específicos, e ainda, o teste de suscetibilidade aos antibióticos. Para efetuar o exame cultural é de extrema importância que a colheita e transporte sejam devidamente feitos, sem contaminantes e antes de qualquer terapia antibiótica.

Os meios são semeados de acordo com as diferentes amostras que chegam todos os dias ao laboratório e à técnica de colheita usada.

I. Urinas

Infeção do trato urinário (ITU) pode ser definida como uma infeção das estruturas do trato urinário como os rins, ureteres, bexiga ou uretra, que geralmente ocorre com a presença de bactérias na urina. ITUs estão entre as infeções bacterianas

mais comuns e ocorrem em todas as faixas etárias. A incidência patogénica responsável pela infeção urinária pode variar e os perfis de suscetibilidade requerem monitorização para fornecer informação para a terapêutica.⁽¹⁵⁾

A infeção pode ser por via hematogénica ou ascendente. Na via hematogénica, a disseminação origina bacterémia. Qualquer infeção sistémica pode afetar os rins, mas determinados organismos, tal como *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella spp.* são particularmente invasivos. Embora a maioria das infeções que envolvem os rins sejam por via ascendente devido a contaminantes da flora fecal e perianal, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Leptospira spp.*, *Staphylococcus aureus* ou leveduras como a *Candida albicans*, na urina geralmente é indicativo de pielonefrite adquirida via hematogénica.⁽¹⁶⁾

As infeções mais comuns são uretrites, cistites, síndrome uretral aguda, bacteriúria assintomática, pielonefrite e bacteriúria assintomática. A uretrite é uma infeção comum onde os sintomas associados são disúria (dor ou dificuldade em urinar) e frequência elevada em urinar. Geralmente, é causada por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, transmitidas sexualmente.

Por sua vez, na cistite prevalece disúria, elevada frequência e urgência aumentada em urinar. Pode haver dor na região da bexiga, urina pode apresentar-se turva e com odor. Estes sintomas devem-se, não só a inflamação da bexiga, mas, também, à multiplicação da bactéria na urina e uretra. Na síndrome uretral aguda manifesta-se disúria, elevada frequência e urgência de urinar, manifestando-se normalmente em jovens sexualmente ativos.

Relativamente à pielonefrite, a inflamação dos rins é causada, geralmente, por infeção bacteriana. Os sintomas mais comuns são febre, dor lombar, disúria, aumento de frequência e urgência em urinar.⁽¹⁷⁾

Entre as infeções mais comuns está a bacteriúria assintomática. Esta infeção corresponde ao isolamento de uma contagem quantitativa de bactéria específica numa amostra de urina de um paciente sem sintomas ou sinais de infeção urinária. A sua prevalência varia com a idade, género e a presença de anormalidades genito-urinário ou doenças subjacentes.

De modo geral, as infecções urinárias têm maior prevalência em mulheres sexualmente ativas, nas grávidas, devido a alterações anatómicas e hormonais e em homens com idade superior a 60 anos, assim como, doentes com diabetes, doenças renais, transplantados renais, anormalidades estruturais e neurológicas que interferem com o fluxo de urina e infecções nosocomiais.⁽¹⁷⁾

A *Escherichia coli* é o agente etiológico mais comum de uma infecção urinária adquirida na comunidade, havendo outros possíveis agentes causadores de ITU, tais como, *Klebsiella* spp., *Enterococcus fecalis*, *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*. Note-se que o risco de infecção acresce em ambiente hospitalar, com a introdução de um objeto estranho no trato urinário nos doentes agaliados, principalmente quando permanece no mesmo sítio durante algum tempo.

i. Processamento de Amostra

O exame cultural da urina é o teste microbiológico quantitativo mais comum na prática do laboratório clínico e é considerado como procedimento *standard* para o diagnóstico de ITU.⁽¹⁵⁾

A urina é geralmente estéril ou colonizada transitoriamente com um pequeno número de microrganismos, no entanto, a contaminação da urina por microrganismos geralmente presentes na uretra ou nas áreas periuretrais, permite a proliferação destes, podendo obter-se resultados culturais errados.

A amostra de urina deve ser colhida conforme descrito anteriormente e levada para o laboratório para ser semeada. Caso permaneça à temperatura ambiente pode levar ao crescimento de agentes patogénicos, assim como de contaminantes. Todas as urinas devem ser refrigeradas se não forem processadas nas primeiras duas horas após colheita.

Aplica-se o método da ansa calibrada para processar a urina. Homogeneiza-se a amostra, nunca processando amostras centrifugadas. De seguida, mergulha-se uma ansa calibrada de 1 µL na vertical na amostra e inocula-se uma placa de CLED. Faz-se uma linha no centro da placa e estria-se a placa cruzando a linha central várias vezes, com estrias perpendiculares à linha central (Figura 19) e vai a incubar.

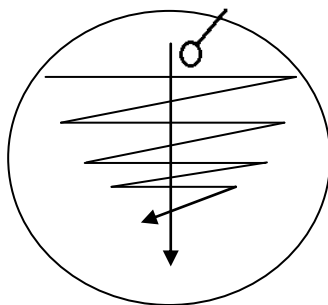


Figura 19 - Esquema de como estriar as placas de modo a obter colónias isoladas e unidades formadoras de colónias (UFC) contáveis.

Para amostras colhidas por punção suprapúbica usa-se uma ansa calibrada de 10 µL para inocular o meio, de modo a valorizar tudo o que cresce. Uma vez que se trata de uma amostra asséptica, além de semear uma placa de CLED, deve-se semear uma placa de SCS para o crescimento de microrganismos anaeróbios.

Faz-se o exame direto para a observação ao microscópio da amostra, conforme o procedimento mencionado anteriormente. A presença de pelo menos um organismo por campo com óleo de imersão (100x), no total de 20 campos correlaciona com bacteriúria ($>10^5$ UFC/mL).⁽¹⁷⁾

Geralmente, é necessário no mínimo uma incubação de 24h para permitir e detetar o crescimento de microrganismos. Os critérios de avaliação microbiológica das placas são dependentes não só no tipo de amostra de urina colhida como também, na história clínica do paciente, por exemplo, idade, género, sintomatologia e antibioterapia. Deste modo, determinar uma contagem de colónias que representa verdadeiramente uma infeção é de extrema importância. Faz-se a observação, contagem e valorização da cultura às 24h de incubação, segundo os critérios de classificação (Tabela 18).

Tabela 18 - Critério de classificação das contagens de colónias nas placas de amostras de urina.

Número de colónias	Contagem UFC/mL
0	$< 10^3$
1	$= 10^3$
1 - 10	$10^3 - 10^4$
10	$= 10^4$
10 - 100	$10^4 - 10^5$
100	$= 10^5$
> 100	$> 10^5$

Para o caso de crianças, imunossuprimidos ou pacientes a fazerem antibioterapia é considerado infeção uma contagem de $10^4 - 10^5$ UFC/mL. Em amostras colhidas em anaerobiose, como é o caso de punção suprapúbica, valoriza-se tudo, como tal, o desenvolvimento de uma colónia na placa equivale a 10^4 UFC/mL.

Durante a observação, contagem e valorização da cultura é igualmente importante identificar a presença de contaminantes. Considera-se infeção se $\geq 10^5$ UFC/mL na presença de 1 ou 2 tipos de colónias. Para 3 tipos de colónias ou mais, estamos perante uma situação polimicrobiana. Perante o resultado do exame direto, na presença de bacilos Gram-positivo, é valorizado; caso contrário, pede-se nova amostra.

Outros pedidos menos comuns podem ser feitos pelos clínicos para processar uma amostra urina, como é o caso da pesquisa de *Leptospira*, *Legionella* e *Staphylococcus pneumoniae*.

ii. Pesquisa de *Leptospira*

Leptospirose é uma zoonose com distribuição a nível mundial mas é mais comum em países subdesenvolvidos e países quentes, onde o contato com animais infetados ou águas contaminadas com a sua urina, como em piscinas e quintas, é mais provável ocorrer. Lesões da pele, membranas mucosas ou conjuntiva são exemplos das vias de entrada no hospedeiro humano por este microrganismo.

Na pesquisa de *Leptospira*, a amostra de urina tem de ser processada até 120 minutos após colheita. É semeada uma gota de urina em meio de *Fletcher* (9 mL). Num segundo tubo de meio de *Fletcher*, faz-se uma diluição de 1/10 do tubo anterior (1 mL do primeiro tubo para o segundo). Esta diluição vai diminuir ainda mais a acidez, que destrói a *Leptospira*. Dado que este microrganismo em particular cresce à superfície, os tubos incubam durante 6 semanas no escuro, à temperatura ambiente, verificando-se semanalmente se há crescimento. Na presença do organismo, um anel acinzentado forma-se a 1 – 3 cm da superfície do meio. Nesta situação transfere-se uma gota do anel para uma lâmina e observa-se em microscopia com fundo escuro.

Após semear a amostra faz-se o exame direto. Verte-se a amostra num tubo cónico e centrifuga-se a 3500 rpm durante 30 minutos. De seguida, rejeita-se o

sobrenadante e ressuspende-se o sedimento para observar entre lâmina e lamela, em microscopia com fundo escuro.

iii. Pesquisa de *Legionella* e *S. pneumoniae*

Infeções por *Legionella* são adquiridos exclusivamente a partir de ambientes aquáticos e prospera a temperaturas mais elevadas. Estes microrganismos conseguem sobreviver a condições ambientais extremas durante longos períodos de tempo. A inalação de aerossóis infecciosos é considerada o principal meio de transmissão.⁽¹⁸⁾

A *S. pneumoniae* é a principal causa da pneumonia contraída na comunidade e pode ser o agente mais importante na pneumonia contraída na comunidade de etiologia desconhecida. Quando não é devidamente diagnosticada e tratada, a infecção por *S. pneumoniae* pode levar a bacterémia, meningite, pericardite, endocardite, entre outros.

Para a pesquisa de *Legionella* na urina e *S. pneumoniae* na urina e LCR, recorre-se a *Legionella Urinary Antigen Card* e *Streptococcus pneumoniae Antigen Card* da Alere BinaxNOW[®], um ensaio imunocromatográfico rápido. Este teste consiste num cartão com anticorpo para a deteção qualitativa do antígeno de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 e o antígeno pneumocócico nas amostras de pacientes com sintomas de pneumonia. Destina-se a auxiliar no diagnóstico presuntivo da infecção por *Legionella* provocada por *L. pneumophila* serogrupo 1 ou *S. pneumoniae* em conjunto com a cultura e outros métodos.

II. Fezes

Na maioria das vezes diarreias agudas são autolimitadas contudo, pessoas com diarreias infecciosas exigem estudos de diagnóstico e tratamento. À semelhança das ITUs, o hospedeiro e o microrganismo invasor apresentam características chave que determinam se o patógeno entérico é capaz de causar diarreia microbiana.⁽¹⁹⁾

A maioria dos agentes patogénicos entéricos, como bactérias, vírus e parasitas, são adquiridas através da via oro-fecal. São transmitidos por ingestão de produtos alimentares ou água contaminada. Entre os vários fatores, deve considerar-se a idade do

hospedeiro, pois as diarreias causadas por rotavírus ou *Escherichia coli* enteropatogénica tendem a afetar mais as crianças.⁽¹⁹⁾

A capacidade de um organismo causar infeção gastrointestinal depende não só da suscetibilidade do hospedeiro para o organismo invasor como, também, na virulência do organismo. De forma a causar infeção, o microrganismo deve possuir um ou mais fatores que permita ultrapassar as defesas naturais do hospedeiro ou entrar no hospedeiro quando um ou mais sistemas de defesa inata esteja inativa.⁽¹⁹⁾

Estes enteropatogénicos podem causar doença através da alteração do equilíbrio da água e eletrólitos no intestino delgado, resultando na excessiva secreção de fluidos, em muitos casos mediado pela produção de enterotoxinas, como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ou *Bacillus cereus*; da destruição de células ou de uma resposta inflamatória marcada, seguida de invasão das células do hospedeiro e possível produção de citotoxinas, normalmente no cólon, sendo esta infeção normalmente mediada por *Shigella* spp., *Escherichia coli* ou *Salmonella enteritidis*; da penetração na mucosa intestinal com disseminação e multiplicação nas células linfáticas ou reticuloendotelial fora do intestino, como acontece com *Salmonella typhi* e *Yersinia enterocolitica*, consideram-se estas infeções como sistémicas. Os organismos mais comuns numa infeção entérica são *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica*.⁽¹⁹⁾

i. Processamento de Amostra

As fezes são semeadas em meios seletivos e diferenciais. Os meios de MacConkey, de Hektoen, de SS e um caldo de GN são inoculados com uma zaragatoa. Após 24h de incubação à temperatura de 37° C, o caldo de GN é repicado para os meios seletivos SS e Hektoen.

Para amostras pediátricas e indivíduos imunossuprimidos, além dos meios convencionais, é inoculado o meio de Campylosel para a pesquisa de *Campylobacter*.

A pedido do clínico, a pesquisa de *Yersinia enterocolitica* é feita em meio de CIN, incubada a 30° C durante 48h, para o desenvolvimento de colónias típicas com forma de “bull’s eye”. Para a pesquisa de *Vibrio cholerae*, semeia-se o meio TCBS. No caso de suspeita de *Escherichia coli* enterohemorrágica, inocula-se uma gelose SMAC (MacConkey com Sorbitol) para posterior identificação.

ii. Pesquisa de Ag + Toxina A e B de *Clostridium difficile*

Em indivíduos hospitalizados ou após tratamento com antibióticos, os doentes podem vir a desenvolver problemas gastrointestinais desde diarreias a colites pseudo-membranosa, uma lesão intestinal mediada pelo *Clostridium difficile*.

A pedido do clínico procede-se à pesquisa de antígeno e toxina *C. difficile* recorrendo ao teste imunocromatográfico rápido, *Test TECHLAB C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE*, que deteta simultaneamente antígenos de glutamato desidrogenase de *C. difficile* e confirma a presença do organismo toxigénico detetando as toxinas A e B num só poço de reação. Este teste tem como objetivo ser usado como auxílio de diagnóstico para toxina de *C. difficile*, de modo que, os resultados devem ser considerados em conjunto com a história clínica do paciente.

III. Secreções do Aparelho Respiratório

i. Aparelho Respiratório Superior

O trato respiratório superior inclui a epiglote e tecidos circundantes, laringe, cavidade nasal e faringe, originando frequentemente laringites, faringites e amigdalites. A maioria das infeções são autolimitadas e causadas por vírus, no entanto, para amostras como exsudados amigdalinos e nasofaríngeos, os agentes potencialmente patogénicos mais comuns são *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A), *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella* spp., *Moraxella catarrhalis* e outras *Enterobacteriaceae*.⁽²⁰⁾

Processamento de Amostra

No exame direto das amostras determina-se qual a população microbiana predominante. Nestas amostras do trato respiratório superior, normalmente polimicrobianas, é de esperar encontrar mais células de escamação, existindo, portanto, uma maior probabilidade de encontrar mais células epiteliais. É importante fazer referência aos microrganismos prevalentes, bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos.

Com a zaragatoa, inocula-se PVX, COS e gelose de MacConkey. O clínico pode pedir apenas a pesquisa de estreptococos do grupo B nas amostras faríngeas e amigdalinas, onde semeia-se apenas em COS.

ii. Aparelho Respiratório Inferior

Infeções do aparelho respiratório inferior como bronquite, bronquiolite e pneumonia envolvem estruturas como a traqueia, brônquios e bronquíolos.⁽²¹⁾

Clinicamente, a bronquite aguda manifesta-se clinicamente com tosse, febre e produção de expetoração, normalmente devido a agentes virológicos, ou então, pelo agente bacteriológico *Bordetella pertussis*, essencialmente em crianças. A bronquite crónica manifesta-se clinicamente com tosse e produção de expetoração durante três meses consecutivos. Nestes indivíduos são encontrados frequentemente bactérias potencialmente patogénicas, como estirpes não capsuladas de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Moraxella catarrhalis*.⁽²¹⁾

Relativamente à pneumonia, adquirida na comunidade ou em ambiente hospitalar, manifesta-se clinicamente com febre, arrepios de frio, dores no peito e tosse com ou sem produção de expetoração. Os agentes etiológicos podem variar entre *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Legionella pneumophila*.⁽²¹⁾

Processamento de Amostra

A amostra de expetoração deve ser colhida de acordo com o procedimento de colheita. Por norma, são colhidas até três amostras durante três dias consecutivos.

Primeiramente, procede-se ao exame direto da amostra de expetoração de modo a avaliar a qualidade da amostra e determinar a população microbiana predominante, escolhendo uma porção purulenta da amostra. Considera-se uma amostra própria para seguir para cultura, amostras com menos de 10 células epiteliais no Gram. Amostras com mais de 25 células epiteliais ou 10-25 células são consideradas amostras impróprias. Faz-se referência aos microrganismos prevalentes, bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos, assim como a contagem de polimorfonucleares.

No caso de amostra imprópria esta é rejeitada, enquanto para amostras próprias de secreções brônquicas, procede-se à inoculação por zaragatoa em PVX, COS e gelose de MacConkey. Nas amostras de LB e LBA, as mesmas sementeiras são inoculadas com ansas de 10 µL.

Em situações particulares, como é o caso de indivíduos imunodeficientes, além das placas mencionadas anteriormente, inocula-se em meio de Legionella (só para expetoração) e em meio de SGC.

Regra geral, são necessárias 24h de incubação para permitir o crescimento de possíveis agentes patogénicos. Durante a observação e valorização das culturas é de extrema importância a identificação de contaminantes. Culturas com 1 ou 2 tipos de colónias são valorizadas, no entanto, para amostras com 3 tipos de colónias ou mais, estamos perante uma amostra polimicrobiana.

Pesquisa de Legionella pneumophila

O microrganismo *Legionella pneumophila* é um agente etiológico de duas doenças distintas, nomeadamente, pneumonia Legionella mais conhecida como Doença de Legionário, uma infeção respiratória aguda; e febre Pontiac, uma doença respiratória não pneumónica e autolimitada.

Quando o clínico solicita a pesquisa de *L. pneumophila* em amostras do trato respiratório inferior, o laboratório procede à deteção e identificação de *L. pneumophila* em amostras ou em cultura com o teste de anticorpo imunofluorescente *MonoFluoTM Legionella pneumophila IFA Test Kit* ou semeia-se o meio de Legionella.

Este *kit* contém um único anticorpo monoclonal que é marcado com isotiocianato de fluorescência. Este anticorpo reage com uma proteína presente na membrana exterior de todos os serogrupos conhecidos e *L. pneumophila*. São preparados esfregaços em lâminas e são coradas com *MonoFluoTM Anti-Legionella pneumophila*.

Na presença de *L. pneumophila*, sob microscópio de fluorescência, observa-se a forma de bacilos ou cocobacilos com cor verde-maçã intensamente fluorescentes,

enquanto outros organismos são visíveis a vermelho escuro ou a dourado baço, devido à contra-coloração.

IV. Hemoculturas

Os microrganismos presentes no sangue circulante de forma contínua, intermitente ou transitoria, representam uma ameaça para todos os órgãos. A invasão microbiana na corrente sanguínea pode ter consequências imediatas graves, incluindo choque, insuficiência de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada e morte.⁽²²⁾

Hemoculturas são um indicador de gravidade, da extensão e de disseminação de uma infeção. A identificação atempada e deteção de agentes patogénicos transportados pelo sangue é uma das funções mais importantes do laboratório de microbiologia.⁽²²⁾

Todos os grupos microbianos podem estar presentes na corrente sanguínea durante o curso de várias doenças. Os cocos Gram-positivo, incluindo os estafilococos coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus* spp. são os organismos frequentemente isolados havendo outros que podem existir em ambiente hospitalar que colonizam a pele, a área da orofaringe e do trato gastrointestinal do paciente.⁽²²⁾

Bacterémia pode incluir a presença de um foco de doença, tal como infeção intravascular, pneumonia, abscesso hepático ou representar libertação transitória da bactéria para a corrente sanguínea. Septicémia ou sépsis indica uma situação em que as bactérias ou os seus produtos, as toxinas, causam danos no hospedeiro. Sinais e sintomas de septicemia podem incluir febre ou hipotermia, calafrios, hiperventilação e subsequente alcalose respiratória, lesões de pele, alterações no estado mental e diarreia. Manifestações mais graves incluem hipotensão ou choque, coagulação intravascular disseminada e falha no sistema de órgãos importantes.⁽²²⁾

As bactérias são responsáveis pela maioria das infeções vasculares significativas, como endocardites, tromboflebites e bacterémia associado a cateteres. Os contaminantes da pele podem ganhar acesso à corrente sanguínea e encontrar uma superfície sobre a qual crescer, incluindo válvulas cardíacas e endotélio vascular. Perante tal cenário, *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase-

negativo têm sido cada vez mais implicados como causas de infecção. *S. epidermidis* é o agente etiológico mais comum de endocardite em prótese valvar, com *S. aureus* sendo o segundo mais comum. *S. aureus* é um agente importante causador de septicemia sem endocardite, como abscessos, infecções de feridas e pneumonia, além de sépsis relacionada a cateteres venosos de longa permanência.⁽²²⁾

O trato gastrointestinal, o trato respiratório, abscessos, infecções de lesão pós-operatória, entre outros são as entradas mais comuns para bacteremia em infecções extravasculares. A probabilidade de ocorrência de bacteremia com origem extravascular depende do local da infecção, a sua gravidade e o organismo invasor.⁽²²⁾

Os agentes mais isolados em culturas de sangue são *Haemophilus influenzae* tipo b, enterococos, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Brucella* spp., *Salmonella typhi* e *Listeria* spp. Em adição a estes organismos, um grande número de outras bactérias e fungos que causam infecções extravasculares também podem invadir a corrente sanguínea, mas com menos frequência como *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, streptococos beta-hemolíticos e *Pseudomonas* spp.⁽²²⁾

i. Processamento de Amostra

As amostras são colhidas, de acordo com o manual de colheitas, em meios de cultura líquidos próprios do sistema *BACTEC 9240 BD* para aerobiose ou anaerobiose. São incubadas segundo diferentes protocolos, nomeadamente, para micobactérias e fungos.

Após receção dos frascos de hemoculturas, a técnica deve confirmar se os frascos estão de acordo com os critérios de aceitação. Estando tudo em ordem, dá-se entrada dos frascos no equipamento *BACTEC 9240 BD*. O período de incubação difere para os diferentes tipos de frascos.

Para pesquisas de Brucelose, o período de incubação é de 21 dias a 37° C. Neste caso, após a incubação de 5 dias para os frascos de aeróbios e anaeróbios, continua-se a incubar os frascos de aeróbios até perfazer o período de incubação de 21 dias.

No processamento de amostras positivas, retira-se uma gota com uma seringa, após desinfetar a boca do frasco com álcool, semeiam-se os seguintes meios (Tabela 19); prepara-se lâmina para exame direto com uma gota de cultura. Para hemoculturas de imunodeprimidos, tanto positivas como negativas, procede-se do mesmo modo.

Tabela 19 - Meios a semear após positividade nos diferentes frascos de hemocultura.

Hemoculturas	Meios de Cultura	Exame Direto
Aeróbios	COS	Gram
Anaeróbios	COS SCS	
Pediátricos	PVX	

Uma vez que o crescimento é detetado nos diferentes meios de cultura, o organismo é isolado, identificado e testado quanto à sua suscetibilidade a vários agentes antimicrobianos.

V. LCR

O diagnóstico de uma infecção que envolve o sistema nervoso central é de extrema importância. A infecção mais comum é meningite que de acordo com a resposta do hospedeiro ao microrganismo invasor, pode ser purulenta ou assética. Meningite purulenta corresponde a uma inflamação aguda, normalmente derivada de bactérias, caracterizada pelo grande número de células polimorfonucleares. Meningite assética é caracterizada pelo aumento de linfócitos e outras células mononucleares no LCR, normalmente associada a infecções virais. Clinicamente apresentam sintomas semelhantes como febre, dor de cabeça, rigidez na nuca, náusea e vômitos.⁽²³⁾

A predisposição do hospedeiro à infecção depende, entre outros fatores, da idade. Os agentes etiológicos mais comuns encontrados são *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. Os recém-nascidos têm uma maior prevalência a meningite, devido ao seu sistema imunitário imaturo, aos organismos colonizados no trato vaginal da mãe e ainda, à sua elevada permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os agentes mais comuns para meningite neonatal são *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes* e *Leptospira* spp.⁽²³⁾

i. Processamento de Amostra

Do terceiro de LCR, como mencionado nos procedimentos de colheita, aplica-se uma gota da amostra, com uma pipeta estéril, numa lâmina para exame direto e inocula-se com duas a três gotas espessas em COS, PVX e caldo de BHI. Antes de inocular o caldo BHI faz-se a prova de esterilidade do caldo em PVX. As placas não são estriadas.

Após o período de incubação repica-se uma gota do caldo para PVX e para uma lâmina para exame direto. O passo seguinte consiste na valorização clínica, na execução de provas de identificação do agente infeccioso e de provas de suscetibilidade aos antimicrobianos.

ii. Pesquisa de Antígenos Solúveis

Na rotina do laboratório de microbiologia realiza-se ainda a pesquisa de antígenos solúveis a partir do *kit BD Directigen Meningitis ComboTest*. Uma análise de aglutinação de látex presuntiva para a detecção de qualitativa direta dos antígenos de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y ou W135, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* K1 em LCR.

Anticorpos específicos ligam-se à superfície das contas de látex. Na presença de antígenos específicos, a agregação de partículas de látex adquire um tamanho suficiente para permitir uma visualização rápida da aglutinação positiva. Estes antígenos polissacáridos solúveis específicos acumulam-se no LCR em resultado de uma infeção mediada pelos agentes mencionados.

VI. Líquidos Biológicos – Líquido Ascítico, Pleural, Sinovial

Apesar de diferentes zonas do corpo qualquer fluido corporal estéril pode ser invadido e infetados por agentes etiológicos de todas as categorias de micróbios. Assim sendo, uma única colónia de um microrganismo potencialmente patogénico pode ser significativo.

i. Processamento de Amostra

Com uma pipeta estéril, aplica-se uma gota da amostra numa lâmina para exame direto e inocula-se com uma a duas gotas placas de COS, PVX, MacConkey e caldo de tioglicolato. O caldo de tioglicolato após incubação é repicado em COS e faz-se o exame direto do caldo por coloração de Gram.

Regra geral, estas colheitas são feitas em anaerobiose. Nestes casos, semeiam-se além das placas mencionadas, uma placa de SCS e um caldo de Schaedler para anaeróbios. A incubação da placa é feita em anaerobiose com as saquetas do sistema *GasPak EZ*.

Após incubação faz-se a valorização clínica, a execução de provas de identificação do agente infeccioso e provas de suscetibilidade aos antimicrobianos.

VII. Exsudado Vaginal/Endocervical

As superfícies do trato genital são colonizadas por várias espécies de bactérias, sem causar danos, exceto sob circunstâncias anormais. Dependendo da idade, a flora do trato genital feminino varia com o pH e concentração de estrogénio da mucosa. Mulheres na pós-menopausa e pré-puberdade apresentam principalmente estafilococos e corinebactérias, enquanto as mulheres em idade reprodutiva podem apresentar diversas bactérias facultativas, como *Enterobacteriaceae*, estreptococos e estafilococos, bem como anaeróbios, como *Lactobacillus* ou bacilos de *Döderlein*. Estes últimos, produtores de peróxido de hidrogénio são os organismos predominantes nas secreções de mulheres saudáveis e estão associados a um estado saudável.⁽²⁴⁾

Infeções no trato genital podem ser adquiridas por contacto sexual ou por via não sexual, como infeções causadas por microrganismos da flora genital. A incidência de doenças sexualmente transmissíveis é influenciada pelos numerosos fatores como múltiplos parceiros sexuais, a presença de infeções assintomáticas e o fluxo de pessoas entre populações.⁽²⁴⁾

Organismos que causam corrimento vaginal purulento incluem *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginallis*, estreptococos e, raramente, beta-hemolíticos. Os

mesmos organismos que causam infecções purulentas na uretra pode também infetar as células epiteliais da abertura do colo do útero, assim como *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*.⁽²⁴⁾

i. Processamento de Amostra

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, estreptococo beta-hemolítico do grupo B é feita, a pedido do clínico, numa amostra endocervical. Este pedido é feito geralmente em pacientes grávidas. Este organismo é responsável por meningites, septicémias e pneumonias em recém-nascidos por contaminação do trato vaginal. Prepara-se uma lâmina para exame direto e, posteriormente, hidrata-se com 3 mL de água destilada o meio de Granada. De seguida, inocula-se o meio mergulhando a zaragatoa vaginal/rectal.

Para amostras de exsudado cérvico-vaginal, além da lâmina para exame direto, inoculam-se, com a zaragatoa, os meios de MacConkey, COS, PVX, SGC e os isolamentos seletivos Gardnerella e VCA3. No entanto, se a amostra pertence a uma mulher grávida, é necessário proceder à pesquisa de *Streptococcus* grupo B, de micoplasma, clamídia e flagelados.

ii. Pesquisa de Micoplasma

Mycoplasma e *Ureaplasma* são formas bacterianas mais pequenas; e ao contrário das bactérias, estes procariontes não têm parede celular. Geralmente, micoplasmas colonizam superfícies mucosas dos tratos respiratórios e urogenitais. O kit *Mycoplasma IST2* é usado para o diagnóstico de micoplasmas urogenitais permitindo a cultura, a identificação, a contagem indicativa e a determinação de sensibilidade dos antibióticos de *Ureaplasma* spp. e de *Mycoplasma hominis*.

Este kit associa um caldo de cultura seletivo a uma galeria com 22 testes. O pH, os substratos e a associação de vários fatores de crescimento presentes no caldo permitem o excelente crescimento dos micoplasmas. A presença de substratos de ureia e arginina, para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis*, respectivamente, juntamente com o indicador vermelho de fenol permite, em caso de cultura positiva, visualizar uma mudança de cor do caldo ligada a um aumento de pH. A associação de 3 antibióticos e de um antifúngico permite a seletividade em relação à flora de contaminação eventualmente presente na amostra.

Após a sementeira, o caldo é distribuído na galeria. São incubados durante 48h a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As leituras da coloração do caldo são feitas às 24h e às 48h de incubação. Se o caldo apresentar a coloração amarelada, é negativo para ureaplasma e micoplasma; se o caldo se apresentar vermelho límpido, é positivo para ureaplasma; se o caldo se apresentar ligeiramente turvo, é positivo para micoplasma.

iii. Pesquisa de Clamídia

As infecções por *Chlamydia trachomatis*, agente etiológico de doenças sexualmente transmissíveis, são frequentemente assintomáticas e, se não forem tratadas, podem causar doença de inflamação pélvica nas mulheres, uma das principais causas de infertilidade; danos oculares permanentes e pneumonia nos recém-nascidos, assim como epididimite nos homens, que também pode causar infertilidade. O *kit Clearview Chlamydia MF* é um imunoensaio rápido para a detecção qualitativa direta de antígeno de *Chlamydia trachomatis* em amostras endocervicais femininas e amostras de urina masculina.

O antígeno de clamídia é extraído da zaragatoa através do aquecimento a 80°C , com o reagente de extração. Após a extração, adiciona-se o extrato na janela de amostra do dispositivo. A membrana no dispositivo contém microesferas coloridas ligadas a anticorpos monoclonais anti-*Chlamydia* de género específico. O extrato mobiliza estas microesferas e move-se ao longo da tira de ensaio. Se o extrato conter antígenos de clamídia, estes ligam-se aos anticorpos anexados às microesferas coloridas e aos anticorpos imobilizados na janela de resultados. Na presença de antígeno, forma-se uma linha na janela de resultados; se nenhum antígeno estiver presente, a janela de resultados permanece limpa. No entanto, de forma a assegurar a execução correta do teste, em 15 minutos, visualiza-se uma linha de controlo na janela.

VIII. Exsudado purulento

É importante ter em consideração que o número de agentes responsáveis por infecções de pele e dos tecidos moles é muito grande, de modo que, deve ser tomada especial atenção à técnica de colheita e necessidade de usar meio de transporte adequado. As amostras de exsudados purulentos podem ser semeadas até 24h após a sua colheita, desde que, corretamente acondicionado e mantidos à temperatura ambiente.

Estas podem ser colhidas a partir de lesões superficiais, úlceras de decúbito e queimaduras, lesões profundas como abscessos fechados ou fístulas e erupções cutâneas.⁽²⁵⁾

iv. Processamento de Amostra

Os meios são inoculados de acordo com as diferentes técnicas de colheitas. Quando colhidos em seringa, em condições anaeróbias, inocula-se uma ou duas gotas de amostra em COS e PVX, MacConkey e caldo de tioglicolato e caldo de enriquecimento Schaedler. Quando a amostra é colhida em frasco estéril, com uma pipeta inoculam-se o meio de MacConkey, COS e PVX e o caldo de enriquecimento de tioglicolato. Quando colhido em zaragatoa, inocula-se com a zaragatoa os meio de MacConkey, COS e PVX. Estriam-se as placas de modo a produzir colónias isoladas. Além dos meios inoculados, prepara-se a respetiva lâmina para observação direta em coloração de Gram.

Relativamente aos caldos de enriquecimento, após o período de incubação, estes são repicados para COS e, se for o caso, SCS e respetivas lâminas para observação direta em coloração de Gram.

IX. Cateter e Biópsias

O uso de cateteres é parte integral de cuidados hospitalares para administração de fluidos, medicação, antibióticos, nutrição, entre outros. Infelizmente, uma das consequências do uso de cateter é a colonização deste por bactérias e/ou fungos que leva à sua infeção e até bacterémia. Durante a inserção do cateter, *Staphylococcus epidermidis* pode ser arrastado e ser agente causador de infeção devido à sua capacidade de produzir biofilme que ajuda na adesão à superfície do cateter e, consequentemente, à sua proliferação. Além deste agente, podem-se encontrar outros agentes etiológicos *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e outros estafilococos coagulase-negativo.⁽²²⁾

Qualquer agente pode causar infeção no tecido daí que é importante que as práticas no laboratório sejam adequadas para isolar estes agentes. Agentes fastidiosos como *Brucella* spp. e agentes de doenças crónicas podem requerer o uso de meios especiais e períodos de incubação longos para isolar o organismo, como *Legionella* spp..⁽²⁶⁾

i. Processamento de Amostra

A sementeira do cateter é realizada por rolamento na superfície da placa de COS. Se este estiver inteiro, corta-se com uma tesoura estéril em três porções: ponta proximal, média e distal. Com uma pinça estéril transfere-se os diferentes segmentos para geloses de sangues devidamente identificadas; rola-se 4 a 5 vezes fazendo pressão contra a superfície da COS. Durante a valorização clínica, a cultura é considerada positiva sempre que o número de colónias for superior a 15.

Relativamente a biópsias, corta-se com uma tesoura estéril pequenas porções do tecido e com uma pinça estéril, inocula-se o meio de MacConkey, COS e PVX e caldo de tioglicolato. Estriam-se as placas de modo a poder obter colónias isoladas e vão a incubar para posteriormente se fazer a valorização clínica.

X. Exsudado ocular/auricular

Apesar dos mecanismos de defesa como, por exemplo, as pestanas e produção de lágrimas, o olho e a sua estrutura está predisposto a infeções por diversos microrganismos. A nível auricular, um trauma local, a presença de corpos estranhos ou humidade excessiva pode levar a infeções externas do ouvido e com menos frequência, uma infeção do ouvido médio pode estender por drenagem purulenta até ao ouvido externo. As principais infeções oculares e auriculares e os seus respetivos agentes etiológicos estão listadas na Tabela 20.⁽²⁷⁾

Tabela 20 - Principais infecções oculares e auriculares e respetivos agentes etiológicos responsáveis. ⁽²⁷⁾

Órgão	Infeção	Agente Etiológico
Olho	Blefarite	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Conjuntivite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Haemophilus aegyptus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.
	Queratite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Bacillus</i> spp.
	Queratoconjuntivite	Agentes envolvidos na conjuntivite e queratite.
	Endoftalmite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Outros organismos Gram-negativo
	Canaliculite	<i>Actinomyces</i> spp. <i>Propionibacterium proptonicum</i>
	Dacriocistite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
	Dacrioadenite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
Ouvido	Otite Externa	<u>Aguda:</u> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Outros bacilos Gram-negativo <u>Crónica:</u> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaeróbios
	Otite Média	<u>Aguda:</u> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <u>Crónica:</u> Anaeróbios

i. Processamento de Amostra

À semelhança das outras amostras, tanto para amostras oculares como para amostra auriculares, prepara-se uma lâmina para exame direto por coloração de Gram. Semeia-se em COS e PVX, assim como em meio de MacConkey. Estriam-se as placas de modo a produzir colónias isoladas e vão a incubar.

3.2.3. Identificação dos Organismos

Após os respetivos períodos de incubação, a técnica superior faz a valorização clínica tendo em conta a leitura das lâminas coradas por Gram. Posteriormente, segue-se para a execução de provas de identificação do agente infeccioso e as provas de suscetibilidade aos antimicrobianos.

A primeira informação usada para o processo de identificação é a descrição macroscópica das colónias e/ou a sua morfologia. Isto inclui o tipo de hemólise, pigmentação, tamanho, textura (opaca, translúcida ou transparente), viragem do pH do meio, entre outros. Por outro lado, a descrição microscópica da coloração de Gram permite identificar a morfologia celular (cocos ou bacilos) e separar os organismos Gram-positivo dos Gram-negativo.

I. Gram-positivo

Os Gram-positivos aeróbios dividem-se em dois grupos, catálase-positivos e catálase-negativos. Procede-se ao teste da catálase com a adição de peróxido de hidrogénio.

Exame Direto

É importante diferenciar os Gram-positivo em cocos ou bacilos. Por exemplo, dependendo desta morfologia celular e a forma como se agrupam, é possível suspeitar de determinado agente causador de infeção. Cocos em cacho (isolados, aos pares ou em tétradas) geralmente são indicativos de *Staphylococcus* spp., enquanto cocos em cadeia são indicativos de *Streptococcus* spp. e os diplococos podem ser indicativos de *Staphylococcus pneumoniae*.

Exame Cultural

Os isolados nos meios de cultura, nomeadamente COS e PVX, podem apresentar hemólise alfa, beta ou nenhuma hemólise aparente; um halo a envolver a colónia ou viragem do pH do meio.

Durante a observação e valorização do crescimento, em colónias suspeitas, procede-se ao teste de catálase (ANEXO 9):

- Se catálase-positivo, com aglomeração de cocos, há suspeita de *Staphylococcus* spp.. Prossegue-se com o teste da coagulase com *Pastorex*[®] *STAPH-PLUS* (ANEXO 10), um teste de aglutinação em lâmina rápido.
 - Se coagulase-positivo, é indicativo de *S. aureus*. Procede-se à confirmação da identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel PMIC (ANEXO 11).
 - Se coagulase-negativo, é indicativo de *Staphylococcus* coagulase-negativo.
 - Em amostras de urina hemoculturas ou cateteres, *S. saprophyticus* é valorizado. Procede-se à prova de Novobiocina (ANEXO 12) e à confirmação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel PMIC (ANEXO 11).
 - Dado que *S. epidermidis* pode advir de contaminação em hemoculturas ou cateteres, positivo em 2 ou mais amostras este deve ser valorizado. Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel PMIC (ANEXO 11).
- Se catálase-negativo, com cocos em cadeia há suspeita de *Enterococcus* spp. ou de *Streptococcus* spp. Neste caso é necessário ter em conta a presença ou ausência de hemólise nas geloses.

- Presença de α -hemólise, com diplococos, faz-se a prova da Optoquina (ANEXO 13) e identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel SMIC (ANEXO 11).
- Presença de β -hemólise, com cocos em cadeia, faz-se a pesquisa de estreptococos com *SLIDEX Strepto Plus* (ANEXO 14) para identificar o grupo seguindo *Lancefield* fazendo a identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel SMIC (ANEXO 11).
- Sem hemólise, cocos em cadeia, faz-se a prova da bile-esculina (ANEXO 15) e procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel PMIC (ANEXO 11).

II. Gram-negativo

Os Gram-negativos isolados com mais frequência em laboratório são do género *Enterobacteriaceae*, grande parte associado às espécies que colonizam o trato gastrointestinal ou associados a infeções humanas. Podem ainda ser encontrados em animais ou no meio ambiente. Por outro lado, podem ser isolados não enterobactérias também estas associadas a infeções humanas.

Exame Direto

De forma a orientar a pesquisa do agente infeccioso, é importante a diferenciação da morfologia celular e a forma como se agrupam. As formas bacilares, Gram-negativos, com extremidades arredondadas, são características do género *Enterobacteriaceae* ou cocos Gram-negativos aos pares ou em cadeia, característico de *Neisseria* spp. e *Moraxella* spp..

Exame cultural

A observação e valorização do crescimento das colónias, o seu aspeto e se há ou não viragem do pH do meio, é de extrema importância. Os isolados estão em meios

como COS e PVX, em meio de MacConkey, em CLED para o caso das urinas, entre outros.

Se no exame direto estiverem presentes bacilos Gram-negativo, é possível encontrar no meio de MacConkey:

- Colónias com aspeto cor-de-rosa com acidificação do meio, indicativo de bactérias fermentadoras de lactose, por exemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. ou *Klebsiella* spp. Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).
- Colónias translúcidas sem pigmentação, indicativo de bactérias não fermentadoras de lactose, por exemplo, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp. ou *Pseudomonas* spp.. Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).
- Sem crescimento no meio de MacConkey mas com crescimento em PVX, pode ser indicativo de *Haemophilus* spp., por exemplo, em amostras de exsudados auriculares e oculares. Procede-se então à Prova de fator X e V em MH2 (ANEXO 16).
 - Posteriormente, após confirmação do resultado da prova, procede-se à identificação de espécie pelo sistema API/ATB caso o resultado seja negativo; ou procede-se à identificação de espécie com API NH (ANEXO 17) e painel de ATB com ATB HAEMO EU (ANEXO 18).

Naturalmente, esta avaliação será feita em conjunto com outros meios de cultura de acordo com o tipo de amostra semeada como, por exemplo, SS e Hektoen e COS. Assim, será possível orientar com mais facilidade a pesquisa e identificação dos microrganismos.

Quando no exame direto se observam bacilos Gram-negativos, MacConkey com colónias não fermentadoras de lactose, em combinação com o meio SS, com colónias incolores ou ligeiramente coloridas, com ou sem centro negro (produção de H₂S) e/ou meio Hektoen, com colónias verdes ou azuis, com ou sem centro negro, é indicativo de uma forte possibilidade de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. Procede-se ao teste de Kligler (ANEXO 19) e de Hidrólise de Ureia (ANEXO 20).

- Caso seja positivo para *Salmonella* spp., procede-se confirmação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11) e, posteriormente, à identificação de espécie por aglutinação poly A-I.
- Caso seja positivo para *Shigella* spp., procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11) e à identificação de espécie com anti-soros de *Shigella*.

Relativamente ao meio CLED, com bacilos Gram-negativo no exame cultural, é possível encontrar:

- Colónias amarelas com acidificação do meio, é indicativo de bactérias fermentadoras de lactose, por exemplo, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Procede-se à contagem de colónias de acordo com a tabela 18 e identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).
- Colónias incolores ou azuis esverdeadas sem viragem do meio são indicativos de bactérias não fermentadoras de lactose, por exemplo, *Proteus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).

Relativamente a bacilos Gram-negativo de amostras semeadas em gelose SMAC, a pedido do clínico, à partida com suspeita de *Escherichia coli* enterohemorrágica:

- Se houver crescimento de colónias não fermentadoras de sorbitol típicas de *E. coli* O157:H7, procede-se ao *E. coli* O157 Test (ANEXO 21) com reagentes de látex, para determinar se o isolado é uma estirpe potencialmente produtora de verocitotoxina.

Em casos particulares, amostras de fezes semeadas em:

- Gelose CIN, com bacilos Gram-negativos, o desenvolvimento de colónias com forma de “*bull’s eye*” é caraterístico de *Yersinia enterocolitica*.
 - No entanto, dado que grande maioria de *Aeromonas* spp. também produzem colónias com aspeto semelhante neste meio, é necessário fazer um teste de oxidase (ANEXO 22) para confirmar a presença de *Yersinia enterocolitica* (oxidase negativa).
 - Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).
- Meio TCBS, com bacilos Gram-negativos móveis, curvados em forma de vírgula, com crescimento de colónias amarelas ou verdes, dependendo se são fermentadoras de sacarose ou não, são caraterísticas de *Vibrio* spp.
 - Procede-se à identificação de espécie e painel de ATB pelo sistema de painéis *BD Phoenix* Painel UNMIC (ANEXO 11).

Quando em exame direto se observam cocos Gram-negativo aos pares ou em cadeia intracelulares ou não intracelulares, normalmente suspeita-se da presença de *Neisseria* spp e *Moraxella* spp., respetivamente. No exame cultura da:

- Tanto na gelose VCA3 como PVX, a presença de colónias brancas opacas brilhantes são indicativas de *Neisseria* spp. Procede-se ao teste da oxidase (ANEXO 22).
 - Se oxidase positivo, segue-se para a identificação de espécie pelo sistema API NH (ANEXO 17) e ATB de *Neisseria* em discos.
- Na gelose PVX, a partir de amostras de pús do ouvido ou secreções respiratórias:
 - Colónias pequenas, redondas e esbranquiçadas, sem aderência ao meio, são caraterísticas de *Moraxella* spp. Procede-se ao teste da oxidase (ANEXO 22).

- Se oxidase positivo, segue-se a identificação de espécie com API NH (ANEXO 17) e painel de ATB com ATB HAEMO EU (ANEXO 18).

3.2.4. Teste de Sensibilidade a Antibióticos

Os testes de sensibilidade a antibióticos são maioritariamente executadas pelo método das microdiluições a partir dos sistemas de painéis *BD Phoenix* (ANEXO 11) ou das galerias ATB de antibiograma da *BioMérieux* de leitura manual ou através do aparelho *ATBTM Expression*. Estas galerias testam uma grande variedade de antibióticos em simultâneo. Os resultados são dados como sensível (S), intermédio (I) e resistente (R).

É cada vez mais comum o aparecimento de bactéria beta-lactamase de largo espectro resistentes a cefalosporinas, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.

Em casos particulares, recorre-se ao método de difusão em disco em MH2 a partir de uma suspensão de densidade 0,5 *McFarland* e a adição de discos impregnados de antibiótico. O método de difusão em agar é executado *Neisseria meningitidis* e bactérias *Staphylococcus* spp. para os antibióticos oxacilina, teicoplanina e vancomicina (OTV). Os resultados são igualmente dados como sensível (S), intermédio (I) e resistente (R), de acordo com as medições dos halos e a sua interpretação segundo as regras EUCAST.

Procede-se ao método de difusão por tiras E-Test em MH2 para a determinação de CMI de antibióticos, quantificando diretamente a sensibilidade microbiana. À semelhança do método de difusão em disco, é necessário a preparação de uma suspensão do organismo isolado a 0,5 *McFarland*. Este teste é executado, essencialmente, para confirmar multirresistentes em fungos. A interpretação deve ser efetuada de acordo com as regras de padronização CLSI.

3.3. EXAME MICOLÓGICO

A maioria dos fungos são saprófitos existindo na natureza enriquecida por matéria nitrogenada podendo viver como um oportunista no Homem ou animais. Geralmente, o Homem torna-se um hospedeiro acidental para fungos por inalação de esporos ou pela introdução em tecido devido a um evento traumático. As transmissões pessoa para pessoa e de animais para pessoa são pouco usuais, sendo a maioria por dermatófitos.

Com exceção dos fungos dimórficos, o Homem é relativamente resistente a infecções causadas por fungos. Foram listados alguns dos possíveis fungos causadores de infecções (Tabela 21) encontrados nos diferentes locais do corpo humano.⁽²⁸⁾

Tabela 21 - Alguns dos possíveis organismos fúngicos que podem causar infecção no Homem e as suas formas clínicas encontradas nos diferentes tipos de amostra.⁽²⁸⁾

Organismo	Locais de Infecção	Forma Clínica
<i>Aspergillus</i> spp.	Pulmão, olho, pele e unhas	Hifa
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Pulmão, pele, ossos longos	Levedura
<i>Candida</i> spp.	Trato intestinal e urogenital, unhas, vísceras e sangue	Levedura, pseudo-hifa ou hifa
<i>Coccidioides immitis</i>	Pulmão, pele e meninges	Endósporos
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Pulmão, pele e meninges	Levedura
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Pulmão, medula óssea, sangue	Levedura
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Pulmão, pele e membranas mucosas	Levedura
<i>Penicillium marneffeii</i>	Pulmão, pele, trato intestinal e urinário, ouvidos e córnea	Hifa
<i>Sporothrix schenckii</i>	Pulmão, pele, sistema linfático e meninges	Levedura
Dermatófitos	Pele, cabelo e unhas	Hifa

Alterações no sistema imunológico do hospedeiro, quer seja devido a agentes imunossupressores ou outras doenças, podem levar a infecções por estes organismos que, noutras circunstâncias, fariam parte da flora normal ou seriam não patogénicos. Pacientes imunodeficientes, diabéticos ou com uma função imunológica deficiente desenvolvem infecções fúngicas com mais facilidade. Outros fatores como cirurgias complexas ou terapias antibacterianas favorecem, também, o desenvolvimento destas mesmas infecções.⁽²⁸⁾

Muitas das infecções fúngicas têm um foco principal nos pulmões, no entanto, a disseminação para outras regiões pode acontecer e podem ser recuperados a partir de amostras não respiratórias. Assim sendo, a seleção e colheita da amostra apropriada é de extrema importância.⁽²⁸⁾

3.3.1. Exame Direto

Este procedimento, além de ser mais rápido, oferece a primeira prova da etiologia da infecção no paciente. Na presença de fungos observam-se formas leveduriformes ou filamentosas que, quando coradas com Gram, aparecem com a coloração azul, consistente com organismos Gram-positivo.

3.3.2. Exame Cultural

Os fungos observados em laboratório podem ser divididos em formas leveduriformes e filamentosas (bolos). As colônias de leveduras apresentam-se húmidas, cremosas e opacas ou colônias pastosas. Por outro lado, as colônias de fungos filamentosas apresentam-se macias, com aspeto algodoado podendo apresentar esporos. No caso particular dos fungos dimórficos a sua forma varia com temperatura. Geralmente, a temperaturas 25° - 30° C encontram-se sob a forma leveduriforme, enquanto a temperaturas 35° - 37° C apresentam-se sob a forma filamentosa.

Todas as amostras que requerem exame micológico, e de pacientes HIV positivo, são inoculadas em meio de Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC). Este meio com agente antibacteriano é ideal para amostras com contaminantes bacterianos. O meio é inoculado diretamente das amostras e meios de enriquecimento ou colônias suspeitas. Em muitos casos, as amostras não contém apenas o agente etiológico, mas também contêm bactérias contaminantes ou fungos que rapidamente vão se sobrepor sobre o crescimento mais lento do fungo patogénico. É comum encontrar *Candida* spp. em meios de bacteriologia de rotina e em meios de cultura fúngica. Em caso de dúvida, trata-se de uma colónia de leveduras ou bacteriana, faz-se exame direto entre lâmina e lamela com uma gota de água destilada.

É necessário ter em atenção o processamento de determinadas amostras. Amostras de urina são semeadas pelo método de Ansa Calibrada com uma ansa de 1µL,

valorizando-se a partir de 10^4 UFC/mL. As raspagens de pele, transfere-se escamas de pele para a placa com uma zaragatoa embebida em água destilada. Na possibilidade de se tratar de fungos de crescimento lento as amostras devem ser incubadas em meios húmidos a 30° C para crescerem melhor. Quando as amostras são biopsias, o tempo de incubação é de um mês, para o caso de existirem fungos de crescimento longo. Por fim, as amostras de sangue, colhe-se aproximadamente 8 mL de sangue para um frasco BACTEC Mycosis. Posteriormente, caso haja crescimento de fungos, repica-se para meio de SGC e PVX e prepara-se uma lâmina para exame direto.

3.3.3. Identificação dos Organismos

Após incubação procede-se à observação e interpretação meio inoculados de SGC. Devido à presença de antibióticos no meio, Gentamicina e Cloranfenicol, o crescimento de bactérias é inibido. Assim sendo, será de esperar que todo e qualquer crescimento em SGC seja de fungos. A interpretação das placas requer a observação da morfologia macroscópica e microscópica das colónias.

Quando há crescimento de leveduras ou fungos filamentosos, as colónias devem ser analisadas quanto ao aspeto e cor. A diferenciação das leveduras por observação microscópica é geralmente impossível, mas por vezes, algumas caraterísticas particulares a determinadas espécies servem para sugerir a identificação. Deste modo, certas caraterísticas morfológicas são úteis na diferenciação de leveduras incluindo o tamanho, a presença ou ausência de cápsula, e brotamentos com base estreita ou larga. Por exemplo, variabilidade no tamanho com evidências de cápsula e brotamento com base estreita são caraterísticas úteis para distinguir *Cryptococcus neoformans* de *Candida* spp..

Por forma a distinguir *Cryptococcus neoformans* de *Candida* spp. e, por sua vez, distinguir *Candida albicans* de outras cândidas procede-se a dois testes, o teste com tinta da china e a prova da filamentação, respetivamente.

No caso de fungos filamentosos, isolados do meio SGC, a observação das estruturas filamentosas e identificação do fungo é feito a partir do teste da Cinta de Scotch (fita-cola) em lâmina com azul de lactofenol ou teste de Montagem em Slide que requer a preparação de uma pequena porção de meio SGC inoculado entre lâmina e

lamela, em câmara húmida. Estes métodos necessitam ser feitos com cuidado de modo a preservar as estruturas de reprodução dos fungos filamentosos permitindo identificar o fungo corretamente, tendo em conta se são hifas septadas ou asseptadas ou se são pigmentadas ou não pigmentadas. Além da avaliação microscópica das hifas, é importante fazer uma avaliação macroscópica quanto à cor das colónias (frente e verso).

I. Testes de Identificação e Sensibilidade a Antifúngicos

De forma a diferenciar *Cryptococcus neoformans* de *Candida* spp. efetua-se o teste da tinta da china, que consiste em tornar visível a cápsula do *Cryptococcus neoformans*. As partículas do pigmento da tinta não entram na cápsula formando um halo em redor da célula.

Por outro lado, para diferenciar a *Candida albicans* das outras cândidas, efetua-se a prova da filamentação ou o teste de blastese. Uma evaginação da parede celular que se torna tubular e sem constrição na base é designado de tubo germinativo, representando a fase inicial da formação da hifa. Se os gomos se alongam e não se dissociam, formando gomos subsequentes, então forma-se uma pseudo-hifa.

A prova de filamentação consiste na incubação de uma suspensão homogénea de uma pequena quantidade de levedura em soro humano, à temperatura de 37° C durante 3h. Após este período de incubação, procede-se à observação microscópica entre lâmina e lamela. O período de incubação não deve ser mais de 3h, dado que existe a inconveniência de não conseguir distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Se a prova de filamentação é positiva para *C. albicans*, apenas se inocula o antifungigrama de leveduras ATB FUNGUS 3 da BioMérieux, um antifungigrama para leveduras que permite determinar a sensibilidade das leveduras e *Cryptococcus neoformans* aos antifúngicos em meio semi-sólido em condições próximas da técnica de referência de micro-diluição. Contém 16 pares de cúpulas para controlo de crescimento e 5 antifúngicos a concentrações diferentes que permitem determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI), classificando a estirpe como sensível, intermédia ou resistente. A levedura a testar é colocada em suspensão, em API® NACl 0,85% Medium, de opacidade equivalente ao padrão 2 de McFarland e transferida para o meio de cultura ATB F2 Medium e inoculada na galeria. Após incubação de 24h, a leitura de

crescimento é feita visualmente quer com o sistema de leitura automática ATB ou *mini API*[®]. O resultado obtido permite fornecer uma CMI para a Anfotericina B, Fluconazol, Itriconazol, Variconazol e Flucitosina.

Se a prova de filamentação for negativo, ou seja, não há formação de tubos germinativos, a identificação das leveduras é feita através de galerias de identificação de leveduras, nomeadamente, ID 32C da *BioMérieux*. Esta consiste em 32 testes de assimilação miniaturizada e uma base de dados. As 32 cúpulas contêm substratos carbonados sob a forma desidratada. O princípio do *kit* consiste na assimilação dos vários substratos carbonados, sendo o desenvolvimento das leveduras detetado pela opacidade nas cúpulas, como reação positiva. A levedura a testar é colocada em suspensão, em *API*[®] *NACl 0,85% Medium*, de opacidade equivalente ao padrão 2 de *McFarland* e transferida para o meio de cultura *API*[®] *C Medium* e inoculada na galeria. Após 24 a 48h de incubação lê-se o crescimento em cada cúpula no aparelho *ATB*TM *Expression* ou visualmente. Além desta galeria, para provas de filamentação negativas, determina-se a sensibilidade a antifúngicos através da inoculação da galeria *ATB FUNGUS 3* da *BioMérieux*.

Relativamente ao aparelho de leitura automática, o *ATB*TM *Expression*, este procede à leitura automática das galerias desenvolvidas pelo *API System* para identificar organismos ou para realizar testes de suscetibilidade. As leituras de opacidade são feitas por colorimetria ou por turbidimetria. Os resultados são transmitidos para o computador e interpretados pelo *software ATB Plus*. Nos casos em que a leitura automática não é possível, realiza-se a leitura visual e procede-se à interpretação dos resultados de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. EXAME PARASITOLÓGICO E VIROLÓGICO

3.4.1. Parasitológico

Parasitas podem causar doenças grave, com risco de vida para pacientes imunodeficientes ou imunossuprimidos mas muitos organismos atingem um estado de equilíbrio com o hospedeiro e não produzem efeitos patogénicos detetáveis. A capacidade de detetar e identificar os parasitas humanos depende de critérios morfológicos, assim como da colheita de amostra correta e fixação adequada. Uma

amostra errada ou mal colhida pode resultar na falha da detecção ou identificação errada. Foram listados alguns dos possíveis parasitas (Tabela 22) encontrados nos diferentes locais do corpo humano.⁽²⁹⁾

Tabela 22 - Locais de infecção onde possíveis parasitas podem ser encontrados, desde trofozoítos, cistos, oócitos, esporos, formas adultas, larvas ou ovos, amastigotas e tripomastigotas.⁽²⁹⁾

Local de Infecção	Parasitas	Locais	Parasitas
Sangue		Trato Intestinal	<i>Entamoeba histolytica</i>
Eritrócitos	<i>Plasmodium</i> spp.		<i>Entamoeba coli</i>
	<i>Babesia</i> spp.		<i>Entamoeba hartmanni</i>
Leucócitos	<i>Leishmania donovani</i>		<i>Endolimax nana</i>
	<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Iodamoeba bütschlii</i>
Plasma	<i>Trypanosoma</i> spp.		<i>Blastocystis hominis</i>
	<i>Loa loa</i>		<i>Giardia lamblia</i>
Medula Óssea	<i>Leishmania donovani</i>		<i>Dientamoeba fragilis</i>
SNC	<i>Taenia solium</i>		<i>Trichomonas hominis</i>
	<i>Echinococcus</i> spp		<i>Balantidium coli</i>
	<i>Naegleria fowleri</i>		<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Acanthamoeba</i> spp.		<i>Isospora belli</i>
	<i>Hartmanella</i> spp.		<i>Ascaris lumbricoides</i>
	<i>Balamuthia mandrillaris</i>		<i>Microsporidia</i>
	<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Enterobius vermicularis</i>
	<i>Trypanosoma</i> spp.		<i>Ancylostoma duodenale</i>
Pele	<i>Leishmania</i> spp.		<i>Strongyloides stercoralis</i>
	<i>Onchocerca volvulus</i>		<i>Trichuris trichiura</i>
	<i>Microflaria</i>		<i>Hymenolepis nana</i>
Úlceras Cutâneas	<i>Leishmania</i> spp.		<i>Hymenolepis diminuta</i>
	<i>Acanthamoeba</i> spp.		<i>Taenia saginata</i>
Fígado/Baço	<i>Echinococcus</i> spp.		<i>Taenia solium</i>
	<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Diphyllobothrium latum</i>
	<i>Leishmania donovani</i>		<i>Opisthorchis sinensis</i>
	<i>Fasciola hepática</i>		<i>Paragonimus</i> spp.
	<i>Opisthorchis sinensis</i>		<i>Schistosoma</i> spp.
Pulmão	<i>Pneumocystis jirovecii</i>		<i>Fasciola hepatica</i>
	<i>Echinococcus</i> spp.		<i>Fasciolopsis buski</i>
	<i>Paragonimus</i> spp.		<i>Heterophyes</i> spp.
	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Metagonimus</i> spp.
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Olho	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	<i>Ancylostoma duodenale</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>
Músculo	<i>Taenia solium</i>		<i>Loa loa</i>
	<i>Trichinella spiralis</i>		<i>Microsporidia</i>
	<i>Onchocerca volvulus</i>	Urogenital	<i>Trichomonas vaginalis</i>
	<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Schistosoma</i> spp.
	<i>Microsporidia</i>		<i>Microsporidia</i>

A identificação de parasitas inclui procedimentos laboratoriais para detetar estes organismos utilizando essencialmente critérios morfológicos e identificação visual, ao

invés de cultura e/ou testes bioquímicos. O exame microscópico requer a análise das amostras clínicas preparadas utilizando várias ampliações e prazos diferentes; identificação do organismo também depende da experiência e formação do especialista que vai examinar a amostra e interpretar os resultados. Muitas amostras clínicas, tais como amostras do trato intestinal ou respiratório, podem conter artefactos que dificultam a diferenciação de parasitas por isso requerem uma concentração prévia de modo a aumentar a probabilidade de encontrar parasitas. Após tratamento das amostras, são preparadas as lâminas para serem observadas a fresco ou coradas. Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp., cora-se uma lâmina com coloração de ZN. No caso de presença de oócitos, estes aparecem com uma coloração rosa, com esporócitos avermelhados.⁽²⁹⁾

Em amostras de sangue a identificação de parasitas é baseada em exame microscópico de esfregaços corados, muitas vezes utilizando alta ampliação usando óleo de imersão (100x). Os esfregaços podem ser feitos a partir de sangue fresco ou com anticoagulante. Quanto à coloração, a recomendada é por *Giemsa* mas os parasitas também podem ser observados no esfregaço de sangue usando a coloração Wright.⁽²⁹⁾

Em amostras de LBA e expetoração induzida usa-se um conjunto de imunofluorescência indireta para detecção de oócitos de *Pneumocystis jirovecii*.

A pesquisa de flagelados é feita a partir de amostras cérvico-vaginais, quando pedido pelo clínico ou em pacientes grávidas, a zaragatoa é mergulhada em 1 mL de soro fisiológico e incuba durante 30 minutos a 37°C. Após incubação, faz-se o exame a fresco com objetiva de 40x para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

I. Concentração de Parasitas Intestinais

Em caso de suspeita clínica de parasitas intestinais, é fundamental a pesquisa de parasitas, como ovos, larvas de helmintas ou cistos de protozoários, em três amostras de fezes refrigeradas de três dias consecutivos. As técnicas utilizadas para concentrar amostras de fezes têm como objetivo aumentar o número de cistos, trofozoítos, ovos ou larvas na preparação, eliminar a maior parte do material orgânico fecal e preservar os organismos para que possam ser identificados.

No laboratório recorre-se ao *Easy-Copros* Concentrador de Parasitas Intestinais, pelo método de Ritchie modificado. Neste método adiciona-se um pouco de amostra homogeneizada para um tubo contendo formalina 10%, que fixa e preserva as estruturas agitando-se vigorosamente até obter uma suspensão de fezes em formalina 10%. De seguida, adiciona-se à suspensão acetato de etilo que, além de ser menos inflamável que o éter do método convencional, aumenta a eficiência do método na deteção global de formas parasitárias. A este tubo enrosca-se um outro tubo cónico com filtro e inverte-se a suspensão. Centrifuga-se a suspensão, durante cerca de 10 minutos a 1500 rpm, onde o gradiente leva à formação de um rolhão no sobrenadante e no fundo do tubo cónico um sedimento com as formas parasitárias. Rejeita-se o sobrenadante com o rolhão e ressuspende-se o sedimento para ser observado a fresco entre lâmina e lamela.

II. Pesquisa de *Pneumocystis jirovesii*

O *Detect IF Pneumocystis jirovesii AXIS-SHIELD* é um conjunto de imunofluorescência indireta qualitativa para deteção de oócitos de *P. jirovesii* em amostras de lavados broncoalveolares e de expetoração induzida. É um dos principais agentes que infetam os imunodeprimidos provocando infeção pulmonar.

As amostras são previamente centrifugadas e lavadas de modo a serem concentradas. Os sedimentos são ressuspensos, colocados em lâminas e são fixadas. De seguida, são submetidas a digestão enzimática onde o anticorpo contra *P. jirovesii* e o anticorpo anti-ratinho marcado com fluorescência são adicionados alternadamente, durante os diferentes passos de incubação, enxaguamento, secagem com papel absorvente e secagem ao ar. As lâminas são observadas em microscopia de fluorescência. Os oócitos apresentam-se com fluorescência verde-maçã, podendo estar marcadas de forma uniforme ou heterogénea. A presença de oócitos de *P. jirovesii* em lavados broncoalveolares ou expetoração induzida indica infeção por *P. jirovesii*. Considera-se positivo quando 5 ou mais oócitos são observados na lâmina; como resultado duvidoso quando 1 a 5 oócitos são observados e como negativo quando nenhum oócito é observado na lâmina.

3.4.2. Viroológico

Os vírus são transmitidos de pessoa para pessoa por via respiratória, oro-fecal, contacto sexual, trauma, infeção através de objetos contaminados ou seringas, transplantes, transfusões, mordedelas de artrópodes ou animais e durante a gestação por via transplacentária. Uma vez introduzidos no hospedeiro o vírus infeta as células suscetíveis.⁽³⁰⁾

As infeções com causa virológica são essencialmente do trato respiratório como bronquite, bronquiolite e até pneumonia. Os vírus em causa são Vírus Sincicial Respiratório (RSV), Influenza, Parainfluenza, Adenovírus e Rinovírus. O RSV é a principal causa de doença respiratória em todas as idades sendo o vírus mais frequente em infeções das vias respiratórias graves em bebés e crianças com menos de 4 anos de idade como também responsável por problemas graves em pacientes idosos e imunocomprometidos que deram origem a taxas de mortalidade.⁽³⁰⁾

Quanto a infeções gastrointestinais causadas por agentes virológicos, são mais frequentes os Rotavírus e Adenovírus. Estes causam lesão da mucosa intestinal levando a uma absorção deficiente no intestino delgado, resultando na alteração do equilíbrio da água e eletrólitos e na excessiva secreção de fluídos.⁽³⁰⁾

No laboratório de Microbiologia efetuam-se essencialmente testes rápidos para a pesquisa Rotavírus e Adenovírus em amostras de fezes e pesquisa do RSV, Influenza, Parainfluenza e Adenovírus nas amostras do trato respiratório. Todas as amostras colhidas para deteção do vírus devem ser processadas imediatamente no laboratório. Caso não seja possível processar logo, devem ser refrigeradas imediatamente, até 24h após a colheita.⁽³⁰⁾

I. Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus

Combi-Strip da Coris Bioconcept é um teste imunocromatográfico para deteção de Rotavírus e Adenovírus em amostras de fezes diluídas em tampão. O teste consiste numa tira de membrana imunocromatográfica com partículas de ouro coloidal e anticorpos monoclonais específicos para Rotavírus e Adenovírus (Figura 20).

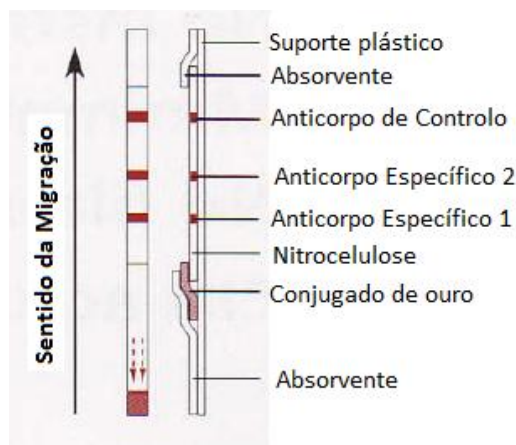


Figura 20 - Esquema do sentido de migração da amostra numa tira de membrana imunocromatográfica com partículas de ouro coloidal e anticorpos monoclonais/policlonais específicos para Adenovírus (1) e Rotavírus (2).

Quando a tira imunocromatográfica é mergulhada na suspensão fecal, a amostra e o conjugado de ouro solubilizado migram por capilaridade pela membrana de nitrocelulose entrando em contacto com o primeiro anticorpo monoclonal dirigido contra o Adenovírus. Se a amostra contém Adenovírus, o complexo conjugado-Adenovírus permanece ligado ao anticorpo anti-Adenovírus, surgindo assim, uma linha vermelha. A solução continua a migrar por capilaridade até encontrar o anticorpo anti-Rotavírus. Se a amostra contém Rotavírus, o complexo conjugado-Rotavírus vai permanecer ligado ao anticorpo anti-Rotavírus, surgindo uma linha vermelha. Os resultados surgem dentro de 5 a 10 minutos e a intensidade das linhas dependem do título viral da amostra.

A solução continua a migrar por capilaridade até entrar em contacto com um terceiro anticorpo (anticorpo anti-ratinho IgG) que se liga ao conjugado excedente, produzindo uma linha vermelha de controlo que confirma que o teste foi realizado devidamente.

II. Pesquisa do Vírus Sincicial Respiratório

O *RSV Respi-Strip da Coris Bioconcept* é um teste imunocromatográfico para a deteção de RSV, em amostras do trato respiratório. Este teste baseia-se numa tecnologia de membrana com nanopartículas de ouro coloidal semelhante ao teste de pesquisa de Rotavírus e Adenovírus. A membrana de nitrocelulose é sensibilizada com um anticorpo monoclonal dirigido contra um epítipo da proteína F do RSV. O segundo

anticorpo monoclonal é dirigido contra um segundo epitopo da proteína F e está conjugado com partículas de ouro coloidal.

Quando a amostra entra em contacto com a tira, o conjugado solubilizado migra com a amostra por capilaridade e tanto o conjugado como a amostra entraram em contacto com o anticorpo anti-RSV que está impregnado na membrana de nitrocelulose. Se o vírus estiver presente na amostra, o complexo conjugado-RSV permanecerá ligado ao anticorpo anti-RSV. Se for positivo para RSV, o resultado é visível dentro de 10 a 15 minutos, sob a forma de uma linha vermelha na tira de nitrocelulose. A solução continua a migrar para encontrar um terceiro anticorpo para controlo que se liga a um conjugado excedente, produzindo uma segunda linha vermelha o que confirma que o teste foi realizado devidamente.

Caso o resultado da pesquisa de RSV pelo teste rápido seja negativo, centrifuga-se a amostra e realiza-se um segundo teste, o *Respiratory Virus Panel* da *Biotin*. Este é um teste de imunofluorescência *in vitro*, para despiste e identificação de Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3 e RSV, por detecção indireta em cultura de células. A identificação do vírus específico é demonstrada utilizando-se anticorpos monoclonais anti-Adenovírus, anti-Influenza A e B, anti-Parainfluenza 1, 2 e 3 e anti-RSV.

As amostras fixadas são incubadas com anticorpos monoclonais de rato anti-viral na lâmina de vidro. Se o antigénio viral específico estiver presente na amostra, um complexo estável é formado com o anticorpo. Após lavagem, o conjugado anti-IgG de ratinho é adicionado ligando-se ao complexo antigénio-anticorpo. Qualquer reagente não ligado é removido por lavagens e a amostra é visualizada através de um microscópio de fluorescência.

Uma reação positiva é caracterizada por uma fluorescência verde brilhante. As células não infetadas apresentam-se vermelhas devido ao corante de contraste Azul de Evans presente no conjugado. O tipo de coloração dependerá do vírus presente e reflete o seu tipo de crescimento. A amostra é positiva quando se observa pelo menos duas células ou mais com fluorescência verde brilhante em campo de observação de 40x.

3.5. EXAME MICOBACTERIOLÓGICO

O processo envolvido no diagnóstico laboratorial de organismos pertencentes ao género *Mycobacterium*, como o complexo de *Mycobacterium tuberculosis*, principais agentes causadores de tuberculose. Esta é uma doença de declaração obrigatória de importância global.

A transmissão é feita por inalação de pequenos aerossóis infetados com micobactérias, contidos em gotículas de saliva de pessoas com tuberculose que tosse, espirram e/ou falam. Outra via de transmissão dos aerossóis infetados é a manipulação de lesões dos doentes ou o processamento de amostras. Dada à sua dimensão, os aerossóis permanecem na corrente de ar durante muito tempo e uma vez inalados, alojam-se nos alvéolos pulmonares. Até surgirem os primeiros sinais e sintomas, a incubação do hospedeiro pode durar entre semanas ou mesmo anos.

Devido a esta particularidade de transmissão por aerossóis, as amostras recebidas para pesquisa de micobactérias, tanto por exame direto ou cultural, devem ser manuseadas de acordo com determinadas normas de segurança. Assim sendo, o laboratório está equipado com instalações, equipamentos e material que permitem reduzir ao mínimo o risco de infeção. Idealmente é recomendado seguir as práticas de biossegurança de nível 2 e o uso de equipamentos de contenção como para a preparação de esfregaços e culturas de micobactérias. Todos os procedimentos produtores de aerossóis são efetuados em Câmaras de Fluxo Laminar classe II A/B3 e as amostras são centrifugadas numa centrífuga com retenção de aerossóis.

3.5.1. Descontaminação das Amostras

As amostras contaminadas necessitam ser processadas de forma a destruir as bactérias contaminantes de crescimento rápido ou reduzidos em número e as micobactérias são libertas das mucinas e das células.

A descontaminação é feita essencialmente nas urinas, expetorações/secreções brônquicas, fezes e pús. Em alguns casos, por exemplo, expetorações, urinas e fezes, é conveniente que a colheita seja efetuada em três dias consecutivos para aumentar a probabilidade de deteção.

Antes de iniciar o processo de descontaminação, prepara-se de uma solução de descontaminação e de tampão fosfato a pH 6,8. A solução de descontaminação consiste em N-acetil-L-cisteína com hidróxido de sódio (NALC-NaOH), onde NALC atua como um agente mucolítico e NaOH como descontaminante. O tampão de fosfato a pH 6,8 serve para lavar as amostras após a descontaminação e diminuir a atividade agressiva do NALC-NaOH.

Terminado o processo de descontaminação, as amostras são centrifugadas a 3500 rpm durante 15 a 20 minutos, de forma a concentrar as micobactérias e aumentar a possibilidade de detecção por coloração e cultura.

Por outro lado, LCR e biópsias não precisam de sofrer descontaminação. Para amostras com volume considerado, antes de semeadas, são concentradas por centrifugação, enquanto amostras de reduzida quantidade são semeadas diretamente sem nenhum passo adicional. Para amostras de sangue, faz-se a hemocultura em três frascos BACTEC Myco/F Lytic apropriados para o crescimento de micobactérias.

3.5.2. Exame Direto

Estruturalmente o *Mycobacterium* spp. é constituído por uma parede com ácido N-glicomurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, com teor elevado em lípidos. Esta particularidade torna as micobactérias difíceis de corar por Gram. São denominados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pois uma vez corados com corantes especiais, estes não descoram com a adição de álcool-ácido.

As colorações efetuadas para a detecção de *Mycobacterium* spp., considerando a particularidade da parede, são de *Kinyoun* a frio e de Auramina por fluorescência. O laboratório tem disponível o *kit* de reagentes *BD TB Stain Kits and Reagents*. Contrariamente ao que acontece para a coloração de esfregaços com Gram, a coloração de esfregaços para detecção de micobactérias é feito manualmente de acordo com o procedimento.

I. Coloração de Kinyoun a frio

Esta coloração é uma coloração modificada de Ziehl-Neelsen. Com uma pipeta de *pasteur* estéril deposita-se uma gota da amostra na lâmina de vidro, previamente identificada com a identificação do doente e o tipo de amostra. Deixa-se a lâmina secar para, de seguida, ser fixada à chama e corada pela técnica de *Kinyoun a frio*.

O *kit* de coloração de *Kinyoun a frio* contém o reagente *Carbolfuchsin* com fucsina fenicada, uma solução descolorante (álcool-ácido) e uma solução de verde brilhante como corante de contraste.

Como procedimento normal para a pesquisa de micobactéria, cora-se uma lâmina por *Kinyoun a frio* diretamente da amostra, antes da descontaminação.

Na lâmina por *Kinyoun a frio* aparecem formas cocobacilares, finos e alongados, isoladas ou em pequenos aglomerados irregulares, em tons de vermelho ou rosa parecendo filamentos. Deve ser feita a contagem de todas as formas cocobacilares que se assemelham as estas características. Por outro lado, nas lâminas coradas por Auramina pretende-se encontrar as mesmas formas cocobacilares em tons de amarelo-esverdeado fluorescente.

II. Coloração de Auramina

A microscopia de fluorescência oferece inúmeras vantagens em relação à microscopia ótica na deteção de micobactérias, pois sendo um método mais sensível, a observação da lâmina torna-se mais rápida e mais simplificada. Os corantes fluorescentes emitem radiação visível quando estimulados por menores comprimentos de onda de luz ultravioleta.

Prepara-se uma lâmina de vidro com amostra fixada e cora-se de acordo com o procedimento para coloração de Auramina. O *kit* de coloração de Auramina disponível contém o reagente com Auramina, uma solução descolorante (álcool-ácido) e uma solução de permanganato de potássio como corante de contraste para suprimir fundos fluorescentes não específicos.

Como procedimento normal, cora-se uma lâmina por Auramina após descontaminação. Caso seja positiva, faz-se uma contra-coloração, na mesma lâmina, por *Kinyoun* a frio para confirmação.

É importante ter em consideração que um exame direto positivo apenas oferece evidências presuntivas da presença de micobactérias na amostra. Da mesma forma que um exame direto negativo não significa necessariamente que o exame cultural será negativo para micobactérias.

3.5.3. Exame Cultural

O processo envolvido no exame cultural implica a inoculação de meios de cultura diferentes, um meio sólido (Lowenstein-Jensen [LJ-T] e/ou Coletsos) e um meio líquido (MGIT), de forma a otimizar o isolamento de micobactérias nas culturas. A combinação ideal de meios deve favorecer o crescimento rápido e abundante das micobactérias, permitindo o estudo da morfologia das colónias e da pigmentação, inibindo simultaneamente o crescimento de contaminantes e ser económico.⁽³¹⁾

Após descontaminação das amostras que o requerem, são todas semeadas em LJ-T e MGIT previamente preparado. São exceções o LCR que é semeado em Coletsos e o sangue em três frascos BACTEC Myco/F Lytic.

Os meios sólidos depois de inoculados e antes da incubação repousam deitados durante 48 a 72h de forma a amostra impregnar no meio. Para ver se há crescimento são feitas leituras semanais para os meios sólidos, enquanto nos meios líquidos o aparelho notifica quando há positividade.

Como características culturais, o *Mycobacterium* spp. é um aeróbio estrito, muito exigente em nutrientes e devido à sua parede com superfície hidrofóbica que dificulta a entrada de nutrientes é de crescimento lento. Produzem colónias rugosas que podem ser ou não pigmentadas, podendo o seu tamanho variar de espécie para espécie.⁽³¹⁾

3.5.4. Identificação e Antibiógrama de Micobactérias

Na suspeita de uma amostra positiva com crescimento de micobactérias nos meios de cultura é necessário fazer a identificação e o antibiógrama da micobactéria. O serviço de patologia clínica do Hospital de Viana do Castelo ainda não disponibiliza estes serviços, de modo que são pedidos ao exterior, nomeadamente à Unianálises, enviando o meio de cultura sólido LJ-T ou MGIT.

3.6. CONTROLO DE QUALIDADE

O CQI é executado semanalmente a partir de 4 a 5 amostras com estirpes conhecidas, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. pneumoniae*. Para o CQE o laboratório de microbiologia participa no esquema de avaliação internacional de qualidade UK NEQAS. Este é processado mensalmente para bacteriologia geral e susceptibilidade, de dois em dois meses para parasitologia (sangue, fezes e urina) e micobacteriologia é bianual. No controlo de bacteriologia, normalmente, a entidade envia duas amostras para avaliação de susceptibilidade e três amostras que simulam produtos biológicos que, após hidratados com caldo de enriquecimento BHI como indicado, processados conforme indicação clínica fornecida pelo UK NEQAS.

4. IMUNOQUÍMICA

O laboratório de Imunoquímica reúne a Química Clínica e a Imunologia num só laboratório. Chegam essencialmente amostras de soro em tubos de gel, urinas e fezes. Este sector encontra-se dividido em duas salas: a sala das urinas, fezes e técnicas de serologia manual; a sala dos autoanalisadores de imunoquímica, endocrinologia, alergologia, eletroforese capilar e autoimunidade. Na tabela 23 estão listados todos os aparelhos disponíveis na Imunoquímica.

Tabela 23 - Equipamentos disponíveis na secção de Imunoquímica.

Equipamento	Funcionalidade
Sistema Integrado <i>Architect Ci8200 #1 e #2 Abbott Diagnostics</i>	Parâmetros da química geral, marcadores tumorais e cardíacos, marcadores víricos, entre outros.
<i>Architect System i2000 Abbott Diagnostics</i>	Serologia infecciosa e endocrinologia, assim como vitamina D, anti-TPO, anti-TG.
Analizador <i>Cobas e411 Roche Diagnostics</i>	Diagnóstico pré-natal e função tiroideia: tiroglobulina e Anti-Tg
<i>ImmunoCAP™ 250 Phadia</i>	Alergologia – Ig E total e Ig E específicos para rastreio de autoimunidade.
<i>Mago Plus DiaMedix Corporation</i>	Autoimunidade em lâminas, ELISA
<i>MINICAP Sebia</i>	Eletroforese capilar das proteínas do soro
<i>Genesis FE500 TECAN</i>	Centrifugação e triagem das amostras de imunoquímica.
Analizador <i>UF-1000i Sysmex</i>	Analizador de urina tipo II
<i>URISYS 2400 Roche Diagnostics</i>	Analizador de partículas de urina

A Imunoquímica é constituída por três TSS e cinco TACSP estando estes distribuídos pelas diferentes secções no laboratório de Imunoquímica; química geral, imunologia, urianálise, eletroforese, alergologia e triagem. Os TSS têm a função de organizar e coordenar a secção, assim como tomar notas das ocorrências ao longo do dia. Avaliam os resultados do controlo de qualidade e, sempre que necessário, entram em contato com os vários representantes dos sistemas utilizados no laboratório. Validam os vários resultados obtidos ao longo do dia e auxiliam os TACSP. Relativamente aos TACSP, estes têm como responsabilidades a receção das amostras após registo no sistema e proceder à triagem das mesmas. Encaminham as amostras para as diferentes secções e sistemas automáticos. Procedem à manutenção dos aparelhos e executam os respetivas calibrações e CQI. Têm também como função assegurar a execução analítica das amostras mediante as listas de trabalho, assim como, verificar as faltas no final do dia ou turno, para garantir que todos os testes integrados no sistema

para o dia foram processados. Asseguram que as amostras são acondicionadas e conservadas de forma adequada.

Durante o tempo na secção, foi possível integrar na rotina manuseando os diferentes equipamentos, tanto no processamento das amostras como na sua manutenção, sempre devidamente supervisionada.

4.1. COLHEITA DE AMOSTRAS

As amostras destinadas para a Imunoquímica são colhidas segundo o Manual de Colheitas. A maioria das amostras para a Imunoquímica são colhidas em tubos secos, sem coagulante, da *SARSTEDT*. Os tubos contêm grânulos com gel de éster poliacrílico que, devido à sua densidade, durante a centrifugação, forma uma camada separadora estável entre o coágulo de sangue e o soro. Esta separação estável com o gel serve como uma barreira durante o transporte e armazenamento de amostras.

Algumas amostras ou parâmetros necessitam de ser colhidos em tubos diferentes. No LCR, o primeiro tubo estéril dos três colhidos é usado para os testes bioquímicos e serológicos. No caso particular do parâmetro bioquímico péptido natriurético cerebral (BNP) a amostra de sangue é colhido em tubos de EDTA K3.

Amostras de urina e fezes destinadas para as Urianálises, são essencialmente colhidas em recipientes estéreis ou, no caso da urina, podem ser colhidas em tubos *Urine Monovette*[®] sem estabilizador, da *SARSTEDT*.

4.2. TRIAGEM DE AMOSTRAS

Na zona da triagem, após registo das amostras, todos os tubos são triados e centrifugados. Nas horas de maior serviço, todos os tubos para a imunoquímica são triados automaticamente no *Genesis FE500 TECAN*, com exceção das amostras vindas dos cuidados intensivos e intermédios, hospital de dia, unidade polivalente, tubos de EDTA K3, pediátricos ou amostras de urina/fezes e LCR.

O aparelho *Genesis FE500 TECAN* baseia-se num conceito modular em que cada uma das principais funções é realizada por um módulo separado do instrumento.

Constitui um transportador onde os tubos percorrem o aparelho em *racks*. Este percurso consiste no reconhecimento dos tubos e da lista de trabalho associado a cada tubo, na centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, a 25° C e separação para tubos secundários, quando necessário.

De forma a acelerar todo o processo de triagem, para os tubos vindos dos cuidados intensivos, Hospital Dia ou tubos pediátricos, a triagem é feita manualmente. Centrifugam-se os tubos a 4000 rpm durante 10 minutos. De seguida, procede-se à leitura do código de barras no sistema informático *Clinidata* e emite-se as etiquetas para as diferentes separações, se necessário.

Após centrifugação e separação, as amostras são encaminhadas para as respetivas secções para serem processadas ou, caso não exista um número suficiente de amostras ou colaboradores disponíveis para processamento, são refrigeradas ou congeladas.

4.3. QUÍMICA CLÍNICA

Na secção da bioquímica estudam-se os parâmetros bioquímicos que esclarecem o estado funcional dos vários órgãos e vias metabólicas. Todos os tubos que requerem análise na química clínica são levados para o sistema integrado *Architect Ci8200* da *Abbott Diagnostics* (Figura 21), um autoanalisador completamente automático, ligado bidireccionalmente com o sistema informático do laboratório.



Figura 21 - Sistema integrado *Architect Ci8200* da *Abbott Diagnostics*.

Architect Ci8200 consiste em dois módulos de processamentos, *C8000TM* e *i2000TM*. O primeiro utiliza métodos potenciométricos e fotométricos, enquanto o segundo, com capacidade de processamento prioritário, efetua o processamento de amostras utilizando o método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA).

4.3.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento

Os princípios de funcionamento da tecnologia fotométrica, potenciométrica ou de CMIA consistem na detecção e medição de analitos, sequências de reação, de temporização e de outras características especiais.

Fotometria

A fotometria mede a absorvância das amostras para a quantificação da concentração de analitos. O sistema ótico do módulo de processamento é constituído por um fotómetro direto que utiliza uma grelha de difração côncava com capacidade para efetuar medições em 16 comprimentos de onda diferentes.

A unidade ótica foca a luz de uma lâmpada de halogénio e tungsténio. Durante a progressão da reação química entre o reagente e a amostra, a absorvância da solução modifica-se. A luz dispersa-se nos comprimentos de onda, através de uma ranhura de entrada para a grelha de difração. Uma série de fotodíodos lineares mede a intensidade da luz em 16 comprimentos de onda diferentes.

O sistema lê medições monocromáticas ou dicromáticas em cada ponto de leitura. Dado que a maioria dos ensaios são dicromáticos, subtrai-se a leitura retirada do comprimento de onda secundário, da leitura obtida no comprimento de onda primário e utiliza-se a diferença como valores de absorvância. As leituras de absorvância são corrigidas a branco, tal como especificadas para cada teste, sendo posteriormente convertidas para unidades de concentração.

Potenciometria

A potenciometria mede o potencial elétrico numa dada amostra. O módulo de processamento *C8000™* utiliza um módulo com tecnologia de *chip* integrado (ICT) para medir ensaios potenciométricos, ou seja, eletrólitos. Este módulo é utilizado para medir em simultâneo iões sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-).

A metodologia ICT utiliza eletrodos seletivos de iões em estado sólido que se encontram num único *chip*, reduzindo a manutenção necessária para as medições de eletrólitos. A unidade ICT, que inclui a pipeta ICT e o módulo ICT, é o principal componente de *hardware* envolvido na medição de sódio, potássio e cloro.

Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência

O módulo de processamento de *i2000™* utiliza o método de CMIA para determinar a presença de antígenos, anticorpos e analitos em amostras. Os reagentes necessários para os ensaios CMIA incluem, micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura, por exemplo, um antígeno, anticorpo ou partícula viral, específicas para a medição de analito; um conjugado marcado com acridínio e soluções pré-ativadora e ativadora (Figura 22). A luz quimioluminescente produzida durante a reação é direta ou indiretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra, dependendo do tipo de ensaio.

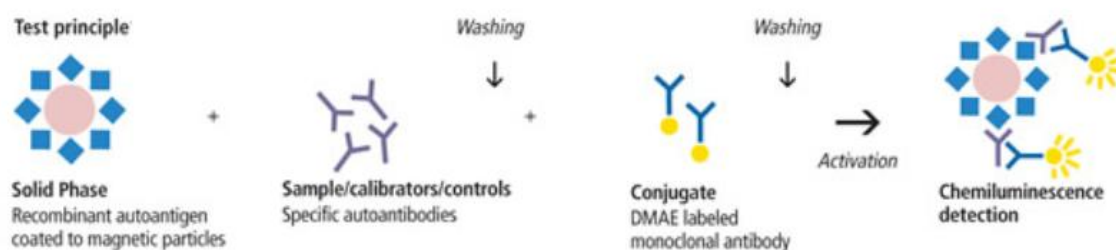


Figura 22 Esquema explicativo do princípio de detecção do método de CMIA para determinar a presença de antígenos, anticorpos e analitos em amostras.

Na primeira incubação os anticorpos presentes na amostra, nos controlos ou nos calibradores ligam-se ao antígeno imobilizado e na segunda incubação o conjugado marcado com acridínio quimioluminescente reage com o complexo das micropartículas

paramagnéticas/anticorpo. Todo o material não combinado é lavado após cada passo de incubação. A quimioluminescência é ativada pela adição da solução pré-ativadora de H_2O_2 e ativadora de hidróxido de sódio (NaOH) resultando na oxidação do éster de acridina para um estado excitado. O retorno a um estado normal resulta na emissão de luz, que é medida e expressa em unidades de luz relativa (RLU). O sinal é diretamente proporcional à concentração dos anticorpos específicos presentes nas amostras, calibradores e controles.

4.3.2. Processamento de Amostras

Antes de iniciar o processamento de qualquer amostra é importante que o TACSP ou TSS confirme se existem reagentes e consumíveis suficientes, se todas as calibrações estão atualizadas e se foram processados os controles do dia.

Estão disponíveis dois aparelhos: o *Architect Ci8200 #1* está destinado essencialmente para a análise de parâmetros da química clínica, marcadores tumorais e imunoglobulina E (Ig E); e o *Architect Ci8200 #2* está destinado, além da química clínica, essencialmente para a análise de parâmetros do metabolismo da hemoglobina como ferro, ferritina, transferrina, os antígenos víricos e imunoglobulinas G (Ig G) e M (Ig M). As amostras que podem ser processadas nestes aparelhos são soro, plasma, LCR, líquido pleural, ascítico, pericárdio, sinovial e urina.

Na tabela 24 estão listados todos os parâmetros, assim como a metodologia associada a cada parâmetro, efetuados pelos aparelhos *Architect Ci8200 #1* e *#2*.

Tabela 24 - Parâmetros e respectivas metodologias processados nos aparelhos de química clínica *Architect Ci8200 #1* e *#2* da *Abbott Diagnostics*.

Parâmetros		Metodologia
Bioquímica Geral		
Ácido úrico	Creatinina urinária	Fotométrico
Ácido úrico urinário	Desidrogenase láctica	
Adenosinodeaminase	Enzima conversora da angiotensina	
Alanina aminotransferase	Etanol	
Albumina	Ferro	
Aldolase	Fosfatase alcalina	
Amilase	Fósforo	
Amilase urinária	Frutosamina	

Tabela 24 (Continuação)

Parâmetros		Metodologia
Amônia	Gamaglutamil transferase	Fotométrico
Aspartato aminotransferase	Glucose	
Bilirrubina direta	Glucose urinária	
Bilirrubina total	Lipase	
Cálcio	Lítio	
Cálcio urinário	Magnésio	
Colesterol HDL	Magnésio urinário	
Colesterol LDL	Proteínas Totais	
Colesterol total	Proteínas – urina e LCR	
Colinesterase	Triglicerídeos	
Creatinafosfoquinase	Ureia	
Creatinina	Ureia urinária	
α1-antitripsina	Haptoglobina	Imunoturbidimétrico
Apolipoproteína A	Ig A	
Apolipoproteína B	Ig E	
Cadeias kappa	Ig G	
Cadeias lambda	Ig M	
Ceruloplasmina	Microalbumina	
CH50	Proteína C reativa	
Complemento C3	Transferrina	
Complemento C4		
Na ⁺	K ⁺ urinário	Potenciométrico
Na ⁺ urinário	Cl ⁻	
K ⁺	Cl ⁻ urinário	
α-fetoproteína	Fator reumatoide	CMIA
β-hCG	Sífilis	
Anti-estreptolisina	Vitamina D	
Função Tiroideia		
T3 livre	T4 total	CMIA
T3 total	TSH	
T4 livre		
Marcadores Cardíacos		
BNP	Mioglobina	CMIA
CK-MB	Troponina I	
Marcadores Tumorais		
α-fetoproteína	CA 125	CMIA
β-hCG	CEA	
CA 15.3	PSA livre	
CA 19.9	PSA total	
Monitorização de Fármacos		
Acetaminofeno	Gentamicina	CMIA
Carbamazepina	Teofilina	
Digoxina	Valproato	
Fenitoina	Vancomicina	
Fenobarbital		
Parâmetros Metabólicos		
Ácido fólico	PTH	CMIA
Ferritina	Vitamina B12	

Terminada a lista de trabalho de cada amostra, os resultados são enviados automaticamente para o sistema informático do laboratório, as amostras são devidamente guardadas e inseridas no sistema de organização automático *INDEXOR Systems* da *maksENSE* para, posteriormente, serem refrigeradas.

4.3.3. Interesse Clínico

Nas tabelas 25-31 estão listadas alguns parâmetros estudados na secção de química geral, desde bioquímica geral, enzimas, eletrólitos e iões, metabolismo do ferro e ósseo, marcadores cardíacos e tumorais, até fármacos na monitorização terapêutica. Estes parâmetros permitem avaliar o risco cardiovascular, a função hepática e renal.

Tabela 25 - Considerações clínicas de alguns parâmetros de bioquímica geral.

Bioquímica Geral	Considerações Clínicas
Glucose	Principal fonte de energia regulada pela insulina, cortisol e glicogénio. ↑ - Diabetes ↓ - Disfunção hepática ou hormonal, fome
Colesterol Total	Componente importante das membranas celulares e lipoproteínas, assim como na síntese de esteroides. ↑ - Fatores hereditários, dieta, diabetes, hipotireoidismo, insuficiência renal.
Colesterol HDL	Tem como função remover o colesterol dos tecidos e facilita a sua eliminação. ↓ - Dieta, tabaco, diabetes
Colesterol LDL	Transporta o colesterol do fígado para os tecidos. Esta forma de colesterol contribui para a formação das placas ateroscleróticas. ↑ - Dieta, fatores hereditários
Triglicerídeos	Forma de transporte e armazenamento dos ácidos gordos no tecido adiposo. ↑ - Dieta, alcoolismo, diabetes, hipotireoidismo ↓ - Desnutrição, má absorção de nutrientes
Bilirrubina total	Produto da destruição da hemoglobina, excretado pelo fígado. ↑ - Hepatite, cirrose, anemia hemolítica
Bilirrubina direta ou conjugada	Produto hidrossolúvel que é metabolizado no intestino a estercobilinogénio. ↑ - Obstrução dos ductos biliares
Ácido úrico	Produto da degradação das purinas. ↑ - Doenças renais, gota
Creatinina	Produto da degradação da creatina no músculo. ↑ - Disfunção renal por toxicidade de fármacos ou diabetes, insuficiência renal.

Tabela 25 (Continuação)

Bioquímica Geral	Considerações Clínicas
Ureia	Produto da degradação de proteínas. ↑ - Dieta rica em proteínas, disfunção renal ↓ - Dieta pobre em proteínas, doença hepática
Proteínas totais	Proteínas na corrente sanguínea como, por exemplo, proteínas séricas, de transporte, da coagulação, do sistema imunitário e enzimas. ↑ - Desidratação ↑ (urina) – Insuficiência renal
Albumina	Proteína mais abundante no soro. Transporta uma variedade de moléculas (bilirrubina, enzimas, hormonas, lípidos, iões metálicos e drogas). ↑ - Desidratação ↓ - Doença hepática ou renal, queimaduras
Proteína C Reativa	Proteína de fase aguda. ↑ - Inflamação ou infeção

Tabela 26 - Considerações clínicas de algumas enzimas.

Enzimas	Considerações Clínicas
Amilase	Enzima responsável pela hidrólise da ligação 1,4- α -glicosídica nos polissacarídeos, produzida pelo pâncreas e glândulas salivares. ↑ - Pancreatite aguda ou crónica (recidiva), colecistite, litíase ou após canulação do trato biliar, inflamação das glândulas salivares.
Alanina aminotransferase	Catalisa a interconversão de aminoácidos pela transferência de um grupo amino. É encontrada predominantemente no fígado. ↑ - Hepatite, cirrose, cancro hepático
Aspartato aminotransferase	Catalisa a interconversão de aminoácidos pela transferência de um grupo amino. É encontrada em vários órgãos e tecidos, como fígado, coração e músculo esquelético. ↑ - Hepatite, cirrose, cancro hepático, enfarte do miocárdio ou distrofias musculares
Fosfatase alcalina	Está associada a membranas e superfícies celulares da mucosa do intestino, no rim, ossos, fígado e placenta. ↑ - Obstrução dos ductos biliares, cancro hepático, doenças ósseas associadas ao aumento da atividade dos osteoblastos, doença de <i>Paget</i> , na gravidez.
Creatinafosfoquinase	Catalisa a fosforilação reversível da creatina por ATP. Tem maior atividade no músculo. ↑ - Distrofia muscular, danos no miocárdio.
Gamaglutamil transferase	Catalisa a transferência de aminoácidos de um péptido para outro. Existe em todas as células do organismo, exceto nos músculos. ↑ - Obstrução dos ductos biliares, hepatite infecciosa, fígado gordo, cirrose alcoólica
Desidrogenase láctica	Está distribuída por todos os tecidos e serve como indicador de dano tecidual. ↑ - Enfarte do miocárdio, doenças hepáticas e pulmonares

Tabela 27 - Considerações clínicas de alguns eletrólitos e iões.

Eletrólitos/Iões	Considerações Clínicas
Sódio	Principal catião extracelular responsável por manter a distribuição normal de água e pressão osmótica no compartimento de fluido extracelular. Os níveis no sangue são controlados pela excreção e reabsorção nos rins. ↑ - Desidratação, diabetes, diuréticos. ↓ - Consumo excessivo de água, insuficiência renal, cirrose hepática, doença de <i>Addison</i> .
Potássio	Principal catião intracelular responsável pela contração muscular e manter o batimento cardíaco normal. ↑ - Insuficiência renal, doença de <i>Addison</i> , ↓ - Vômitos, diarreia, diuréticos, síndrome de <i>Cushing</i> , disfunção renal.
Cloreto	Principal anião extracelular, com funções semelhantes ao sódio. Contribui para regular e manter o equilíbrio da distribuição do fluido extracelular. ↑ - Desidratação, insuficiência renal ↓ - Dieta, vômitos prolongados, diarreia, disfunção renal
Cálcio	Necessário na formação do osso e na coagulação do sangue, com um papel importante na função nervosa e muscular. ↑ - Hiperparatireoidismo, cancro, doença de <i>Paget</i> , imobilização ↓ - Hipoparatiroidismo, carência de vitamina D, carência de albumina, lesão renal, pancreatite, má absorção, má nutrição.
Magnésio	Uma ampla variedade de enzimas do corpo dependem do magnésio para funcionar eficazmente. A maior parte do magnésio presente no corpo encontra-se nos ossos; há muito pouca quantidade no sangue. ↑ - Insuficiência renal ↓ - Má absorção, alcoolismo, diarreia prolongada, diuréticos.
Fosfato	Os ossos contêm a maior parte do fosfato do corpo. O resto encontra-se principalmente no interior das células, onde está intimamente implicado no metabolismo energético. ↑ - Insuficiência renal ↓ - Hiperparatireoidismo, hipotireoidismo, diuréticos, desnutrição grave, cetoacidose diabética
Ferro	É um componente da hemoglobina, a qual permite aos eritrócitos transportar o oxigénio e distribuí-lo pelos tecidos do corpo. ↑ - Transfusões, hemocromatose ↓ - Dieta, hemorragia

Tabela 28 - Alguns parâmetros do metabolismo do ferro, estudo de anemias não-ferropénicas e ósseo, assim como respetivas considerações clínicas.

Metabolismo	Descrição
Ácido fólico	Nutriente essencial na hematopoiese e no desenvolvimento fetal. ↓ - Deficiência de vitamina B12, anemia megaloblástica, má nutrição ou absorção.
Ferritina	Proteína de armazenamento do ferro, como reserva para a eritropoiese e com função protetora contra o efeito tóxico do excesso de ferro. ↑ - Excesso de ferro, inflamação e transfusões de sangue; ↓ - Deficiência em ferro (anemia ferropénica).
Vitamina B12	Nutriente essencial na hematopoiese. ↑ - Doença hepática, mieloproliferativa, ou suplemento multivitamínico; ↓ - Má nutrição ou absorção, deficiência do fator intrínseco (anemia megaloblástica ou perniciosa)
PTH	Atua na concentração do cálcio no sangue. Este estimula a reabsorção óssea pela ativação dos osteoblastos que, por sua vez, libertam citocinas que promovem a diferenciação de precursores de osteoblastos em osteoclastos.

Tabela 29 - Marcadores cardíacos e respetivas considerações clínicas.

Marcadores Cardíacos	Descrição
BNP	Ajuda a diagnosticar, avaliar e prognosticar a insuficiência cardíaca, assim como controlar o tratamento.
CK-MB	Ajuda na deteção de re-enfarte precoce. No entanto, tem baixa sensibilidade no enfarte de miocárdio muito recente (< 6h após o início dos sintomas) ou tardiamente após o início dos sintomas (> 36h) e para lesões mínimas do miocárdio (detetáveis com as troponinas).
Mioglobina	Ajuda na deteção precoce de enfarte do miocárdio. No entanto, tem uma especificidade muito baixa no contexto de lesão ou doença do músculo esquelético. A mioglobina normaliza rapidamente, o que limita a sua sensibilidade nas apresentações tardias.
Troponina I	Permite uma melhor estratificação de risco e tem uma maior sensibilidade e especificidade que o CK-MB. Tem a capacidade de detetar um enfarte recente nas últimas duas semanas. No entanto, a troponina tem baixa sensibilidade nas primeiras 6h após o enfarte, assim como baixa capacidade de deteção de pequenos re-enfartes numa fase tardia.

Os marcadores tumorais são proteínas produzidas e libertadas por células neoplásicas de determinados tipos de tumores (Tabela 30). Com o auxílio de outros exames e parâmetros, estas substâncias permitem ajudar no diagnóstico do tumor, assim como monitorizar a terapia e o desenvolvimento de determinados tipos de tumores.

Tabela 30 - Marcadores tumorais e respetivos cancros onde os marcadores podem estar presentes.

Marcadores Tumorais	Principais Aplicações
α -fetoproteína	Fígado, ovário, testículo
β -hCG	Placenta, ovário, testículo
CA 15.3	Mama, ovário
CA 19.9	Pâncreas, cólon, trato digestivo
CA 125	Ovário, endotélio
CEA	Mama, pulmão, colorretal, trato gastrointestinal
PSA	Próstata

A monitorização de fármacos (Tabela 31), principalmente os que têm uma janela muito estreita, é importante para o controlo do tratamento de determinadas doenças de modo a evitar problemas de toxicidade renal e/ou hepático. Deste modo o clínico tem a possibilidade de seguir o tratamento e alterá-lo de acordo com as necessidades dos seus pacientes.

Tabela 31 - Ação dos fármacos avaliados na monitorização terapêutica.

Fármacos	Ação
Acetaminofeno	Analgésico
Carbamazepina	Controlo de convulsões
Digoxina	Tratamento de fibrilação auricular crónica e insuficiência cardíaca
Fenitoina	Tratamento de arritmias ventriculares e convulsões
Fenobarbital	Sedativo e tratamento de epilepsia
Gentamicina	Antibiótico
Teofilina	Antiasmático
Valproato	Tratamento de convulsões
Vancomicina	Antibiótico para infeções resistentes

4.4. ENDOCRINOLOGIA E SEROLOGIA INFECIOSA

Para estudos endocrinológicos e de serologia infecciosa, pode ser necessário fazer separação de alíquotas na triagem, nomeadamente para os anticorpos da função tiroideia, parâmetros de fertilidade e gravidez e serologia infecciosa. Os aparelhos utilizados são, essencialmente, o *Architect i2000* da *Abbott Diagnostics* e *COBAS e411* da *Roche Diagnostics*. Na tabela 32 estão listados os parâmetros da química endocrinológica e serologia infecciosa, assim como os aparelhos onde são processados.

Tabela 32 - Parâmetros da função tiroideia, fertilidade e gravidez, DPN e serologia infecciosa analisados por CMIA no *Architect i2000* e *Ci8200* da *Abbott Diagnostics*, e por EQL no *COBAS e411* da *Roche Diagnostics*.

Parâmetros		Equipamento/Metodologia
Função Tiroideia		
T3 livre	T4 total	Architect Ci8200 - CMIA
T3 total	TSH	
T4 livre		
Anti-TPO		Architect i2000 - CMIA
Anti-Tg		COBAS e411- EQL
Fertilidade e Gravidez		
DHEA-S	Progesterona	Architect i2000 - CMIA
Estradiol	Prolactina	
Hormona foliculoestimulante (FSH)	SHBG	
Hormona luteinizante (LH)	Testosterona total	
Diagnóstico Pré-natal		
β-hCG livre	PAPP-A	COBAS e411- EQL
β-hCG	AFP	Architect Ci8200 - CMIA
Serologia Infeciosa		
Anti-HBc	Anti-HIV 1 e 2	Architect Ci8200 - CMIA
Anti-HBs	Anti-HTLV 1 e 2	
Anti-HCV		
Anti-CMV (Ig G/Ig M)	Anti-rubéola (Ig G/IgM)	Architect i2000 - CMIA
Anti-HAV (Ig G/Ig M)	Anti-toxoplasma (Ig G/Ig M)	
Anti-HBc Ig M	Ag HBe	
Anti-HBe	Ag HBs	

Após processamento e validação dos parâmetros, as amostras são congeladas e guardadas na seroteca, devidamente inseridas no sistema de organização automático *INDEXOR Systems* da *maksENSE*, por tempo indeterminado, até os suportes serem substituídos por amostras mais recentes.

4.4.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento

I. Architect i2000 Abbott Diagnostics

Architect i2000 tem um módulo de processamento *i2000TM* que efetua o processamento de amostras utilizando o método CMIA. Neste aparelho são efetuados essencialmente parâmetros endocrinológicos, parâmetros de doenças congénitas/infeciosas.

II. Analisador COBAS e411

Amostras que requerem diagnóstico pré-natal (DPN), assim como uma confirmação de um diagnóstico de doença da tiroide, são processados pelo analisador *COBAS e411* da *Roche Diagnostics*. Este é um sistema completamente automatizado, concebido para determinações quantitativas e qualitativas *in vitro* recorrendo à tecnologia de eletroquimioluminescência (EQL).

A tecnologia de EQL consiste na produção de luminescência a partir de reações eletroquímicas em soluções. Os intermediários gerados electroquimicamente sofrem uma reação exergónica originando um estado electroquimicamente excitado, devido à transferência de eletrões energéticos, que emite luz. Na EQL, a emissão de luz é observada durante a aplicação de potencial nos elétrodos da célula eletroquímica que contêm determinada solução de espécies luminescentes em solvente orgânico que não pode doar ligações de hidrogénio.

4.4.2. Interesse Clínico

I. Função Tiroideia

O estudo da função tiroideia permite o diagnóstico e/ou confirmação de doença da tiroide (tabela 33).

Tabela 33 - Possíveis doenças da função tiroideia diagnosticada com o auxílio dos parâmetros da função tiroideia.

	T3	T4	ft4	TSH	Anti-TPO	Anti-Tg
Hipotireoidismo	↓	↓	↓	↑	-	-
Hipertireoidismo	↑	↑	↑	↓	-	-
Doença de Graves	↑	↑	↑	↓	+	+
Tiroidite de Hashimoto	↓	↓	↓	↑	+	+

Na função tiroideia, o imunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* da anti-Tg e Tg é essencialmente utilizado na confirmação de um diagnóstico de doença da tiroide. A frequência de anticorpos anti-Tg é de aproximadamente 70%-80% nos indivíduos com tiroidite autoimune, incluindo doença de *Hashimoto*, e aproximadamente 30% em indivíduos com doença de *Graves*.

Mesmo não sofrendo nenhuma doença da tiroide, é possível detetar pequenas quantidades de tiroglobulina no sangue, indicando a presença de tecido da tiroide. Após tirectomia total bem sucedida a tiroglobulina deixa de ser detetável. A determinação de tiroglobulina pode ser utilizada para distinguir entre a ausência total da glândula da tiroide e a hipoplasia da tiroide nos casos de hipotireoidismo congénito ou outros estados patológicos. Por outro lado, a presença de lesões na parede dos folículos pode resultar na passagem de maiores quantidades de tiroglobulina para o sangue, podendo ser encarada especificamente como um marcador da integridade morfológica da glândula.

II. Diagnóstico Pré-Natal

Os parâmetros analisados no *Cobas e411* são essencialmente parâmetros de diagnóstico pré-natal (DPN), como a β -hCG livre e proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) (ANEXO 23). Em combinação com PAPP-A e dados ecográficos, estes são marcadores de eleição para identificar mulheres que correm o risco de serem portadores de um feto afetado por Síndrome de *Down* durante o primeiro trimestre (semana 11-14) de gravidez.

A concentração de β -hCG aumenta exponencialmente no primeiro trimestre de gravidez, atingindo o valor de pico aproximadamente às 10 semanas de gestação. Subsequentemente, o nível de hormona diminui entre as 10-16 semanas de gestação, para cerca de um quinto da concentração do pico, mantendo-se neste nível até ao termo da gravidez. O soro das grávidas contém principalmente hCG intata, circulando apenas frações diminutas de subunidades α e β sob a forma livre. A concentração de β -hCG livre no soro é um marcador sérico fiável de aneuploidia fetal. Quanto à PAPP-A, a sua concentração aumenta de forma constante até ser atingido o termo da gravidez.

III. Serologia Infeciosa

A serologia infecciosa consiste no doseamento de uma variedade de anticorpos contra agentes infecciosos. Na maioria dos casos, os doseamentos do citomegalovírus (CMV), rubéola e toxoplasma são realizados em grávidas. Regra geral, numa primeira infeção, o primeiro anticorpo a aparecer é o Ig M (Figura 23). Este atinge o título máximo em poucas semanas após o início dos sintomas, diminuindo se seguida para valores normais. O Ig G começa a aparecer pouco depois da deteção do Ig M, atingindo um título máximo superior ao título de Ig M. O Ig G persiste em circulação durante mais tempo que o Ig M podendo ser durante semanas, meses, anos ou, até mesmo, durante toda a vida.

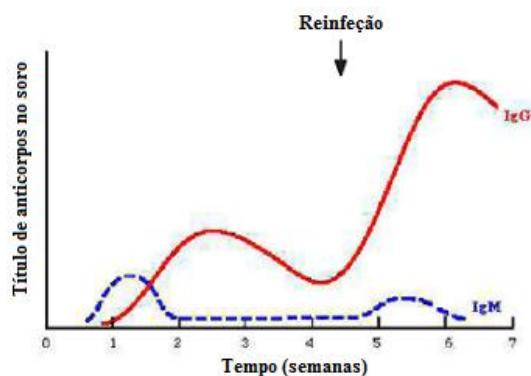


Figura 23 - Evolução dos anticorpos Ig M e Ig G, ao longo do tempo, de uma primo-infeção e reinfeção do vírus da rubéola.

Num segundo contato com o agente infeccioso haverá uma resposta mais rápida e mais forte dos Ig G. Em geral, a presença de anticorpos Ig G requer a obtenção de um título crescente para diagnosticar uma infeção aguda, caso contrário, não se sabe se a elevação de Ig G se deve a uma infeção recente ou antiga.

Os anticorpos e antigénios das diferentes hepatites, dado serem vários e específicos, devem ser analisados em conjunto. Por outro lado, os marcadores do vírus HIV, perante um resultado positivo, pede-se uma repetição de colheita para confirmação dos resultados por *Immunoblot*. Estes consistem em tiras com linhas impregnadas de antigénios, do HIV tipo 1 e 2, em posições bem definidas. Os resultados positivos são facilmente identificados e a intensidade das bandas está correlacionada com o título de anticorpo.

4.5. IMUNOALERGOLOGIA

Amostras que requerem estudos alérgicos, de Ig E específicos e Ig E total, são separados para uma alíquota (RASTS) na triagem e, assim que se juntarem amostras suficientes, encaminhados para a área do estudo alérgico. Utiliza-se o equipamento totalmente automatizado, *ImmunoCAPTM 250* da *Phadia*, para um diagnóstico *in vitro* de patologias de hipersensibilidade alérgicas, mediadas por Ig E. Os anticorpos aparecem no soro como resultado da sensibilização a um alérgeno específico e a medição dos anticorpos Ig E circulantes proporciona uma avaliação objetiva dessa sensibilização. Regra geral, níveis baixos de anticorpos Ig E indicam uma probabilidade reduzida de doença, enquanto níveis elevados de anticorpo de um antígeno revelam uma forte correlação com uma doença.

Foram concebidos uma variedade de ensaios para alergia e asma que contemplam várias categorias de testes, nomeadamente, pólenes de gramíneas, arbustos, árvores, microrganismos, ácaros, gatos, cães e outros animais com pelo, insetos e seus venenos, alérgenos alimentares, marcadores celulares de asma e inflamação e marcadores de mastócitos e anafilaxia.

4.5.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento

A quantificação de Ig E total e Ig E específica é obtida a partir de um imunoensaio em *sandwich*, onde a respetiva fase sólida assegura a ligação de todos os anticorpos relevantes através de uma capacidade de ligação extremamente elevada. A fase sólida consiste num derivado de celulose fechado numa cápsula. O polímero hidrófilo muito ramificado oferece um microambiente ideal para alérgenos, ligando-se de forma irreversível enquanto mantém a respetiva estrutura nativa.

Na quantificação de Ig E total (Figura 24), o anti-Ig E está acoplado à fase sólida, enquanto na quantificação de Ig específica (Figura 25) é o alérgeno ou a mistura equilibrada de alérgenos inalantes que está acoplado por ligação covalente à fase sólida. Adicionada a amostra, as Ig E a quantificar vão reagir com o elemento fixo na fase sólida (A).

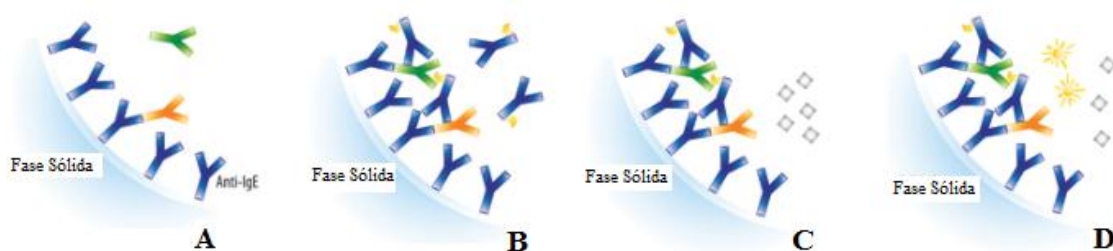


Figura 24 – Esquema de imunoensaio em *sandwich* realizado no ImmunoCAPTM 250 para a quantificação de Ig E total.



Figura 25 – Esquema de imunoensaio em *sandwich* realizado no ImmunoCAPTM 250 para a quantificação de Ig E específica.

Após a lavagem, são adicionados anticorpos marcados por uma enzima contra a Ig E para formarem um complexo (B). Depois da incubação, o anti-Ig E marcado não ligado é lavado e o complexo ligado é incubado com o substrato (C). Após a paragem da reação a fluorescência do eluído é medida (D) sendo esta diretamente proporcional à presença de Ig E específica ou total na amostra.

Sempre que é necessário o desdobramento de alguma das análises, o *software* gera os respetivos pedidos, estando o operador responsável pela aceitação dos mesmos.

4.5.2. Interesse Clínico

Mediante os sintomas (Tabela 34) e valores de Ig E totais elevados, o clínico poderá suspeitar de uma possível alergia.

Tabela 34 - Diferentes sintomas com causas alérgicas e possíveis Ig E específicos.

Sintomas	Ig E Específicos
Gastrointestinais	Leite, ovo, peixe, trigo, amendoim, soja, frutos secos, frutos frescos e vegetais.
Eczema	Leite, ovo, peixe, trigo, amendoim, soja, frutos secos, ácaros, gato e cão.
Rinite	Ácaros, gato, cão, pólen de gramíneas, pólen de árvores, pólen de ervas daninhas, fungos, baratas, leite e ovo.
Sibilância/Asma	Ácaros, gato, cão, fungos, barata, pólen de gramíneas, pólen de árvores, pólen de ervas, leite, ovo, amendoim, peixe, marisco e frutos secos.

De acordo com a idade do doente os testes de rastreio disponíveis variam. Para idades iguais ou inferiores a quatro anos, suspeita-se de uma alergia inalante ou alimentar onde o teste rastreio disponível é o *Phadiotop Infant*, com uma mistura de alergénios inalantes e alimentares ou o *Phadiotop*, com mistura de alergénios inalantes juntamente com *Fx5*, que consiste numa mistura de alergénios alimentares. Para idades superiores a quatro anos o clínico pode suspeitar de uma alergia inalante e utiliza a mistura *Phadiotop* ou de alergia alimentar, onde utiliza misturas *Multi-Rast* para peixe/marisco, carnes, legumes, cereais, frutos, frutos secos ou leite/ovo.

Perante um resultado positivo procede-se aos testes de Ig E específica para os diferentes alergénios presentes na mistura positiva.

4.6. ELETROFORESE

Para a eletroforese de proteínas, usa-se o aparelho *MINICAP* da *Sebia* (Figura 26), um sistema de eletroforese capilar multitarefa e automatizado, que efetua múltiplas separações electroforéticas em simultâneo com elevada resolução, sem ação do utilizador e com grande rapidez.

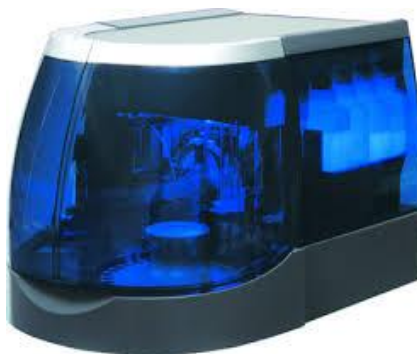


Figura 26 - Aparelho automático para eletroforese capilar, *MINICAP* da *Sebia*.

4.6.1. Métodos Utilizados e Princípio de Funcionamento

Com o método de eletroforese capilar, proteínas séricas são separadas de acordo com a sua mobilidade electroforética com tampão alcalino, com pH específico, em tubos com diâmetro de 100 μm .

O sistema *MINICAP* apresenta dois tubos capilares de sílica que permite duas separações em simultâneo. A amostra é diluída com tampão pH 9,9 e injetada por aspiração no terminal aniónico do capilar. As migrações são inteiramente realizadas com a temperatura constante pelo efeito de *Peltier*. Os capilares são imediatamente lavados com solução de lavagem e preparados para uma próxima separação com tampão. A detecção é feita por um sistema de sensores que é composto por uma lâmpada de deutério, filtros motorizados, fibras óticas de entrada e saída na janela de detecção e captadores discretos. As proteínas são detetadas diretamente e simultaneamente em cada capilar por fotometria de absorção a 200 nm, eliminando a necessidade de coloração e ao mesmo tempo melhorar a precisão e linearidade. Terminada a eletroforese, procede-se à verificação e exportação dos resultados para o sistema informático do laboratório finalizando com a validação no sistema informático do laboratório.

4.6.2. Proteínas Séricas

Por eletroforese capilar obtêm-se seis frações de proteínas com concentrações relativas diferentes: albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β_1 -globulinas, β_2 -globulinas e γ -globulinas (Tabela 35 e Figura 27).

Tabela 35 - Zonas proteicas individuais e respectivas concentrações relativas (percentagem), detetadas por eletroforese capilar a 200 nm, no aparelho *Minicap Sebia*.

Proteínas	Concentrações Relativas (%)
Albumina	55,8 – 66,1
α_1 -globulinas	2,9 – 4,9
α_2 -globulinas	7,1 – 11,8
β_1 -globulinas	4,7 – 7,2
β_2 -globulinas	3,2 – 6,5
γ -globulinas	11,1 – 18,8

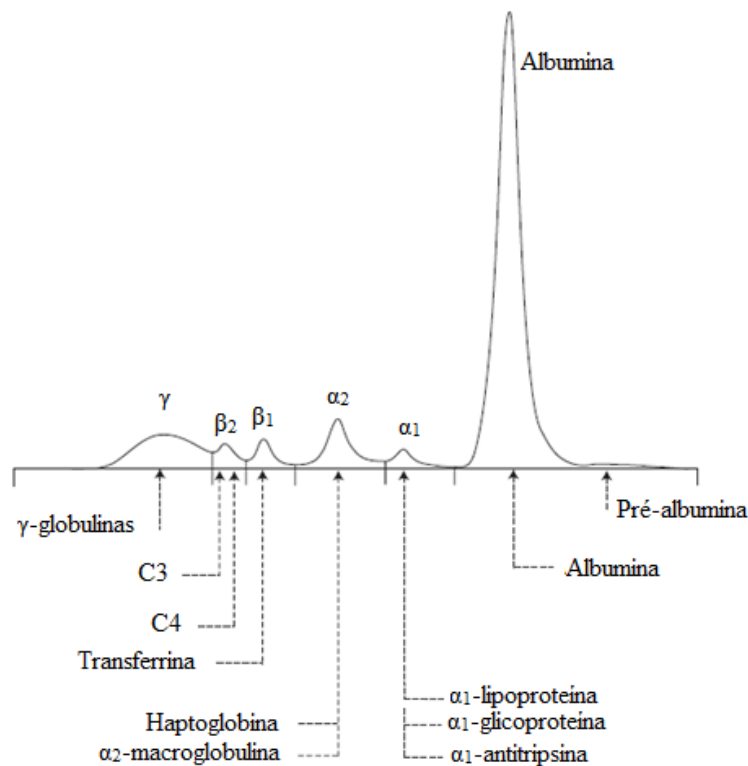


Figura 27 - Electroforegrama normal de proteínas do soro humano usando *MINICAP* da *Sebia*.

Cada fração consiste numa ou mais proteínas que se estão caraterizadas na tabela 36, com as respetivas considerações clínicas.

Tabela 36 Diferentes frações separadas por eletroforese capilar das proteínas do soro e respectivas considerações clínicas⁽³²⁾

Frações	Caraterísticas	Considerações Clínicas
Albumina	- Proteína mais abundante no soro; - Sintetizada no fígado; - Efeito osmótico de proteínas séricas, transporta uma variedade de moléculas endógenas e exógenas, incluindo bilirrubina, enzimas, hormonas, lípidos, iões metálicos e drogas.	↓ – Síntese diminuída de albumina, devido a doença hepática, baixa ingestão proteica ou inflamação aguda; ou perda elevada de albumina devido a lesões renais, perda gastrointestinal ou queimaduras graves. ↑ – Desidratação aguda geralmente, acompanhada pelo aumento de outras proteínas do soro.
α_1-globulinas	α_1-lipoproteínas: forma uma banda ligeira que se estende a partir da zona da albumina para a zona α_1 e é composta por lipoproteínas de alta densidade (HDL). α_1-glicoproteína: apresenta uma banda na extremidade anodal da α_1-antitripsina. α_1-antitripsina: é a principal proteína e forma uma banda discreta na extremidade catódica da região α_1	↓ α_1-lipoproteínas - doença hepática crónica, doença renal e inflamação aguda; ↑ α_1-lipoproteínas - gravidez, no uso de contraceptivo oral ou na suplementação de estrogénio pós-menopausa; ↑ α_1-glicoproteína - aparece durante uma resposta de fase aguda e em pacientes urémicos recorrentes de hemodiálise, associados com um aumento do risco para o enfarte do miocárdio; ↓ α_1-antitripsina - doenças pulmonares, nomeadamente, enfisema pulmonar. ↑ α_1-antitripsina - resposta de fase aguda, tumores, contraceptivos orais ou doença hepática, nomeadamente, cirrose.
α_2-globulinas	α_2-macroglobulina: sintetizado no fígado, geralmente a migração é adjacente a haptoglobina. - Haptoglobina: sintetizada pelo fígado, liga-se a hemoglobina livre, libertada durante a hemólise intravascular, preservando o ferro e prevenindo danos renais.	↓ α_2-macroglobulina - extremamente difícil de detetar usando eletroforese de proteínas séricas. ↑ α_2-macroglobulina - recém-nascidos, idosos, grávidas e como parte do padrão nefrótica em doentes com perda glomerular seletiva. ↓ Haptoglobina – hemólise, eritropoiese ineficaz como consequência da deficiência de vitamina B12 e de folatos anemia. ↑ Haptoglobina - resposta inflamatória aguda e em doentes com estímulo aumentado de corticosteróide e estrogénio como acontece, durante a gravidez, no uso de contraceptivos e neoplasias.
β_1-globulinas	Transferrina: Tem como função o transporte do ferro não-hémico para a medula óssea do trato gastrointestinal e da degradação da hemoglobina.	↓ Transferrina - doenças hepáticas, inflamação aguda, doenças renais e perdas glomerulares e queimaduras; ↑ Transferrina - anemia ferropénica ou grávidas.

Tabela 36 (Continuação)

Frações	Caraterísticas	Considerações Clínicas
β_2-globulinas	- Complemento C3 e C4 essenciais nas vias de ativação do complemento alternativo e/ou clássico; - A posição e a densidade destas bandas podem variar de acordo com diferenças genéticas, doenças inflamatórias ativas, ou amostras mal processadas.	↓ C3 – doença autoimune, glomerulonefrite aguda, sépsia, coagulação intravascular disseminada; ↑ C3 - resposta de fase aguda (tardia); ↓ C4 – deficiência genética; ↑ C4 - reação inflamatória aguda, podendo dar uma pequena deformação da banda C3.
γ-globulinas	- Imunoglobulinas, principalmente classe Ig G que apresenta uma migração relativamente lenta; - A Ig G é a principal imunoglobulina na região γ, responsável pela ampla banda característica desta região, em situações normais; - Ig M, produzida pelos linfócitos B, migra principalmente na região β-γ; - Ig A encontra-se nas superfícies mucosas; é muito difusa para ser visto por eletroforese de proteínas séricas; - Ig E e Ig D estão presentes em quantidades pequenas.	↓ Ig G – imunodeficiência humoral, desordens linfoproliferativas de células B, doença de cadeia leve, mieloma não-secretor, amiloidose associada a cadeias leves. ↑ Ig G - doenças autoimunes, hepáticas e infecciosas, assim como, mieloma múltiplo. ↑ Ig M - doenças infecciosas ↑ Ig A - mieloma de Ig A ou cirrose ↑ Ig E – mieloma de Ig E, condições atópicas ou infecção parasitária ↑ Ig D - Síndrome Hiper-Ig D

4.7. IMUNOLOGIA

Estudos de doenças autoimunes ou de serologia infecciosa são separados para uma alíquota devidamente identificada na triagem sendo processadas assim que houver amostras suficientes. Utiliza-se um equipamento totalmente automatizado, *MAGO Plus* da *DiaMedix Corporation*, para a detecção e quantificação ou semiquantificação de anticorpos e antígenos (Tabela 37) por método imunoenzimático (ELISA) e a preparação de lâminas para imunofluorescência indireta (IFI), com a capacidade de realizar até 4 placas de ELISA, 16 lâminas de IFI ou uma combinação em paralelo.

Tabela 37 - Listagem de autoanticorpos quantificados por ELISA e autoanticorpos pesquisados e titulados por IFI em lâmina.

Métodos	Parâmetros	
ELISA	Serologia Infeciosas	Anticorpos anti-HSV-1 IgG e Ig M Anticorpos anti-HSV-2 IgG e Ig M Anticorpos anti-EBV IgG e Ig M Anticorpos anti- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Ig G e Ig M Anticorpos anti- <i>Chlamydia</i> Anticorpos anti-Treponema Ig M
	Síndrome Anti-fosfolípidos	Anticorpos anti-Cardiolipina Ig G e Ig M Anticorpos anti- β_2 -Glicoproteína Ig G e Ig M
	Doença Celíaca	Anticorpos anti-Gliadina Ig G e Ig A Anticorpos anti-Transglutaminase Ig A
	Outros Antígenos	Androstenediona 17- α OH-Progesterona Testosterona livre
IFI	Doenças Autoimunes	Anticorpos anti-nDNA Anticorpos anti-mitochondriais (AMA) Anticorpos anti-nucleares (ANA) Anticorpos anti-músculo liso (ASMA) Anticorpos anti-parietais (APCA) Anticorpos anti-reticulina (ARA) Anticorpos anti-banda em escova (ABBA) Anticorpos anti-ribossomal Anticorpos anti-citoplasma neutrófilos (ANCA)

4.7.1. Métodos Utilizados e Princípio de funcionamento

ELISA

O imunoensaio enzimático ELISA é um dos métodos mais utilizados para a detecção e quantificação de anticorpos e antígenos. Este método consiste essencialmente no acoplamento de enzimas a anticorpos para determinar os resultados do teste.

O método indireto é o método mais comum para a detecção e quantificação de anticorpos numa dada amostra. Este consiste num antígeno fixo na base dos micropoços da placa de ELISA, específico para o anticorpo a detetar. Adiciona-se uma pequena quantidade de amostra e vai a incubar para permitir a ligação dos anticorpos presentes na amostra aos antígenos fixos. Procede-se à lavagem dos poços para retirar todos os elementos que não se ligaram. Adiciona-se um segundo anticorpo, anti-humano marcado com uma enzima. Se os anticorpos a pesquisar estiverem presentes na amostra, os anticorpos secundários marcados ligar-se-ão a esses anticorpos durante o período de

incubação subsequente. Ao adicionar substrato ao poço haverá uma alteração da cor devido à presença do anticorpo secundário marcado com enzima.

Para a pesquisa de antígenos numa dada amostra, o método de ELISA usado é de *sandwich*. Este consiste em anticorpos específicos para o antígeno fixos na base dos micropoços que, com a adição da amostra contendo os antígenos, formará um complexo antígeno-anticorpo. Segue-se um período de incubação, lavagem e a adição de um segundo anticorpo marcado com uma enzima. Haverá a alteração da cor após a adição do substrato, que é indicativo de um resultado positivo.

Para a quantificação dos anticorpos e antígenos, efetuam-se medições fotométricas para a leitura da intensidade de cor do produto final a 450 nm e um comprimento de onda de referência entre 620 nm e 650 nm sendo diretamente proporcional à concentração de anticorpos.

Imunofluorescência Indireta

A IFI é um dos métodos mais utilizados na detecção de autoanticorpos presentes no soro humano. A detecção dos autoanticorpos é feita utilizando um antígeno fixo na superfície de uma lâmina e um conjugado anti-Ig G marcado com fluoresceína (Figura 28). As vantagens da utilização da técnica de IFI incluem a sua elevada especificidade e amplificação de sinal. Amostras positivas e negativas produzem uma grande diferença na força do sinal, que se traduz em diferenças de intensidade da fluorescência observada.

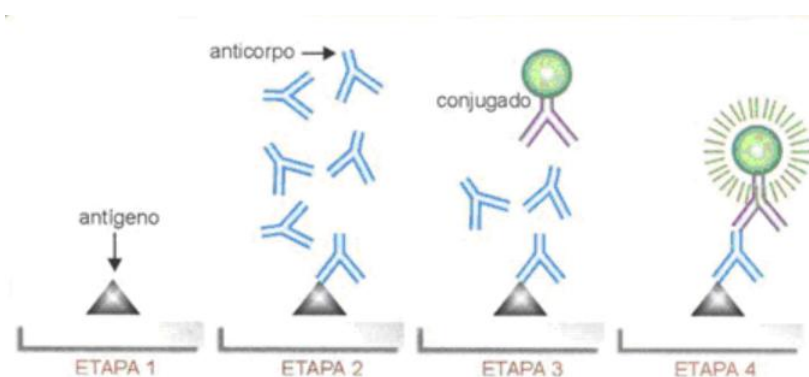


Figura 28 - Esquema do princípio do método de imunofluorescência indireta.

Primeiramente, para amostras positivas, os autoanticorpos da amostra diluída ligam-se ao substrato de antígenos acoplados à fase sólida. Num segundo passo, adiciona-se o conjugado de anti-Ig G humano marcado que irá ligar-se aos autoanticorpos. Posteriormente a fluorescência é observada usando um microscópio de fluorescência, equipado com uma lâmpada de mercúrio. Recomenda-se a objetiva de 20x para seções de tecidos, células infetadas ou transfetadas e a objetiva de 40x para substratos celulares.

Está disponível um vasto espectro de substratos de antígeno de modo a permitir a detecção de um grande número de anticorpos e de alcançar uma taxa de detecção elevada. Cada anticorpo ligado mostra um padrão típico de fluorescência em função da localização dos antígenos individuais. IFI tem ainda a vantagem de permitir a detecção simultânea de anticorpos contra vários antígenos diferentes num único substrato biológico.

4.7.2. Interesse Clínico

Doenças autoimunes são de difícil diagnóstico devido às diferentes sintomatologias, assim como à sobreposição de síndromes. Perante um resultado de IFI negativo, no caso de persistência de sintomas, não se pode descartar a hipótese da existência de uma doença autoimune pois o título dos anticorpos pode aumentar ao longo do tempo. Assim sendo, novo teste deve ser feito de modo a confirmar ou descartar qualquer doença autoimune.

Para a pesquisa e titulação dos autoanticorpos listados na tabela 37, por IFI em lâmina, são usados como substratos células HEp-2, *Crithidia luciliae*, tecidos de rim, fígado e estômago e neutrófilos humanos.

1. Células HEp-2 da *Delta Biologicals*

O kit *ANA HEp-2 Cells IFA* da *Delta Biologicals* permite preparar ensaios de IFI usando células HEp-2 como substrato para a determinação semiquantitativa de ANA no soro humano. O antígeno de substrato é uma linha de células epiteliais humanas, HEp-2, que demonstram ter uma maior sensibilidade do que cortes de tecido e produzem padrões de reconhecimento mais nítidos.

Os ANA são muito úteis como marcadores de doenças, principalmente para o rastreio de diagnóstico e para monitorizar o curso de doenças do tecido conjuntivo. Devido à sua elevada correlação com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), um ANA negativo exclui a doença. O teste de IFI identifica uma ampla variedade de autoanticorpos e, por meio de reconhecimento de padrões (Tabela 38), permite a provável identificação do antígeno e do distúrbio autoimune associado.

Tabela 38 - Padrões de reconhecimento dos anticorpos antinucleares (ANA) em células HEp-2. Estes padrões podem incluir padrões homogêneos, periféricos, pontilhado e nucleolares.

Padrões ANA	
Homogêneo	▪ Fluorescência difusa de todo o núcleo, com ou sem disfarce aparente dos nucléolos. Algumas amostras podem exibir grandes áreas irregulares de fluorescência mais intensa; ou o padrão pode aparecer granular; ▪ A região cromossômica das células mitóticas exibem um padrão de fluorescência brilhante positivo; ▪ Os antígenos nucleares são o DNA nativo (nDNA), desoxirribonucleoproteína (DNP) e histonas; ▪ O padrão homogêneo é o padrão mais comum e ocorre em pacientes com LES, doenças do tecido conjuntivo, artrite reumatoide e lúpus induzido por medicamentos.
Pontilhado	▪ Agregados fluorescentes ao longo de todo o núcleo que pode ser um pontilhado muito fino a muito grosseiro, dependendo do tipo de anticorpo presente; ▪ Anticorpos Sm e RNP estão normalmente presentes como pontilhado grosseiro com a região cromossômica das células mitóticas negativo; ▪ Anticorpos SS-A e SS-B estão presentes como pontilhado pequeno e uniforme numa distribuição uniforme com a região cromossômica das células mitóticas negativo; ▪ Pontilhado fino e denso com fluorescência positiva na região do nucléolo e cromossômica das células mitóticas pode indicar a presença do anticorpo Scl-70; ▪ Pontilhado variado, com aproximadamente 30-60% das células com fluorescência positiva ou negativa das células mitóticas, pode ser indicativo de anticorpos contra a proliferação celular; ▪ O padrão pontilhado pode ser visto no soro de LES, mas é visto de forma mais comum nos soros de doentes com escleroderma, síndrome de <i>Sjögren</i> e doenças do tecido conjuntivo.

Tabela 38 (Continuação)

Padrões ANA	
Periférico	▪ Fluorescência suave ao redor da região externa do núcleo com fluorescência mais fraca no centro; ▪ A região cromossômica dentro das células mitóticas exibem um padrão de coloração brilhante positivo. Os antígenos nucleares são nDNA e histonas; ▪ O padrão periférico está muito associado a LES na fase ativa da doença.
Nucleolares	▪ Fluorescência nos nucléolos no interior do núcleo, nitidamente separada do nucleoplasma não corado. A fluorescência nucleolar pode ser homogêneo, pontilhado ou agrupado. Acompanhado frequentemente por um padrão pontilhado; ▪ Os antígenos nucleares são PM/Scl, RNA polimerase-1 e fibrilarina; ▪ Este padrão encontra-se principalmente na escleroderma e síndrome de <i>Sjögren</i>, mas pode ser visto, embora com menos frequência, na esclerose sistêmica progressiva, LES e artrite reumatoide, quer sozinho, quer em combinação com outros ANA.

As células HEp-2 são usadas essencialmente para detecção de ANA. Devido à diversidade de antígenos no núcleo não se sabe qual o grau de certeza do resultado para um determinado antígeno, assim sendo, em caso de positividade, efetua-se um teste confirmatório usando *line blots* do *EUROLINE*. Estes consistem num método de imunoensaio com linhas de antígenos em posições bem definidas. Os anticorpos da amostra ligam-se aos antígenos e, após lavagem, é revelado com um substrato cromogénico. Os resultados positivos são facilmente identificados e a intensidade das bandas está correlacionada com o título de anticorpo.

2. *Crithidia luciliae*: Fluoro Kit DNA Nativo

O *nDNA Fluoro kit* é um teste de IFI que utiliza o hemoflagelado *Crithidia luciliae* para a detecção e titulação de autoanticorpo anti-nDNA. *C. luciliae* contém uma mitocôndria grande, designada de cinetoplasto, com uma elevada concentração de nDNA. O cinetoplasto localiza-se junto ao flagelo e ao ponto da cauda, onde o flagelo entra na membrana da célula. O núcleo encontra-se junto ao centro da célula, mas pode ser excêntrico.

As amostras de soro são diluídas em tampão e sobrepostas em suspensões de *C. luciliae*, fixas numa lâmina microscópica. A reação positiva traduz-se numa fluorescência verde-maçã do cinetoplasto da *C. luciliae* ou no cinetoplasto e núcleo. Por outro lado, reações negativas vão de não fluorescentes a uma fluorescência mais ou menos fraca no cinetoplasto da *C. luciliae*.

3. Lâminas de Tecido Triplo Rim/Fígado/Estômago

À semelhança das lâminas com células HEp-2 para deteção e titulação de ANA, neste *Fluoro-kit* as lâminas apresentam secções criostáticas de rim, fígado e estômago de rato. O uso de tecido animal evita a interferência de HLA e/ou anticorpos contra os grupos sanguíneos que podem ocorrer quando é usado substrato humano. Anticorpos específicos podem aparecer neste sistema, como, ANA, AMA, ASMA, ARA, ABBA, APCA e anti-ribossomal (Tabela 39).

Tabela 39 - Alguns dos autoanticorpos detetados e titulados por IFI a partir das lâminas com secções criostáticas de tecidos de rim, fígado e estômago de rato.

Autoanticorpos	
Anti-nucleares (ANA)	- Os ANA coram os núcleos das células de fígado, os núcleos no interior dos túbulos distais e proximais dos rins e os núcleos das células parietais e das células principais no tecido do estômago; - Os ANA são específicos de LES, podendo ser vistos em artrite reumatoide, doença mista do tecido conjuntivo, entre outros; - Podem surgir em pacientes com doenças hepáticas, como hepatite crónica ativa, cirrose biliar primária e cirrose idiopática.
Anti-micocôndria (AMA)	- Os AMA coram o citoplasma dos túbulos distais dos rins com uma fluorescência granular grosseira. Os túbulos proximais também podem apresentar fluorescência, embora com menos intensidade. Também coram o citoplasma das células hepáticas do fígado e o citoplasma das células gástricas parietais do estômago; - Os AMA têm sido reportados em menos de 90% dos pacientes que sofrem de cirrose biliar primária; - Níveis mais baixos de AMA podem surgir noutras doenças hepáticas, incluindo hepatite crónica ativa, obstrução biliar extra-hepática, doença do trato biliar não obstrutiva e malignidade hepática.

Tabela 39 (Continuação)

Autoanticorpos	
Anti-músculo liso (ASMA)	- Os ASMA coram a muscularis mucosae e a muscularis externa do tecido do estômago, bem como a camada muscular das arteríolas que possam estar presentes em qualquer uma das seções de tecido; - Inicialmente foram descritos como marcadores para a hepatite crónica ativa; - Podem ser encontrados em níveis mais baixos na hepatite viral, cirrose idiopática e cirrose biliar.
Anti-reticulina (ARA)	- Dois tipos de ARA podem ser diferenciados no tecido de rins de rato; o tipo R1 cora as fibras peritubulares e a cápsula de <i>Bowman</i> e o tipo R2 cora o endotélio vascular e as fibras perivasculares; - Podem apresentar fluorescência na membrana das células hepáticas, nas paredes dos sinusoides e no citoplasma das células de <i>Kupffer</i>; - Os ARA podem ser encontrados em casos de doença de <i>Crohn</i>, doença celíaca e dermatite herpetiforme de <i>Duhring</i>.
Anti-borda em escova (ABBA)	Os ABBA coram a borda em escova dos túbulos proximais dos rins e o citoplasma das células parietais do tecido do estômago.
Anti-células parietais (APCA)	- Os APCA coram apenas as células gástricas parietais do estômago. Não devem ser confundidos com os AMA, os quais coram os túbulos distais dos rins e as células parietais, nem com os ABBA, que coram a borda em escova dos túbulos proximais dos rins e as células parietais; - Os APCA são vistos predominantemente na anemia perniciosa, mas podem ser detetados numa incidência mais baixa em casos de tireoide de <i>Hashimoto</i>, mixedema, tirotóxicose, anemia por deficiência de ferro, insuficiência renal e Diabetes Mellitus.
Anti-ribossomal	- Os anticorpos anti-ribossomais coram o citoplasma das células gástricas principais, mas não o citoplasma das células parietais; também podem apresentar uma ligeira fluorescência no citoplasma dos túbulos dos rins; - Podem surgir em doentes com LES com envolvimento renal.

4. Neutrófilos Humanos

O kit de mosaicos de granulócitos da *EUROIMMUN* é projetado exclusivamente para a deteção e titulação *in vitro* de ANCA em amostras de soro.

Para amostras negativas todo o mosaico permanece escuro. Quando a amostra é positiva para ANCA, é possível encontrar dois padrões de fluorescência. Um dos padrões apresenta-se com fluorescência granular distribuída regularmente ao longo de todo o citoplasma dos granulócitos, com os núcleos das células livres. Estes são ANCA

com padrão citoplasmático (cANCA), provocado por anticorpos contra a proteinase 3, localizada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. No entanto, uma fluorescência cANCA também pode aparecer quando anticorpos contra a proteína de permeabilidade bactericida (BPI) estão presentes. Em casos excepcionais, o mesmo padrão ocorre devido a anticorpos contra a mieloperoxidase, que de outra forma mostram um padrão perinuclear (pANCA). O segundo padrão aparece como uma fluorescência suave perinuclear podendo ser causada por anticorpos contra a mieloperoxidase, elastase, lactoferrina, lisozima, catepsina G, entre outros.

4.8. URIANÁLISES

Na secção de urianálises procede-se maioritariamente à análise de urina tipo II usando aparelhos automatizados, à observação microscópica de sedimentos urinários e à análise de urinas temporizadas de 24h. Ainda em amostras urinárias, procede-se à pesquisa de drogas de abuso, de açúcares redutores e testes de gravidez. Procede-se à pesquisa de sangue oculto nas fezes e a técnicas manuais de serologia (que serão abordadas posteriormente).

4.8.1. *Urina Tipo II e Sedimento Urinário*

O exame à urina é usada como uma ferramenta de diagnóstico útil na abordagem de patologias renais e sistémicas. A análise da urina tipo II e sedimento urinário é caracterizada pela análise de características macroscópicas ou físicas, bioquímicas e microscópicas. Recomenda-se o uso da primeira urina da manhã colhida segundo o manual de colheitas e deve ser analisada até 2h após colheita, caso contrário deverá ser refrigerada.⁽¹⁴⁾

I. Urina Tipo II

Diariamente o laboratório recebe um grande número de urinas tipo II para serem analisadas. De modo a poder responder às necessidades do laboratório, este tem disponível um analisador de bancada para a análise totalmente automática de urinas. O *URISYS 2400* da *Roche Diagnostics* (Figura 29) procede à determinação qualitativa e

semiquantitativa *in vitro* de analitos da urina, incluindo pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, cetonas, bilirrubina, urobilinogênios e eritrócitos. Além disso, o aparelho determina as características físicas como a densidade específica, a cor e o aspeto da urina.



Figura 29 - Analisador de bancada para a análise totalmente automática de urinas tipo II, URISYS 2400 da Roche Diagnostics.

O analisador utiliza cassetes com tiras testes (ANEXO 24). Cada tira teste tem dez bandas reativas individuais que são utilizadas para testar substâncias ou características diferentes sendo os resultados dos testes baseados na leitura da intensidade de luz refletida.

Princípio do Funcionamento

Primeiramente as amostras são homogeneizadas por inversão, transferidas para tubos de centrifugação de 10 mL, identificados com códigos de barras e introduzidos no analisador. Para a determinação de todos os parâmetros semiquantitativos e físicos, o aparelho recorre a três métodos de leitura, nomeadamente fotometria de refletância para os parâmetros de tira testes, turbidimetria para a determinação do aspeto da urina e refractometria para a determinação da densidade específica.

Para as medições semiquantitativas *in vitro* das tiras de teste de urina, o URISYS 2400 utiliza um fotômetro de refletância totalmente automatizado. As fontes de luz, três díodos de emissão de luz (LED) e os tempos de leitura são otimizados para a

reação química e para o desenvolvimento de cor nas bandas reativas das tiras teste. Um LED transmite luz com um comprimento de onda, num ângulo ideal, para a superfície de uma banda reativa. A luz incide na superfície da banda reativa sendo refletida com uma intensidade que depende da cor da banda reativa. De seguida, um detetor de fotodíodo, situado diretamente acima da banda reativa, recebe a luz refletida.

A concentração é determinada comparando o valor de reflectância com o valores de reflectância específicos de parâmetros. Cada um dos três LED transmite luz de um comprimento de onda diferente, 470 nm, 555 nm e 650 nm. A utilização dos diferentes comprimentos de onda melhora os resultados que são obtidos da leitura de cada um dos parâmetros da tira teste.

Para a determinação da cor da urina, o aparelho avalia os valores de reflectância dos três comprimentos de onda na banda de compensação. No entanto, o aparelho utiliza a célula de fluxo para determinar o aspeto da urina, assim como a densidade específica. Para a determinação do aspeto, um LED (660nm) transmite luz para a célula de fluxo e é medida a quantidade de luz que atravessa a célula de fluxo. Entre as medições de amostras, o sistema é posto a zeros durante o processo de lavagem, definindo-se 100% para a transmissão da água. Os valores de transmissão das amostras são transformadas em resultados de aspeto, utilizando a tabela de intervalos de aspetos que está programada no software. Para a determinação da densidade específica, a célula de fluxo é preenchida com a amostra de urina durante a aspiração da amostra. O LED (650nm) transmite luz à célula de fluxo e um dispositivo de carga acoplada determina o ângulo de reflexão total. Por fim, o índice refrativo da amostra é calculado a partir do ângulo de reflexão total.

ii. Determinações Qualitativas

A cor da urina é muito variável e pode ser causada por diversas situações clínicas (Tabela 40). Por vezes pode ser pouco confiável dado que a verdadeira cor pode estar mascarada devido a medicação ou corantes alimentares ingeridos, assim como pode estar contaminada com restos de menstruação.

Tabela 40 - Possíveis resultados das características macroscópicas da urina tipo II, obtidos pelo aparelho URISYS 2400, e respectivas considerações clínicas.

Características	Possíveis Resultados	Considerações Clínicas
Cor	Amarelo pálido	▪ Possível doente com diabetes; ▪ Diluição da urina devido a consumo de fluídos recente.
	Amarelo	▪ Coloração de urina normal com os pigmentos urocromo, uroeritrina e urobilina.
	Amarelo-alaranjado	▪ Excesso de urobilinogénio que oxida em urobilina.
	Castanho	▪ Possível hematúria. A intensidade depende da quantidade de sangue presente e do pH da urina. Em urina ácida, a hemoglobina oxida a meta-hemoglobina; ▪ Possível infeção do trato urinário.
	Laranja	▪ Presença de bilirrubina, característica de doente com icterícia e outras doenças hepáticas.
	Vermelho	▪ Possível hematúria.
	Verde	▪ Presença de biliverdina devido à oxidação da bilirrubina; ▪ Infeção urinária por <i>Pseudomonas</i> spp.
	Outro	▪ Urina incolor pode estar associada a uma hidratação excessiva; ▪ Urina preta pode ser devido a envenenamento; presença de melanina que está presente em melanomas malignos; ou devido à presença de ácido homogentísico, característica da doença genética rara alcaptonúria.
Aspetto	Límpido	▪ Aspetto normal da urina.
	Ligeiramente Turvo	▪ Possível contaminação vaginal por células epiteliais escamosas ou mucosas; ▪ Precipitação de fosfatos.
	Turvo	▪ Possível presença de leucócitos (leucocitúria), eritrócitos (hematúria) ou células de suspensão, leveduras ou lípidos (quilúria); ▪ Devido a infeção do trato urinário; ▪ Cálculos renais.

O aspeto da urina normal deve ser límpido mas pode apresentar-se ligeiramente turva devido a contaminações vaginais ou precipitação de fosfatos. Quando se trata de uma turvação patogénica, esta pode dever-se a infeções do trato urinário, problemas renais como cálculos ou problemas metabólicos.

iii. Determinações Semiquantitativas

Os parâmetros semiquantitativos consistem na densidade específica da urina, assim como parâmetros bioquímicos como pH, leucócitos, eritrócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubinas analisados segundo

os diferentes princípios de teste (ANEXO 24). A combinação dos diferentes resultados semiquantitativos permite ter uma ideia do estado clínico dos doentes (Tabela 41).

Tabela 41 - Considerações clínicas e características macroscópicas da urina tipo II, obtidos pelo aparelho URISYS 2400, e respetivas considerações clínicas.⁽³³⁾

Caraterísticas	Considerações Clínicas
Densidade Específica	▪ Reflete a capacidade do rim em concentrar a urina; ▪ A densidade correlaciona-se com a osmolaridade urinária, ajudando a definir o estado de hidratação do utente; ▪ Valores inferiores de 1,010 indicam hidratação relativa e valores superiores a 1,020 sugerem desidratação.
pH	▪ O pH normal é ligeiramente ácido 5,5 – 6,5. No entanto, pode variar entre 4,5 e 8; ▪ É um auxiliar em determinar desequilíbrios de ácido-base de origem metabólica ou respiratória; ▪ É útil no diagnóstico e abordagem da litíase renal e infeções urinárias; ▪ Uma urina alcalina, em indivíduo com ITU, é sugestivo de infeção por um organismo produtor de urease, nomeadamente <i>Proteus</i> spp. ou <i>Klebsiella</i> spp., muitas vezes associado a cristais de fosfato de amónia; ▪ Uma urina ácida e litíase está muitas vezes associado a cristais de ácido úrico.
Leucócitos	▪ Um resultado positivo de piúria está muitas vezes acompanhado pela presença de bactérias. As causas mais comuns são cistites ou ITUs; ▪ Piúria sem bacteriúria pode ser devido a infeções por tricomonas, clamídia, leveduras e inflamação dos tecidos renais.
Nitritos	▪ Muitas vezes a presença de nitritos na urina é sinónimo de presença de bactérias em quantidades significativas e, por sua vez, ITU; ▪ A presença de nitritos deve-se à conversão de nitratos por bactérias.
Proteínas	▪ Em urina normal, a proteína existente é essencialmente de baixa massa molecular do soro, nomeadamente albumina, que são filtradas nos glomérulos e proteínas do trato genito-urinário; ▪ A presença de proteinúria pode estar associada a doenças pré-renais, renais e pós-renais.
Glucose	▪ Em condições normais, a maioria da glucose filtrada nos glomérulos é reabsorvida no tubo contornado proximal e, portanto, a urina apresenta uma quantidade muito reduzida de glucose; ▪ No caso de hiperglicemia, como acontece nos diabetes mellitus, a quantidade filtrada ultrapassa a capacidade de reabsorção e é excretada na urina; ▪ Glicosúria, não associada a hiperglicemia, pode ocorrer quando existe alguma disfunção do tubo contornado proximal.

Tabela 41 (Continuação)

Caraterísticas	Considerações Clínicas
Corpos Cetónicos	- São três os produtos intermediários do metabolismo das gorduras: acetoacetato, acetato e ácido β-hidroxibutírico; - A presença de cetonúria pode dever-se à incapacidade de metabolizar hidratos de carbono como acontece na cetoacidose diabética, vômitos, jejum prolongado e exercício extremo.
Urobilinogénio	- A conversão de bilirrubina conjugada pelas bactérias intestinais resulta em urobilinogénio que, por sua vez, é reabsorvida para a corrente sanguínea. Posteriormente uma pequena quantidade pode ser filtrada nos glomérulos; - Urobilinogénio na urina em grandes quantidades deve-se essencialmente a situações de hemólise e doenças hepáticas como cirrose e hepatite.
Bilirrubinas	- O aparecimento de bilirrubinas na urina, representa bilirrubinas conjugada, pode ser indicativo de doenças hepáticas precoces, mesmo antes de se instalar icterícia; - A bilirrubina conjugada aparece na urina quando o ciclo de degradação normal é interrompido pela obstrução do ducto biliar (cálculos biliares ou cancro) ou quando a integridade do fígado está comprometida, permitindo a fuga de bilirrubina conjugada para a circulação.
Sangue	- Hematúria está essencialmente associado a distúrbios de origem renal ou genito-urinário, no qual trauma ou estragos nestes órgãos resulta em sangramento. As principais causas incluem cálculos renais, patologia glomerulares, tumores, traumas e pielonefrites; - Hematúria não patológica pode incluir exercício extremo e contaminação devido a menstruação; - Hemoglobinúria pode ser devido a situações de hemólise, principalmente em urinas alcalinas e diluídas. Pode resultar da hemólise intravascular e subsequentemente a hemoglobina será filtrada no glomérulo; - Mioglobinúria pode surgir em pacientes com condições associadas a destruição muscular, incluindo traumas, coma prolongado, convulsões, abuso de drogas e doenças de desgaste muscular.

II. Sedimento Urinário

Após correr a amostra de urina no *URISYS 2400* da *Roche Diagnostics*, esta é encaminhada para o analisador de partículas de urina automatizado, *UF-1000i* da *Sysmex Corporation* (Figura 30). Este aparelho faz contagens diferenciais de eritrócitos, leucócitos, leveduras, células epiteliais, cilindros urinários e bactérias por citometria de fluxo. Caso o aparelho detete alguma anomalia desde bactérias, leveduras, eritrócitos, leucócitos, cristais até cilindros urinários em grandes quantidades, procede-se ao estudo dos elementos figurados na urina por observação microscópica.



Figura 30 - Analisador de partículas da urina automatizado *UF-1000i* da *Sysmex Corporation*.

Princípio do Funcionamento

O *UF-1000i* usa citometria de fluxo com laser semiconductor vermelho com um comprimento de onda fixo de 635 nm. São usados cinco reagentes para permitir a leitura por citometria de fluxo, nomeadamente, solução de revestimento, solução corante dos elementos (eritrócitos, leucócitos, células epiteliais e cilindros urinários), solução corante de bactérias e diluentes.

O feixe de laser semiconductor é emitido para os elementos presentes na urina que passam na câmara de fluxo, separando-as, usando três sinais:

- *forward scatter*: representa o tamanho da célula, sinal recebido pelo fotodíodo;
- *side scatter*: representa o estado da superfície das células, sinal recebido pelo fotodíodo;
- *side fluorescence*: representa a intensidade da coloração dos núcleos, citoplasma e membranas das células, as inclusões das partículas e os ácidos nucleicos das bactérias, sinal recebido pelo fotomultiplicador.

A luz recebida pelo detetor é convertida em impulsos elétricos de modo a formar diagramas de dispersão para análise.

iv. Avaliação Microscópica

Sendo a avaliação microscópica do sedimento urinário o passo mais moroso da urianálise, o laboratório adotou uma série de critérios ou *flags* dados pelo aparelho *UF-1000i*, que permite ao técnico selecionar as amostras que necessitam ser observadas microscopicamente. Alguns dos elementos detetados pelo aparelho não têm qualquer

significado clínico e outros são considerados normais, exceto quando estão presentes em quantidades elevadas (Tabela 42). A avaliação do sedimento urinário deve incluir tanto a identificação como a quantificação dos elementos presentes na urina.

Tabela 42 - Possíveis elementos figurados na urina observados no sedimento urinário e respectivas considerações clínicas.⁽³⁴⁾

Elementos Figurados	Considerações Clínicas
Eritrócitos	▪ Valor normal de eritrócitos: 0-3 por campo; ▪ A presença de eritrócitos na urina está associada com danos a nível da membrana glomerular ou lesão vascular no trato genito-urinário; ▪ O número de eritrócitos presente é representativo da extensão do dano ou lesão; ▪ Hematúria de origem renal pode caracterizar-se por eritrócitos dimórficos.
Leucócitos	▪ Valor normal de leucócitos: 0-5 por campo; ▪ Quando em quantidades significativas, o leucócito mais frequente é geralmente o neutrófilo; ▪ Quando acompanhado por bactérias pode ser indicativo de ITU.
Células Epiteliais	▪ <u>Células Epiteliais Escamosas</u>: são as maiores células encontradas no sedimento com citoplasma abundante e irregular e núcleo saliente. Representam a descamação celular normal e não tem nenhum significado patológico. São mais frequentes em amostras de mulheres. ▪ <u>Células Epiteliais de Transição</u>: são mais pequenas que as células escamosas e revestem todo o trato urinário. Devido à sua capacidade em absorver grandes quantidades de água, podem apresentar formas esféricas, poliédricas e caudadas, com núcleos localizados centralmente. Estão presentes em pequenas quantidades na urina normal, representando descamação normal. No entanto, um número aumentado de células com uma morfologia anormal, como vacúolos e núcleo irregular, podem ser indicativos de uma doença maligna ou infeção viral. ▪ <u>Células Epiteliais Renais</u>: estas variam em tamanho e forma, dependendo da área dos túbulos renais que lhes deram origem. São os mais clinicamente significativos pois quando em grandes quantidades é indicativo de necrose dos túbulos renais, com a possibilidade da função renal estar comprometida.
Bactérias	▪ A menos que as amostras sejam colhidas em condições inteiramente estéreis, por exemplo em doentes algaliados, é possível encontrar algumas bactérias como resultado da contaminação vaginal, uretral ou do próprio recipiente de colheita; ▪ Quando acompanhado por leucócitos, pode ser indicativo de ITU; ▪ A presença de organismos motilidade em uma gota de urina fresca colhida em condições estéreis se correlaciona bem com uma cultura de urina positiva.

Tabela 42 (Continuação)

Elementos Figurados	Considerações Clínicas
Leveduras	- Leveduras, principalmente <i>Candida albicans</i>, pode ser encontrada em urinas de doentes diabéticos, imunocomprometidos e candidíases vaginais; - Urinas ácidas e com glucose fornecem o meio ideal para o crescimento de leveduras; - Uma verdadeira infecção fúngica deve estar acompanhada pela presença de leucócitos.
Parasitas	- O parasita mais frequente encontrado no sedimento urinário é o <i>Trichomonas vaginalis</i>, transmitido sexualmente, um flagelado com forma de pera e uma membrana ondulada; - Em bora seja raro, podem aparecer ovos de <i>Schistosoma haematobium</i>, vindos da bexiga; - Como resultado de contaminação fecal, é possível encontrar ovos de parasitas intestinais. O mais comum é o <i>Enterobius vermicularis</i>.
Espermatozoides	- Podem surgir em urina de mulher e de homem após relações sexuais ou masturbação; - Raramente tem significado clínico, com exceção de casos de infertilidade masculina ou ejaculação retrógrada.
Muco	- Material proteico produzido pelas glândulas e células epiteliais do trato genito-urinário inferior e as células epiteliais renais; - Aparece microscopicamente como estruturas fibrosas; - É frequentemente encontrado em amostras de urina feminina e não tem significado clínico.
Cilindros	- A sua forma é representativa dos túbulos, com lados paralelos e extremidades ligeiramente arredondadas, podendo conter elementos adicionais presentes no filtrado; - O principal constituinte é a proteína de <i>Tamm-Horsfall</i>, uma glicoproteína secretada pelas células epiteliais renais dos túbulos contornados distais e ductos coletores superiores; - São classificados de acordo com a sua forma, tamanho e conteúdo (ANEXO 25): hialinos, eritrocitários, leucocitários, epiteliais, cerosos, granuloso, lipídicos e largos.
Cristais Urinários	- A sua identificação é importante pois podem constituir evidências de doenças hepáticas, erros inatos do metabolismo ou lesão renal causada pela cristalização de compostos iatrogénicos nos túbulos; - São formados pela precipitação de solutos da urina, devido a mudanças de temperatura, concentração de solutos e pH; - Os cristais mais frequentes em urina ácida são os uratos amorfos e de ácido úrico com coloração amarelo-acastanhado e de oxalato de cálcio. Este último aparece é mais facilmente reconhecido como um envelope octaédrico incolor ou como duas pirâmides unidas nas suas bases; - Os cristais mais frequentes em urina alcalina incluem os fosfatos amorfos e fosfato de triplo. Os primeiros têm uma aparência granular, semelhante aos uratos amorfos, enquanto os cristais fosfatos de triplo são facilmente reconhecidos pela sua forma de prisma que se assemelha a uma tampa de caixa.

Caso o aparelho detete um ou mais *flags* para a presença de cristais, cilindros patogénicos ou não patogénicos, leveduras ou bactérias, centrifuga-se a amostra durante 5 minutos a 1500 rpm. De seguida, coloca-se uma gota do sedimento entre lâmina e lamela. Varre-se a lâmina com a objetiva de 10x para observação de cilindros e a objetiva de 40x para os restantes elementos.

4.8.2. Urina 24h

A medição da quantidade exata de um produto excretado na urina é por vezes necessário, em vez de apenas indicar se está presente ou ausente. Algumas substâncias exibem variações diurnas, tais como, catecolaminas, 17-hidroxiesteróides e eletrólitos, em que a concentração mais baixa ocorre no período da tarde. Quando a concentração da substância a ser medida sofre mudanças com variações diurnas e com as atividades diárias, como exercício, alimentação e metabolismo do corpo, é necessário uma colheita temporizada.⁽¹⁴⁾ Os doentes são devidamente informados sobre o procedimento de colheita da amostra de urina. Devem começar e terminar a colheita com a bexiga vazia. Deste modo, a concentração dos analitos será calculada a partir do volume de urina produzida durante as 24h.⁽¹⁴⁾

No laboratório, antes de iniciar qualquer tipo de determinação quantitativa, a amostra de urina deve ser devidamente homogeneizada e o seu volume registado (mL). De seguida, centrifuga-se uma alíquota da urina, durante 10 minutos a 4000 rpm, para ser analisada no aparelho de química geral *Architect Ci8200 #2*.

Os parâmetros pedidos podem variar desde a quantificação de glucose, ionograma, microalbumina ou proteínas, até ao mais comum, a *clearance* de creatinina. Este último é um produto da degradação da fosfocreatina do metabolismo muscular. Geralmente, encontra-se relativamente constante no sangue, de modo que fornece um processo para avaliar a função endógena glomerular. A taxa de filtração glomerular (TFG) vem em mililitros por minuto (mL/min); por conseguinte, determina o volume de plasma necessário do qual a creatinina é completamente removida durante um minuto (C). Para calcular esta informação, recorre-se à fórmula (2) onde é necessário conhecer o volume de urina em mL/min (V), a concentração da creatinina na urina em miligrama por decilitro (mg/dL) (L) e a concentração de creatinina no plasma em mg/dL (P). O

volume de urina é calculado dividindo-se o número de minutos utilizados para a coleta da amostra.⁽³⁵⁾

$$C = \frac{U \times V}{P} \quad (2)$$

A *clearance* de creatinina é frequente usada para detetar danos renais precoces, assim como determinar a extensão dos danos de nefrónios nos casos já conhecidos de doença renal para monitorar a eficácia do tratamento de forma a evitar mais danos de nefrónios e determinar a viabilidade da administração de medicamentos que podem acumular-se no sangue até níveis perigosos, se a TFG é muito reduzida.⁽³⁵⁾

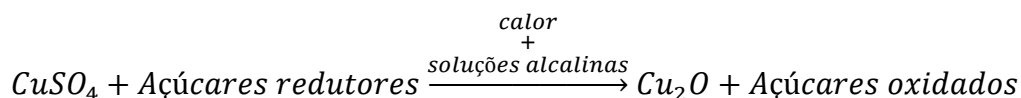
4.8.3. Outras Pesquisas Urinárias

I. Determinação Quantitativa de Açúcares Redutores

Além da glucose, outros açúcares redutores podem ser encontrados na urina, sendo a galactose a mais significativa clinicamente. A galactose na urina de um recém-nascido pode representar uma deficiência no metabolismo de hidratos de carbono, a falta da enzima galactose-1-fosfato uridil-transferase (GALT) impede que a galactose ingerida seja metabolizada e resulte em complicações como um crescimento anormal ou até a morte. A presença de outros açúcares redutores tem uma importância clínica mínima como a lactose, que é frequentemente encontrada na urina de mulheres que estão a amamentar.

Como forma de obter informação clinicamente útil sobre o metabolismo dos hidratos de carbono e determinar a quantidade de substâncias redutoras na urina, recorre-se ao *CLINITEST® Reagent Tablets* da *Bayer Corporation*. Pode ser utilizado para testar a glucose na urina mas é geralmente utilizada para o rastreio de outros açúcares redutores que possam estar presentes. Recomenda-se uma amostra de urina fresca, uma vez que a glucose e outros açúcares redutores são metabolizados pelas bactérias.

O *CLINITEST*[®] é um teste de redução do cobre, baseado no método clássico de *Benedict*, que combina reagentes reativos com um sistema integrado que gera calor (ANEXO 26). Em soluções fortemente alcalinas e na presença de calor, os açúcares redutores irão reduzir os íons cúpricos (Cu^{2+}) em óxido de cobre.⁽³⁶⁾



A reação produz uma mudança de cor do azul (sulfato de cobre - CuSO_4) passando pelo verde, amarelo até laranja ou vermelho (óxido de cobre - Cu_2O), dependendo da quantidade de substâncias de redução presentes na urina.⁽³⁶⁾

II. Pesquisa de Drogas de Abuso

Qualquer substância que modifica, aumenta, inibe ou reforça as funções fisiológicas, psicológicas ou imunológicas do organismo, permanentemente ou transitoriamente, são conhecidas como sendo drogas de abuso.

De modo a identificar as drogas de abuso consumidas por um indivíduo, realiza-se um teste rápido que deteta simultaneamente múltiplas drogas e seus metabolitos, num só passo, numa amostra de urina. Para tal usa-se o teste imunocromatográfico rápido *TOX/SeeTM Drug Screen Test*, da *BioRad* (ANEXO 27), em concentrações de *cutoff* estabelecidas pelo fornecedor. Este teste utiliza anticorpos monoclonais para detetar seletivamente níveis elevados das diferentes drogas na urina, nomeadamente, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cocaína, marijuana, metadona, metanfetaminas, metilenodioximetanfetamina, opiáceos e antidepressivos tricíclicos (ANEXO 28).

III. Teste de Gravidez

Como auxiliar da deteção precoce da gravidez, recorre-se ao ensaio de imunocromatográfico qualitativo *Pregtest 3 HCG* da *ELITech* (ANEXO 29). Este teste deteta a hCG na urina, de preferência a primeira da manhã, e no soro não hemolisado. hCG é secretado através dos tecidos da placenta logo após a fertilização, sendo depois excretado pela urina. Os níveis da hormona aumentam rapidamente, atingindo o seu

máximo após 60 a 80 dias de gestação. Assim sendo, o aparecimento de hCG, tanto na urina como no soro, torna-o um excelente marcador para a deteção precoce da gravidez.

4.8.4. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes

A deteção precoce do cancro colo-retal aumenta consideravelmente a taxa de sobrevivência do doente. Como forma a auxiliar outros testes de diagnóstico, nomeadamente, colonoscopia, recorre-se à pesquisa de sangue oculto nas fezes com o teste imunocromatográfico qualitativo *HEM-CHECK 1* da *A. MENARINI Diagnostics* (ANEXO 30). Quando em presença de pólipos colo-retais, dos quais pólipos malignos com mais de 0,5 cm podem sangrar, uma análise ao sangue oculto nas fezes é um método de despistagem, simples e económico, para o cancro colo-retal.

Recomenda-se a recolha das amostras fecais de três defecações diferentes para aumentar a probabilidade de deteção de sangramentos intermitentes de pólipos ou de uma distribuição não homogénea de sangue nas fezes.

4.9. SEROLOGIA MANUAL

Ainda na secção das urianálises, são efetuadas testes de serologia manual em amostras de soro, como a pesquisa de anticorpos não treponémicos ou treponémicos, serodiagnóstico febril, fatores reumatóides ou presença de mononucleose infecciosa. No final, todas as alíquotas são inseridas no sistema de organização automático *INDEXOR Systems* da *maksENSE* e são congeladas na seroteca.

4.9.1. Sífilis

A sífilis é uma doença complexa onde agente etiológico é o *Treponema pallidum*. Geralmente é transmitida sexualmente, mas também pode ser transmitida verticalmente durante a gravidez ou parto, originando sífilis congénita. A infeção é diagnosticada através da deteção de anticorpos específicos para *T. pallidum*, a partir da terceira ou quarta semana após contato com o microrganismo, podendo permanecer em níveis detetáveis por longos períodos após o tratamento.

Dois grupos de anticorpos são formados: um grupo que reage com os antígenos não treponémicos, usados no teste RPR (*Rapid Plasma Reagin*), e outro grupo que reage com os antígenos específicos do *T. pallidum*, usado no teste TPHA (*Treponema pallidum Haemoagglutination Assay*). Os anticorpos não treponémicos podem ser encontrados noutras infeções que não a sífilis, portanto, a pesquisa de ambos os grupos é necessária.

I. Teste RPR

O kit usado para a pesquisa de anticorpos não treponémicos é o RPR–Carbon da BioSystems. As reaginas plasmáticas, anticorpos dirigidos contra os antígenos derivados de fontes não treponémicos, formam agregados com o antígeno, congulinando com as partículas de carvão presentes no reagente.

O teste é realizado em cartões apropriados e executado de acordo com as indicações. A presença ou ausência de aglutinação é examinada visualmente, após agitação durante 8 minutos a 100 rpm. Considera-se que há reatividade quando se observa aglutinação e falta de reatividade perante a ausência de aglutinação. Para os soros reativos, procede-se à semiquantificação realizando diluições duplas com soro fisiológico e define-se o título como a maior diluição com resultado positivo.

Todas as amostras com resultado positivo para anticorpos não treponémicos devem ser confirmadas com a pesquisa de anticorpos treponémicos, antes de dar o diagnóstico de sífilis. Falsos positivos podem surgir em situações como toxicodependência, outras doenças venéreas, gravidez e pós-parto e algumas doenças autoimunes.

II. TPHA

Para a confirmação da presença de anticorpos treponémicos, utiliza-se o teste IMMUTREP TPHA, um ensaio de hemaglutinação indireta para a deteção dos anticorpos anti-*Treponema pallidum* no soro.

Este teste é constituído por um reagente de eritrócitos de aves sensibilizadas com antígeno, um reagente controlo com eritrócitos de aves não sensibilizados, um diluente e um soro controlo. Quando as amostras positivas diluídas são misturadas com os

eritrócitos sensibilizados, a reação antígeno-anticorpo ocorre aglutinando os eritrócitos em suspensão e formam um padrão característico no fundo do poço da placa de microtitulação. Na ausência de anticorpo, forma-se um botão compacto no fundo do poço.

4.9.2. Sorodiagnóstico Febril

A pesquisa de anticorpos contra antígenos febris consiste em testes por aglutinação direta, com a ajuda do *kit* de Serodiagnóstico Febril da *BioSystems S.A.* (Tabela 43). Os antígenos febris são suspensões normalizados de bactérias tingidas que são utilizados para identificar e quantificar anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infecções febris, tais como, a brucelose, salmonelose e rickettsioses.

Tabela 43 - Testes por aglutinação direta para a pesquisa de antígenos febris segundo o *kit* Serodiagnóstico Febril da *BioSystems S.A.*.

Testes	Antígenos
Wright	<i>Brucella abortus</i>
Widal	<i>Salmonella typhi</i> H
	<i>Salmonella typhi</i> OU
	<i>Salmonella paratyphi</i> AH
	<i>Salmonella paratyphi</i> BH
Weil-Felix	<i>Proteus</i> OX19

O antígeno na suspensão aglutina na presença do correspondente anticorpo homólogo nas amostras analisadas. Os resultados positivos são uma ajuda no diagnóstico de algumas doenças febris mas a aglutinação não pode ser considerada prova de infecção por um determinado organismo, dado que, diferentes microrganismos têm antígenos comuns.

4.9.3. Reação de Waaler-Rose

Para a determinação qualitativa e semiquantitativa de fatores reumatóides no soro utiliza-se um método de hemaglutinação em lâmina, o teste *NADAL Waaler-Rose*. Os fatores reumatóides são um grupo de anticorpos dirigidos à porção Fc das Ig G. Estes fatores podem ser encontrados em situações como LES ou síndrome de *Sjögren*, assim como algumas doenças não reumáticas. O teste tem como objetivo auxiliar no

diagnóstico de Artrite Reumatoide pois muitos doentes dão positivo para fatores reumatoides.

No teste *Waller-Rose*, os eritrócitos estabilizados de ovelha, sensibilizados com Ig G de coelho anti-ovelha, aglutinam na presença de fatores reumatoides. As lâminas são examinadas macroscopicamente para a presença ou ausência de aglutinação imediata, evitando qualquer movimento ou elevação da lâmina durante a observação. Nas amostras positivas, à semelhança do que acontece nos testes já descritos, procede-se à determinação semiquantitativa por diluições duplas. A diluição é feita de acordo com o fator de diluição com solução salina e procede-se do mesmo modo para o teste qualitativo. A titulação é definida como a mais alta diluição que apresenta um resultado positivo.

4.9.4. Reação de Paul-Bunnell

O teste serológico em látex *AVITEX IM* da *Omega Diagnostics* é usado para a deteção da infeção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) causador da mononucleose infecciosa.

Este é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex para a qualificação e semiquantificação dos anticorpos heterofílicos associados à mononucleose infecciosa. Baseia-se na reação entre os anticorpos do doente e o reagente com uma suspensão de partículas de látex sensibilizadas com antígeno causadores da mononucleose, procedentes de eritrócitos bovino. A adição do reagente látex à amostra de soro contendo anticorpos heterofílicos resulta na aglutinação visível num curto espaço de tempo.

Para a determinação semiquantitativa, procede-se à diluição dupla das amostras positivas. A titulação é definida como a mais alta diluição que apresenta um resultado positivo.

4.10. CALIBRAÇÕES E CONTROLOS DE QUALIDADE

Na tabela 44 estão listados todos os aparelhos da Imunoquímica e quais os procedimentos para calibrações e controlos de qualidade para garantir o correto funcionamento dos aparelhos.

Tabela 44 - Calibração e Controlo de Qualidade Interno dos aparelhos usados na Imunoquímica.

Aparelhos	Calibração	Controlo Qualidade Interno
<i>Architect Ci8200/i2000</i>	Proceder à calibração sempre que o prazo de validade da curva de calibração anterior tenha expirado, sempre que houver mudança de lote de reagente ou sempre que o CQI o exigir.	São corridos diariamente, três controlos de níveis diferentes (alto, normal, baixo) em dias alternados, ou sempre que os parâmetros sejam ativados, e sempre após uma calibração, a fim de monitorizar a precisão da medição, o estado do analisador e reagentes.
<i>Cobas e411</i>	Efetuadas sempre que houver mudanças de lote de conjugado, sempre que o período de validade da calibração ultrapassa ou sempre que o CQI o exija.	Realizado sempre que se inicia uma corrida e após uma calibração.
<i>ImmunoCAP™ 250</i>		Realizado sempre que se inicia uma corrida.
<i>URISYS 2400</i>	-	São utilizados dois níveis de controlos de qualidade semanalmente, um controlo alto e outro baixo.
<i>UF-1000i</i>	-	Requer um controlo de qualidade diariamente, antes da realização dos ensaios, alternando sucessivamente os diferentes níveis, alto e baixo.

4.10.1. Calibração

A calibração é um processo que consiste na análise de amostras com concentrações conhecidas mediante a gravação de valores de resposta do equipamento e comparação dos valores medidos com a concentração conhecida, de modo a gerar uma curva de calibração para a amostra desconhecida. Não é necessário recalibrar os ensaios todas as vezes que se realizam os testes, no entanto, determinadas circunstâncias tornam a recalibração necessária.

4.10.2. Controlo de Qualidade Interno

É importante verificar a precisão dos dados de análise de amostra e monitorizar, a longo prazo, a estabilidade dos valores de análise. Com o CQI, é possível identificar e

prevenir problemas numa fase inicial. De modo a poder validar um parâmetro é necessário ter o controlo aceitável de acordo com as regras de *Westgard* e as necessidades do laboratório. Assim sendo, as regras configuradas como uma falha de um ensaio produzem alertas para cada resultado de amostra associadas ao ensaio. As cartas de controlo, para os diferentes níveis, são representados por gráficos de *Levey-Jennings*.

Após os controlos estarem validados, procede-se à análise das amostras. Por outro lado, se o controlo for rejeitado, procede-se à identificação do problema, que pode ser desde controlos fora de validade, erro na calibração, dos reagentes, na falta de manutenções e/ou problema de programação pelo operador.

4.10.3. Controlo de Qualidade Externo

O laboratório participa no esquema de avaliação de qualidade RIQAS e UK NEQAS. No esquema de avaliação de qualidade RIQAS, participa no programa de CQE de química clínica geral onde são monitorizados mensalmente o desempenho de 17 parâmetros à escolha. Avaliam-se também parâmetros para imunoensaio, proteínas específicas e serologia infecciosa. Na avaliação de qualidade UK NEQAS, avaliam-se os marcadores víricos, autoimunidade e síndrome antifosfolípidos. Com estes esquemas de avaliação é possível a comparação direta com os resultados de outros laboratórios.

5. CONCLUSÃO

O estágio profissional do Mestrado em Análises Clínicas, no Serviço de Patologia Clínica do ULSAM, em Viana do Castelo, cumpriu com os objetivos estabelecidos.

Durante cerca de sete meses, não só foi possível a aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo da componente curricular como, também, foi possível integrar totalmente na rotina diária das diferentes secções, permitindo um contacto muito próximo da dinâmica de trabalho do laboratório a nível hospitalar. Foi possível adquirir a capacidade de manipular e processar corretamente os diferentes tipos de amostras de forma a obter resultados exatos e fiáveis; testar e controlar os diferentes métodos aplicados; desenvolver a capacidade de trabalho autónomo e de espírito crítico, assim como a capacidade de interpretação de resultados; foi possível compreender e por em prática os princípios de controlo e garantia da qualidade.

Em suma, o estágio foi bastante enriquecedor a nível de aquisição de conhecimentos e experiência para integrar com sucesso a atividade profissional.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Turgeon M. Instrumentation in Hematology. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th ed: United States of America; 2011. p. 527-47.
2. Estridge B, Reynolds A. Preparing and Staining a Blood Smear. Basic Clinical Laboratory Techniques. 6th ed. United States of America: CENGAGE Learning; 2011. p. 277-88.
3. Turgeon M. Principles of Blood Collection. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 25-49.
4. McPherson R, Pincus M. Cerebrospinal, Synovial, Serous Body Fluids, and Alternative Specimens. 22nd ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p. 480-506.
5. Strasinger S, Di Lorenzo M. Cerebrospinal Fluid. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2008. p. 177-98.
6. Strasinger S, Di Lorenzo M. Semen. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2008. p. 199-210.
7. WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: World Health Organization; 2010.
8. Strasinger S, Di Lorenzo M. Serous Fluid. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2008. p. 221-34.
9. Strasinger S, Di Lorenzo M. Synovial Fluid. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2008. p. 211-20.
10. McPherson R, Pincus M. Basic Examination of Blood and Bone Marrow. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p. 509-35.
11. Turgeon M. Manual Procedures in Hematology. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 510.
12. Miale J. Laboratory Medicine: Hematology. Michigan University: C. V. Mosby Company; 1977. 1199 p.
13. McPherson R, Pincus M. Interpreting Laboratory Results. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed: Saunders; 2011. p. 91-108.
14. Strasinger S, Di Lorenzo M. Introduction to Urinalysis. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2008. p. 29-40.
15. Martinez MHM, Bottini PV, Levy CE, Garlipp CR. UriSed as a screening tool for presumptive diagnosis of urinary tract infection. Clinica Chimica Acta. 2013;425(0):77-9.
16. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Infections of the Urinary Tract. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 842-55.
17. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed. London: Mosby, Inc; 1998. 1073 p.
18. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. *Legionella*. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 424-9.
19. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Gastrointestinal Tract Infections. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 873-90.
20. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Upper Respiratory Tract Infections and Other Infections of the Oral Cavity and Neck. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 814-21.
21. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Infections of the Lower Respiratory Tract. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 798-813.
22. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bloodstream Infections. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 778-97.
23. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Meningitis and Other Infections of the Central Nervous System. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 822-31.
24. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Genital Tract Infections. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 856-72.

25. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Skin, Soft Tissue and Wound Infections. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 891-903.
26. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Normally Sterile Body Fluids, Bone and Bone Marrow, and Solid Tissues. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 904-14.
27. Forbes B, Sahm, Daniel, Weissfeld A. Infections of the Eyes, Ears and Sinuses. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 832-41.
28. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Laboratory Methods in Basic Mycology. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 629-717.
29. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Laboratory Methods for Diagnosis of Parasitic Infections. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 543-628.
30. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Laboratory Methods in Basic Virology. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 718-77.
31. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Mycobacteria. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. p. 478-509.
32. Keren D. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. 1st ed. Great Britain: Hodder Arnold; 2003.
33. Strasinger S, Di Lorenzo M. Chemical Examination of Urine. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2008. p. 53-80.
34. Strasinger S, Di Lorenzo M. Microscopic Examination of Urine. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2008. p. 81-120.
35. Strasinger S, Di Lorenzo M. Renal Function. Urinalysis and Body Fluids. 5th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2008. p. 11-28.
36. Mundt L, Shanahan K. Chemical Analysis of Urine. Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 35-53.

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



A TIROIDE NA GRÁVIDA E NA CRIANÇA

Anabela Franco Enes

Monografia orientada pela

Prof.^a Maria João Ferreira da Silva (PhD)

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, 2015

RESUMO

A glândula da tiroide tem um papel importante na regulação das funções metabólicas. Durante a gravidez, a mulher sofre alterações fisiológicas e hormonais que resultam em efeitos significativos sobre a regulação das hormonas da tiroide, nomeadamente, uma necessidade aumentada da sua produção que depende diretamente da disponibilidade adequada de iodo e da integridade da glândula. As hormonas, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) são importantes para o desenvolvimento e crescimento durante a vida fetal e extrauterina. A transferência de T4 materna, pela barreira transplacentária, tem um papel importante no neurodesenvolvimento fetal, mesmo após o funcionamento autónomo da tiroide do feto. As iodotironina desidases (D1, D2 e D3) têm um papel importante na regulação espacial e temporal da biodisponibilidade da T3 e estão adaptadas às diferentes mudanças e necessidades do feto em desenvolvimento. Qualquer alteração na função da tiroide materna pode ter implicações negativas na grávida, feto e recém-nascido. Cerca de 2 – 3% das grávidas são afetadas pela disfunção da tiroide, sendo que 10% é de origem autoimune. O hipotireoidismo materno é a forma mais comum, causada por deficiência de iodo ou autoimune. Quanto ao hipertireoidismo nas grávidas a doença autoimune de Graves e a forma não autoimune de hipertireoidismo gestacional transiente são as mais prevalentes. Em ambas as situações, hipo e hipertireoidismo, o feto é afetado de forma diferente dependendo do estadio da gestação em que a doença se instala. É importante a avaliação atempada da disfunção, de modo a aplicar o tratamento mais indicado com o objetivo de manter a mãe e/ou feto eutiroides e, assim, minimizar os efeitos adversos.

Esta monografia pretende abordar as várias formas de disfunção tiroideia na grávida e no feto, os seus mecanismos, os diferentes factores endógenos e exógenos implicados no seu controlo bem como a terapêutica mais comum e assertiva para o controlo das várias patologias desta glândula.

ABSTRACT

The thyroid gland plays an important role in the regulation of metabolic functions. During pregnancy, the woman undergoes physiologic and hormonal changes that result in significant effects on thyroid hormone regulation, in particular, an increased need to produce thyroid hormones that depend directly on appropriate iodine availability and the integrity of the gland. The thyroid hormones, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4), are important for growth and development during fetal and extrauterine life. The transfer of maternal T4 through the transplacental barrier has an important role in fetal neurodevelopment, even after the onset of fetal thyroid function. The iodothyronine deiodinases (D1, D2 and D3) play an important part in the special and temporal regulation of T3 bioavailability and they are tailored for the different changes and requirements of the fetus in development. Any functional change of the maternal thyroid may have negative implication in the mother, the fetus and the newborn. About 2 – 3% of pregnant women are affected by thyroid disorder where 10% is autoimmune. Maternal hypothyroidism is the most common disorder, either by iodine deficiency or autoimmune disease. As for hyperthyroidism, the main cause includes autoimmune Graves' disease and the non-autoimmune form of gestational transient hyperthyroidism. In both cases, hypo- and hyperthyroidism, the fetus is affected in different ways depending on the gestation stage that the disease sets in. It is important to evaluate the disorder as well as the most appropriate treatment with the purpose of maintaining maternal and/or fetal euthyroidism and, thus, minimize adverse effects.

This paper intends to address the different forms of thyroid disorder in pregnant women and the fetus, its mechanisms, the different endogenous and exogenous factors that play a part in its control, as well as the most common and assertive treatment to control a variety of pathologies related to this gland.

INTRODUÇÃO

A GLÂNDULA DA TIROIDE

A tireoide é considerada uma das maiores glândulas endócrinas localizada na parte anterior da traqueia, abaixo da laringe. O termo “tireoide” vem do grego e significa “escudo” derivado à sua forma.⁽¹⁾ Consiste em dois lóbulos laterais ligados entre si pelo istmo central (Figura 31). Um lóbulo piramidal de tamanho variável pode estender-se para cima, a partir do istmo. Quando totalmente desenvolvida pode pesar entre 15 a

40g.⁽²⁻⁴⁾ Em comparação com qualquer outro órgão e considerando o seu peso, é altamente vascularizada, com um dos maiores índices de fluxo sanguíneo e de grande capacidade de crescimento.^(2, 4)

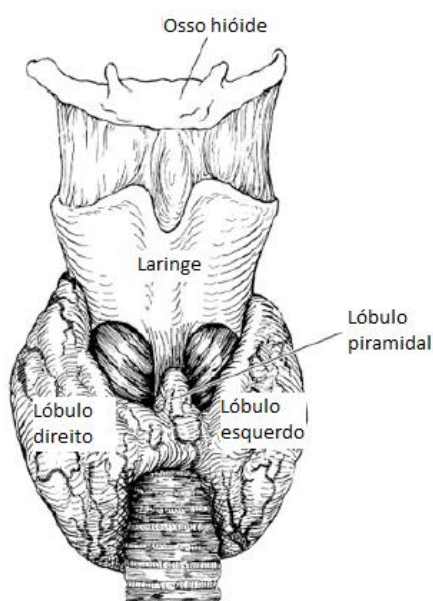


Figura 31 - A tireoide humana.⁽²⁾

A tireoide é composta por células foliculares, aproximadamente, esféricas (Figura 32). Cada folículo é revestido por uma única camada de células epiteliais que envolve um material amorfo rico em proteínas, denominado coloide.^(2, 4) O constituinte principal do coloide é a tiroglobulina (Tg) e pequenas quantidades de tiroalbumina iodado.⁽⁴⁾

A Tg é uma glicoproteína com 660 KDa composta por duas subunidades e vários resíduos de tirosina, sintetizada, apenas, pelas células foliculares. Tem, ainda, a particularidade de armazenar as hormonas da tireoide no interior do coloide.⁽⁵⁾ É a única proteína que contém quantidades significativas de iodo e a única que origina hormonas da tireoide.⁽⁶⁾

Dispersos entre os folículos encontram-se as células parafoliculares (células C), que secretam a calcitonina, que, juntamente com a hormona paratireoide (PTH) e a vitamina D, estão envolvidas na regulação do cálcio e do fósforo, e na remodelação óssea.⁽⁷⁾ Estas células estão confinadas dentro da lâmina basal folicular ou existem em aglomerados nos espaços interfoliculares.⁽⁴⁾

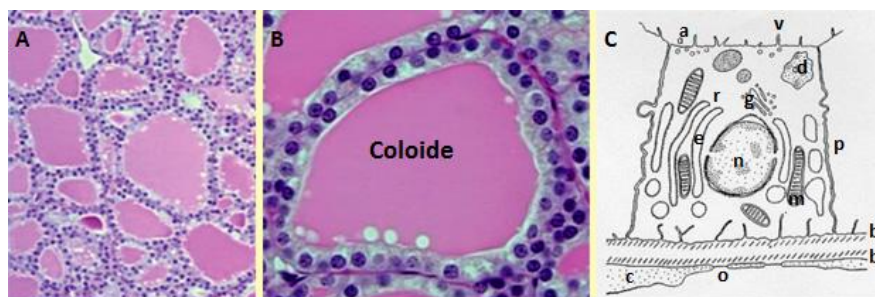


Figura 32 A e B - Diferentes ampliações dos folículos da tiroide. **C** - Célula folicular: a) superfície apical da célula; b) membrana basal; c) célula capilar; d) gotas coloidais; e) retículo endoplasmático; g) complexo de Golgi; m) mitocôndria; n) núcleo; o) célula endotelial com poro aberto; p) membrana plasmática; r) ribossomos no retículo endoplasmático; v) microvilosidade.⁽⁵⁾

A estrutura de uma célula folicular (Figura 32C) pode variar de acordo com o nível de atividade da glândula. As células repousam sobre a lâmina basal, e apresentam um núcleo central e redondo. O citoplasma contém mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e ribossomos. Junto ao ápice encontra-se um discreto complexo de Golgi, pequenos grânulos secretores com tiroglobulinas e abundantes lisossomos e fagossomos. Na superfície apical da célula, a membrana celular exibe dobras, formando microvilosidades.⁽²⁾

As células foliculares da tiroide têm como função captar e transportar o iodo para o colóide, sintetizar a tiroglobulina que será, também, libertada para o interior do colóide e, ainda, libertar as hormonas da tiroide da Tg para a circulação.⁽²⁾

HORMONAS E SUA BIOSÍNTESE

As hormonas secretadas pela glândula são a tiroxina ou T4 (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina) e triiodotironina ou T3 (3,5,3'-L-triiodotironina).⁽⁴⁾ A T3 é secretada em quantidades bastante inferiores à T4 no entanto, quando necessário, a hormona T3 pode ser formada a partir de T4 nos tecidos-alvo.⁽³⁾ São secretadas, ainda, pequenas quantidades de T3 biologicamente inativa, (3,3',5'-L-triiodotironina), conhecida como T3 reversa (rT3), quantidades mínimas de monoiodotirosina (MIT), diiodotirosina (DIT) e os precursores de T3 e T4 (Figura 33).⁽⁴⁾ A distribuição dos compostos iodados na tiroide é de 23% MIT, 33% DIT, 35% T4, 7% T3 e 3% rT3.⁽²⁾

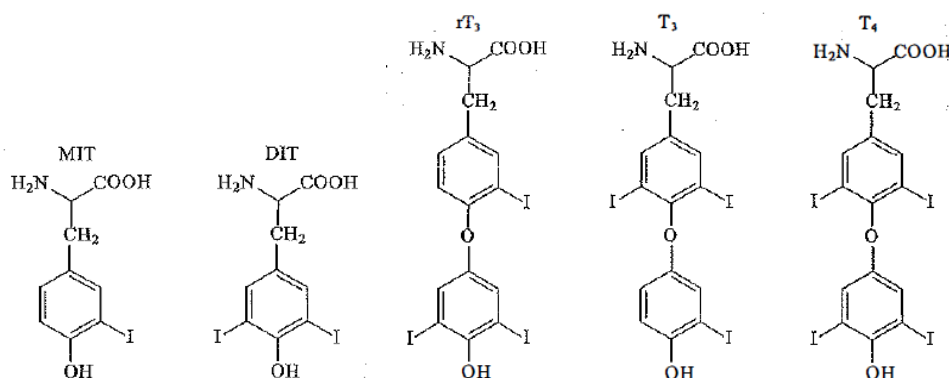


Figura 33 - Estrutura das hormonas da tiroide e seus precursores. MIT, monoiodotirosina; DIT, diiodotironina; rT₃, 3,3',5'-L-triiodotironina; T₃, 3,5,3'-L-triiodotironina; T₄, 3,5,3',5'-L-tetraiodotironina⁽⁴⁾

A biossíntese destas hormonas envolve a captura do iodo circulante pela glândula da tiroide que se concentra nas células foliculares, a incorporação do iodo na tirosina e o acoplamento dos resíduos de tirosina iodados para formar T₄ e T₃ no esqueleto da proteína Tg no lúmen folicular.^(4, 8) Cerca de 70 – 80% do iodo encontra-se na glândula da tiroide, num teor suficiente para manter a produção de T₄ durante cerca de dois meses.^(3, 9)

Assim sendo, o iodo ingerido da dieta é convertido a iodeto e é transportado para os folículos onde é absorvido (Figura 34). As células foliculares transportam o iodeto até ao coloide, podendo estar concentrado, até 30 vezes mais no fluído intracelular do que no fluído extracelular; efetua-se através de um transporte ativo secundário, dependente de Na⁺/K⁺ adenosina trifosfatase (ATPase) como fonte de energia, regulado pela TSH e pelo nível de iodo em circulação.⁽²⁻⁴⁾

De seguida, é difundido para a superfície apical da célula onde o iodeto é oxidado a iodo e difunde-se pelo coloide. A enzima tiroperoxidase (TPO), presente na superfície da célula, catalisa a iodação de resíduos de tirosina no esqueleto da proteína Tg, para formar MIT e DIT. A junção de duas moléculas DIT na Tg produz o precursor de T₄.^(4, 8) Posteriormente, a T₄ pode ser convertida a T₃ ativa por acção da enzima desiodinase.⁽¹⁰⁾

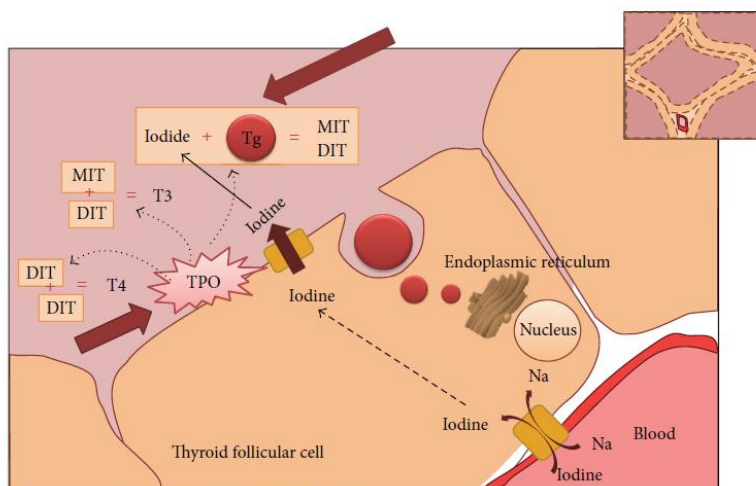


Figura 34 - Síntese das hormonas da tiroide nas células foliculares O iodo circulante é capturado pela glândula da tiroide que se concentra nas células foliculares e é transportado para o colóide. A TPO catalisa a iodinação dos resíduos de tirosina no esqueleto da Tg, para formar MIT e DIT. Quando as células foliculares são estimuladas, gotículas de colóide são envolvidas por endocitose que, por sua vez, funde com lisossomos onde são quebradas as ligações peptídicas entre os resíduos iodados e Tg, de modo a libertar T3 e T4.⁽⁸⁾

Quando as células foliculares são estimuladas a produzir T3 e T4, as microvilosidades estendem-se desde a superfície apical e, por endocitose, envolvem gotículas de colóide (Figura 34). Seguidamente, estas gotículas fundem-se com os lisossomos, onde as enzimas proteolíticas presentes vão quebrar as ligações peptídicas entre os resíduos iodados e a Tg de modo a libertar T3 e T4. Estas hormonas são libertadas para o fluido extracelular na superfície basal da célula passando assim para a circulação. Embora em menores quantidades, MIT e DIT também são formados mas, no entanto, a maioria é desiodizada na célula pelo iodotirosina dehalogenase libertando iodeto e tirosina de forma a conservar e reciclar o iodo no colóide para nova síntese de hormonas.^(3, 4, 9)

Enquanto todo o T4 do organismo tem origem na glândula da tiroide, apenas cerca de 25% de T3 é secretada na glândula, sendo 75% formada em tecidos periféricos através de desiodação da T4 mediado por iodotironinas desiodinases.^(9, 11, 12)

Vias Metabólicas

As principais vias de metabolismo das hormonas da tiroide são a desiodação e conjugação. A desiodação tem um papel na regulação da bioatividade das hormonas,

enquanto a conjugação (sulfatação e glucuronidação) de iodotironinas tem o objetivo de aumentar a solubilidade dos substratos em circulação e, por sua vez, facilitar a sua eliminação urinária e biliar.⁽¹¹⁾

Foram identificadas três iodotironinas desiodinases, proteínas integrais da membrana, que requerem tióis como cofatores. Todas contêm selenocisteína no centro ativo e diferem segundo a sua distribuição nos tecidos, perfil catalítico, especificidades do substrato, funções e regulação.^(10, 11)

A iodotironina desiodase tipo I (D1) expressa-se predominantemente no fígado, rins e tireoide. Esta enzima catalisa tanto a desiodação do anel externo (ORD) como do anel interno (IRD) dos vários derivados de iodotironinas (Figura 35), em particular de sulfatos embora seja mais eficaz na catálise da ORD do rT3. Portanto, a D1 é a principal enzima para a eliminação do rT3 e a maior fonte de T3 em circulação. A expressão da D1 no fígado e rins é controlado positivamente pelo seu produto, T3.⁽¹⁰⁾

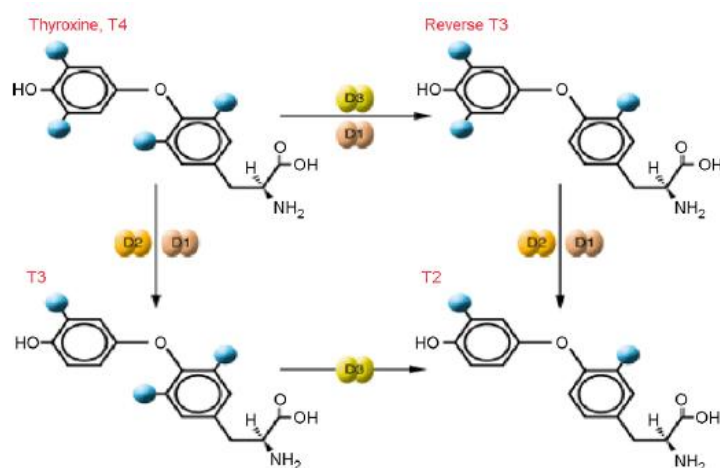


Figura 35 - Reações básicas de desiodinases. A D1 catalisa tanto a desiodação do anel externo (ORD) como do anel interno (IRD) dos vários derivados de iodotironinas; D2 tem apenas atividade ORD, com afinidade ligeiramente superior para a T4 em relação a rT3; D3 tem apenas atividade IRD e catalisa a inativação da T3 de uma forma mais eficiente que a T4.⁽¹⁰⁾

A enzima iodotironina desiodinase tipo II (D2) é expressa no cérebro, na hipófise, na tireoide, no músculo esquelético e tecido adiposo. A D2 tem, apenas, atividade ORD e apresenta uma afinidade ligeiramente superior para a T4 em relação à rT3. Ao contrário da D1, a D2 não catalisa a desiodação de iodotironinas sulfatadas. Esta enzima tem um papel importante na produção local de T3 nos tecidos que a expressam. De uma forma geral, a D2 é controlado negativamente pela hormona da tireoide.⁽¹⁰⁾

Finalmente, a enzima iodotironina desiodase tipo III (D3) é expressa essencialmente no cérebro, placenta e tecidos fetais e, ainda, na pele, útero e outros locais em que o feto tenha contacto materno. A D3 tem apenas atividade IRD e catalisa a inativação da T3 de uma forma mais eficiente que a T4. Em adultos, a D3 tem um papel na regulação dos níveis intracelulares de T3 mas também se pensa que tem um papel na eliminação de T3 no plasma e na produção de rT3.^(10, 11)

TRANSPORTE HORMONAL

Devido à insolubilidade das hormonas T3 e T4, estas encontram-se ligadas reversivelmente a proteínas transportadoras que servem, essencialmente, para as transportar na circulação sanguínea e facilitar a distribuição uniforme destas para os tecidos. As proteínas transportadoras das hormonas da tiroide são a globulina de ligação à tiroide (TBG – *Thyroid-binding Globulin*), albumina e transtiretina ou pré-albumina de ligação à tiroide (TBPA – *Thyroid-binding Prealbumin*).^(3, 5)

Aproximadamente 99,7% de T4 e T3 estão ligadas a proteínas transportadoras, principalmente à TBG, e em menores quantidades à albumina e transtiretina.⁽¹³⁾ Dada a maior percentagem de T4 ligada às proteínas transportadoras, esta apresenta um tempo de semi vida maior (aproximadamente 7 dias) do que a T3 (aproximadamente 12-24 horas).⁽⁵⁾

No entanto, apenas uma pequena quantidade de cada uma destas hormonas circula na sua forma biologicamente ativa, ou seja na sua forma livre. Existe, uma maior quantidade de T3 livre (fT3) em circulação do que T4 livre (fT4), o que consequentemente, leva a uma remoção mais rápida.^(3, 4) As formas livres mantêm o equilíbrio nos tecidos, garantindo eutiroidismo. Os níveis de fT4 e fT3 variam ao longo do tempo de modo que lactentes apresentam valores mais altos que crianças e adultos.⁽¹²⁾

REGULAÇÃO HORMONAL

A principal regulação interna da atividade das hormonas da tiroide é efetuada através da secreção da hormona tiroestimulante (TSH, tirotropina) pela hipófise; esta, por sua vez, é regulada pelo hipotálamo (Figura 36) que liberta a hormona de libertação

de tirotropina (TRH, tiroliberina), um tripéptido secretado pelo hipotálamo e que aumenta a atividade biológica da TSH através da alteração da sua glicosilação.^(1, 2)

A TSH é uma glicoproteína com duas subunidades, contendo 211 aminoácidos. A subunidade α é idêntica à da hormona foliculoestimulante (FSH), da hormona luteinizante (LH) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG). A subunidade β confere as propriedades ligantes específicas e a atividade biológica da TSH. A secreção normal da TSH exibe um comportamento circadiano, elevando-se à tarde e à noite, atingindo o seu pico após a meia-noite e declinando durante o dia.⁽²⁾

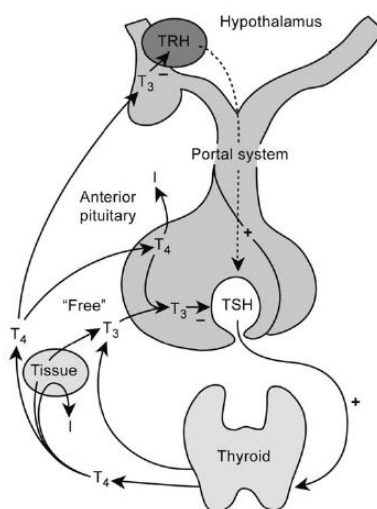


Figura 36 - Regulação das hormonas da tiroide no eixo hipotálamo-hipófise-tiroide e mecanismos de feedback envolvidos ⁽¹²⁾ A principal regulação da atividade das hormonas da tiroide é efetuada através da secreção da TSH pela hipófise que, por sua vez, é regulada pela TRH, libertada pelo hipotálamo. Um aumento de TRH vai estimular a libertação da TSH.^(1, 2) A TSH liga-se ao recetor específico TSHr, na membrana da tiroide, ativando o AMPc que, por sua vez, tem um efeito direto na produção de T3 e T4. Os níveis de T4 e T3 em circulação têm um efeito de feedback negativo inibindo diretamente a secreção de TSH, ou indiretamente através da regulação da biossíntese de TRH no hipotálamo.^(2, 14)

Quando a TSH é estimulada, liga-se ao seu recetor específico (TSHr), na membrana celular da tiroide, ativando o nucleótido adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento do AMPc intracelular leva ao aumento da captação e do transporte do iodeto, à iodação da tiroglobulina e, consequente, à síntese das iodotirosinas T3 e T4. De seguida, há um aumento da expressão de mRNA da Tg e da TPO, da atividade lisossômica, da secreção de Tg para o interior do coloide, da endocitose do coloide e da secreção de T3 e T4 a partir da glândula.^(2, 14)

Sob condições normais, a homeostase hormonal da tiroide é mantida pelo feedback positivo da TRH que estimula a produção de TSH. A TRH é secretada pelo hipotálamo em resposta a estímulos externos, tais como, *stress*, doença, necessidades metabólicas, níveis baixos de T3 e T4.⁽⁷⁾ No entanto, os níveis de T4 e T3 em circulação têm um efeito de feedback negativo inibindo diretamente a secreção de TSH, ou indiretamente através da regulação da biossíntese de TRH no hipotálamo (Figura 36); a secreção da TSH é inibida pelo *stress* que, por sua vez, pode ser devido à inibição da secreção de TRH pelos glucocorticoides.^(2, 14) A T4 em circulação parece ser a principal hormona reguladora da TSH na hipófise, embora a T3 também possa ter um papel significativo. Se a secreção de T4 pela tiroide diminui, como acontece no hipotireoidismo primário, a hipófise compensa com um aumento dos níveis de TSH (Figura 37). Se, por sua vez, a secreção de T4 pela tiroide aumentar, como acontece na doença de Graves, os níveis de TSH são reduzidos.⁽¹²⁾

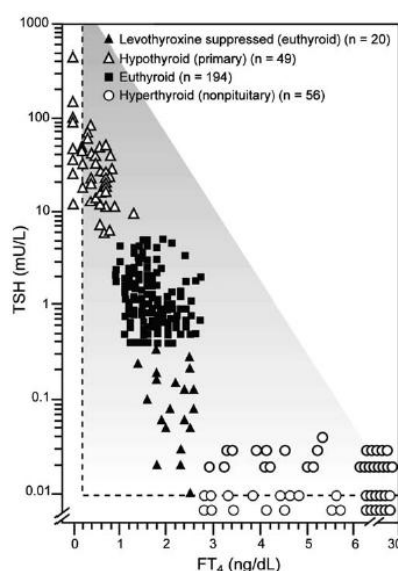


Figura 37 - Relação inversa entre TSH no soro (expresso em log10) e fT4 em eutiroides, hipotireóide (primária), hipertireóide, e indivíduos eutiroides T4 suprimidos. Com a diminuição de T4, há um aumento dos níveis de TSH como resposta compensatória pela glândula pituitária. Por outro lado, com o aumento de T4 a glândula responde com a diminuição de TSH.⁽¹²⁾

EFEITOS DAS HORMONAS

A ação das hormonas da tiroide é extremamente vasta nos diversos tecidos, de modo que poucos são os que não são afetados pelos efeitos da hormona em excesso ou em falta.⁽³⁾ As células dos tecidos-alvo apresentam na membrana o recetor/transportador de hormona para a captação das hormonas da tiroide. No interior da célula, a T3

desloca-se para o interior do núcleo ligando-se ao recetor nuclear que, por sua vez, emparelha com o elemento sensível da tiroide (TRE) no promotor do gene-alvo. Este processo pode aumentar ou inibir a expressão dos genes alvo.⁽⁵⁾

Embora ambas as hormonas tenham a mesmo efeito fisiológico, a T3 é mais potente em termos molares (três a cinco vezes) do que a T4.^(2, 3) Estas hormonas têm um papel na regulação de processos metabólicos como o crescimento somático, maturação cardíaca, pulmonar e óssea; são vitais para o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente em início da vida onde a falta de hormonas da tiroide pode provocar deficiência mental grave.^(3, 15) Têm, ainda, como efeito metabólico a regulação do consumo de oxigénio nos tecidos alvo, da taxa metabólica basal e produção de calor, estimulam a síntese proteica, influenciam o metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e vitaminas e aumentam a sensibilidade nos tecidos a catecolaminas;^(3, 5, 15, 16) influenciam a produção do fator de crescimento *insulin-like* (IGF-1) no fígado, necessário para o crescimento normal dos dentes, cabelo e pele.⁽³⁾

Quando em excesso, todos os tecidos à exceção do cérebro, testículos e baço, aumentam o seu consumo em oxigénio e as suas necessidades metabólicas. Esta necessidade aumentada do consumo de oxigénio afeta o sistema cardiovascular que responde com um aumento da frequência cardíaca. A ventilação aumenta como consequência das necessidades metabólicas que, também, estão aumentadas bem como, a concentração dos glóbulos vermelhos em circulação.⁽³⁾

Em concentrações normais, as hormonas da tiroide aumentam o efeito glucogénico da insulina e o efeito das catecolaminas, mediadas pelo AMPc, promovendo o armazenamento de gorduras e a síntese de proteínas. No entanto, quando em excesso, o equilíbrio entre a síntese e a degradação é perturbado favorecendo o catabolismo proteico e lipídico, o que origina uma perda quer de reserva de gordura como de massa corporal magra.⁽³⁾

DISFUNÇÃO DA TIROIDE

Entre 5,9% a 11,7% da população sofre de disfunções da tiroide a nível da secreção de hormonas (hipertiroidismo e hipotiroidismo), ou do tamanho ou forma da tiroide, podendo, ainda, estar associado a outras doenças.⁽¹⁾ A homeostase hormonal

pode ser afetada por drogas, patologias da tiroide, disfunção da hipófise e disponibilidade de iodo.^(7, 17)

Tirotoxicose e Hipertiroidismo

Tirotoxicose corresponde ao estado metabólico aumentado que se desenvolve quando as hormonas da tiroide livres (fT3 e fT4) estão aumentadas na circulação, com TSH normalmente suprimida. Por sua vez, hipertiroidismo está definido como sendo uma hiperfunção da tiroide, que causa tirotoxicose devido à elevada biossíntese e secreção de hormonas da tiroide.^(18, 19) No entanto, é possível encontrar níveis elevados das hormonas da tiroide quando a função da tiroide está normal (Tabela 45), como acontece no caso da libertação em excesso de hormonas armazenadas devido a inflamação da glândula da tiroide, excesso de hormonas da tiroide provenientes da dieta e a produção de hormonas de focos ectópicos.⁽¹⁹⁾

Tabela 45 - Diagnóstico diferencial de tirotoxicose derivado da hiperfunção da tiroide e excesso de hormonas livre da tiroide em circulação não derivado da hiperfunção da glândula.⁽¹⁹⁾

	Mecanismo	TSH	fT4, fT3
Com causa hipertiroides:			
Doença de Graves	Anticorpos TSHr	↓	↑
Gravidez	Aumento significativo de hCG estimula TSHr	↓	↑
Tumor na Hipófise	Hipersecreção de TSH	↑	↑
Resistência hipofisiária	Falha no mecanismo de feedback	↑	↑
Sem causa hipertiroides:			
Tiroidite de Quervain	Libertação de hormonas armazenadas	↓	↑
Tiroidite Silenciosa	Libertação de hormonas armazenadas	↓	↑
Tiroidite Pós-parto	Libertação de hormonas armazenadas	↓	↑
Tirotoxicose Iatrogénico	Excessivo de suplementos de hormonas da tiroide	↓	↑
Cancro da Tiroide	Secreção ectópica das hormonas da tiroide	↓	↑

O aumento da atividade metabólica causada pelo excesso de hormonas da tiroide manifesta-se na perda de peso, fadiga, nervosismo, ansiedade, aumento da frequência cardíaca, palpitações, menstruação irregular, intolerância ao calor, suores, diarreia, inquietação, tremores, fraqueza muscular, alterações oftálmicas e aumento variável no volume da glândula.^(7, 10) Pode ainda manifestar-se uma condição precoce de ligeiro excesso de hormonas da tiroide, ou seja, hipertiroidismo subclínico. Este é caracterizado

por TSH baixo e hormonas da tiroide livres a concentrações próximas do limite superior mas ainda dentro do respetivo intervalo de referência.⁽²⁰⁾

Hipotiroidismo

Hipotiroidismo refere-se a uma síntese diminuída de hormonas da tiroide, com TSH aumentada e hormonas livres diminuídas.⁽¹⁸⁾ Pode ser classificado de acordo com o período de instalação (congénito ou adquirido), gravidade (evidente – clínico, ou moderado – subclínico) e o grau de anomalia endócrina (primária ou secundária).^(10, 21)

O Hipotiroidismo primário é responsável por mais de 95% dos casos de hipotiroidismo, correspondendo à disfunção da própria glândula da tiroide.^(19, 21) É caracterizado pela redução dos níveis de fT4 e de níveis de TSH elevados e tem como causa mais frequente a tiroidite de Hashimoto. Em contrapartida, o hipotiroidismo secundário ou hipotiroidismo central, resulta da disfunção das vias metabólicas associadas à produção e metabolização das hormonas da tiroide. A causa mais prevalente do hipotiroidismo central é o desenvolvimento defeituoso do hipotálamo ou da hipófise, o que origina uma série de deficiências das hormonas do eixo hipotálamo-hipófise. Defeitos nos péptidos do hipotálamo e hipófise e seus recetores raramente são identificados como causa de hipotiroidismo central congénito.⁽¹⁰⁾ No entanto, foram identificadas outras causas menos comuns de hipotiroidismo (Tabela 46).⁽¹⁹⁾

Tabela 46 - Diagnóstico diferencial de hipotiroidismo primário e hipotiroidismo secundário.⁽¹⁹⁾

	Mecanismo	TSH	fT4, fT3
Hipotiroidismo Primário			
Tiroidite de Hashimoto	Doença autoimune	↑	↓
Deficiência/Excesso de Iodo	Disponibilidade de Iodo	↑	↓
Indução por Drogas	Iatrogénico	↑	↓
Tiroidectomia	Iatrogénico	↑	↓
Radiação externa	Iatrogénico	↑	↓
Hipotiroidismo Secundário			
Tiroidite de Riedel	Substituição do parênquima da tiroide por fibrose densa	↓	↓
Radiação/Cirurgia da Hipófise	Iatrogénico	↓	↓

As manifestações clínicas de hipotiroidismo são consequência de dois efeitos fisiológicos mediados pela falta de hormonas da tiroide: diminuição da taxa metabólica e a deposição de glicosaminoglicanos nos tecidos.⁽¹⁹⁾ Assim sendo, a diminuição da produção de hormonas da tiroide pode manifestar-se numa variedade de sintomas

incluindo aumento de peso, fadiga fácil, letargia, intolerância ao frio, perda de cabelo, prisão de ventre, depressão, reflexos lentos, frequência cardíaca baixa, rouquidão/voz mais grave, pele irregular e seca, colesterol elevado, olhos inchados, menstruação irregular, cólicas e fraqueza muscular. Também pode manifestar-se de forma subclínica, com sintomas generalizados dificultando o seu diagnóstico.^(7, 10) Hipotireoidismo subclínico é caracterizado pelo nível elevado de TSH e níveis de hormonas livres normais ou próximos do limite inferior mas dentro do respetivo intervalo de referência.⁽²⁰⁾

Inflamação da Tireoide

A inflamação da tireoide, ou tireoidite, refere-se à infiltração da glândula da tireoide por células que podem estar presentes em processos autoimune, inflamatório e infeccioso. Pode ser agudo e autolimitante ou crónico e progressivo.⁽¹⁸⁾ Em alguns casos, a inflamação da tireoide pode levar a hipertireoidismo transiente devido aos estragos provocados nas células foliculares e à libertação de hormonas da tireoide armazenadas.⁽²¹⁾

Como principais inflamações da tireoide foram identificadas a tireoidite de Quervain ou subaguda, silenciosa ou subaguda linfocítica, supurativa e de Riedel.^(18, 21-23)

I. Tireoidite de Quervain

Tireoidite de Quervain corresponde à inflamação da tireoide geralmente de causa viral, e, normalmente, associado a vírus de infeção do tracto respiratório superior.⁽²³⁾ Pode manifestar-se com sintomas que se assemelham à gripe, taquicardia e com o desenvolvimento de uma glândula sensível e aumentada.⁽¹⁹⁾ É três a seis vezes mais comum nas mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos de idade com predisposição genética.⁽²³⁾

Esta inflamação caracteriza-se pela infiltração de neutrófilos nas células foliculares que incham e, eventualmente, rebentam. Este inchaço folicular causa dor no pescoço e o rebentamento das células provoca um excesso das hormonas armazenadas em circulação e, conseqüentemente, tireotoxicose com TSH suprimido.⁽²²⁾ Após exaustão das hormonas armazenadas, pode instalar-se hipotireoidismo até 6 meses. Regra geral,

trata-se facilmente com um anti-inflamatório ou corticosteroides, não deixando sequelas na função da tiroide.⁽²³⁾

II. Tiroidite Silenciosa

Tiroidite silenciosa, ou subaguda linfocítica, é causada pela infiltração de linfócitos nas células foliculares da tiroide devido a uma resposta auto-imune.^(18, 22) Esta infiltração leva ao rebentamento das células e subsequente tirotoxicose, tal como acontece na tiroidite de Quervain. No entanto, apesar da infiltração, não há inchaço das células foliculares, daí que não há sensibilidade ao toque no pescoço, dor ou febre. Antes da função da tiroide regressar à normalidade e alcançar a situação de eutiroidismo, pode instalar-se um período de hipotiroidismo transiente.^(18, 21, 22)

Esta inflamação tem uma maior incidência nas mulheres. Cerca de 10% desenvolve tiroidite silenciosa durante o período pós-parto, sendo, assim, conhecida como tiroidite pós-parto.^(21, 24) Mulheres positivas para autoanticorpos da tiroide antes ou durante o primeiro trimestre de gravidez correm um risco de 30% a 50% de desenvolver esta situação.⁽²⁵⁾ Neste caso, instala-se hipertiroidismo entre 2 a 6 meses após o parto, seguido de hipotiroidismo transiente até um ano.^(22, 25) De um modo geral, a tiroidite pós-parto é transiente, no entanto, nos 5 anos subsequentes, 20% a 30% das mulheres pode vir a sofrer de hipotiroidismo permanente.⁽²⁵⁾

III. Tiroidite Supurativa

Tiroidite supurativa é uma inflamação pouco comum, com prevalência em indivíduos imunocomprometidos ou doentes debilitados.^(18, 21, 23) É causada pela presença de bactérias, predominantemente gram-positivos aeróbios (*Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.) e, ocasionalmente, por organismos fúngicos.^(18, 23) Dependendo do organismo, das vias de alastramento e do estado do hospedeiro, pode manifestar-se, clinicamente, como uma massa rija, quente e dorida no pescoço, sensível ao toque, febre e eritema da pele sobreposta.^(21, 23) Geralmente, a função da tiroide encontra-se normal, embora se possa instalar hipertiroidismo ou hipotiroidismo transitório.⁽²³⁾

IV. Tiroidite de Riedel

A Tiroidite de Riedel, também conhecida como tiroidite fibrosa invasiva, é uma doença inflamatória crônica da tiroide, caracterizada pela substituição do parênquima normal da tiroide por uma massa fibrosa densa, podendo afetar, também, tecidos adjacentes à glândula.^(18, 23) Embora seja uma forma rara de tiroidite crônica, esta tem maior prevalência em mulheres entre 30 e 60 anos. Apresenta-se como uma massa dura e aumentada no pescoço, podendo estender-se para estruturas adjacentes. Como resultado pode surgir rouquidão, paralisia das cordas vocais, dispneia, disfagia e sensação de asfixia.^(18, 21) Está associado a hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, compressão nas estruturas adjacentes e invasão dos músculos adjacentes.⁽²³⁾

Doença Autoimune da Tiroide

As doenças autoimunes da tiroide resultam da desregulação do sistema imunitário, sendo caracterizadas pela infiltração linfocítica, essencialmente de células T, que vão substituindo progressivamente as células foliculares. Normalmente, a disfunção imunitária afeta seletivamente a glândula da tiroide, mas em muitos casos, no mesmo indivíduo, podem estar associados uma ou mais doenças autoimunes como é o caso de diabetes *mellitus* tipo 1.⁽²⁵⁾

A glândula da tiroide pode ser afetada por diversas doenças autoimunes incluindo doença de Graves, tiroidite de Hashimoto e silenciosa/pós-parto, já referida nas tiroidites de origem inflamatória. Cada uma difere em fisiopatologia e manifestações clínicas.⁽¹⁸⁾ A suscetibilidade a doenças autoimunes da tiroide está relacionada com fatores genéticos e ambientais, variando nas diferentes regiões e populações.⁽²⁵⁾

I. Doença de Graves

A doença de Graves, também conhecido como Hiperplasia Tóxica Difusa, corresponde a 60% a 80% dos doentes com hipertireoidismo.^(7, 22) Tem uma maior incidência em mulheres na meia-idade com predisposição familiar.^(18, 19) Acredita-se que esteja relacionado com a modulação da resposta autoimune pelo estrogénio, podendo manifestar-se durante a puberdade, gravidez ou menopausa.⁽⁷⁾

É caracterizada como uma doença autoimune que envolve autoanticorpos do recetor da hormona tiroestimulante (TSHrAb) na superfície das células foliculares, autoanticorpos de TPO e Tg. No entanto, as manifestações da doença de Graves devem-se à atividade dos TSHrAb que estimulam o TSHr.⁽²³⁾ A ação destes autoanticorpos resulta na hiperplasia das células foliculares e diminuição do coloide, com excesso de produção de hormonas da tiroide e supressão de TSH.^(22, 23) Assim sendo, há um aumento evidente do volume da glândula da tiroide, com uma maior vascularização, e consequente hiperestimulação das suas hormonas enquanto na região envolvente aos folículos há uma infiltração linfocítica.^(18, 23)

Doentes com doença de Graves apresentam níveis elevados de TSHrAb em circulação mas, no entanto, não estão correlacionados com a severidade dos sintomas da doença. Geralmente apresentam uma tez rosada com pele quente e húmida. Podem apresentar eritema palmar, suores abundantes e pigmentação excessiva de melanina. O cabelo torna-se mais fino e quebradiço e as unhas enfraquecidas.⁽⁷⁾

Cerca de 50% dos doentes manifestam nervosismo, fadiga, frequência cardíaca elevada ou palpitações, intolerância ao calor e perda de peso. Com o avançar da idade, a perda de peso e de apetite torna-se mais comum, tal como fibrilação auricular em cerca de 20% dos indivíduos com mais de 50 anos.⁽⁷⁾

II. Tiroidite de Hashimoto

A causa mais frequente de hipotiroidismo primário e de bócio difuso está associada à tiroidite de Hashimoto, também conhecida como tiroidite autoimune crónica.^(19, 26) Afeta aproximadamente 18% da população e tem uma maior incidência em mulheres entre os 40 e os 50 anos de idade.^(23, 27) Pensa-se que esteja associada a outras doenças autoimunes tal como, doença de Graves, anemia perniciosa e diabetes *mellitus* tipo 1 ou com história familiar de tiroidite de Hashimoto.^(21, 23) É a patologia da tiroide mais comum em crianças e adolescentes.⁽²⁸⁾

É caracterizada pela infiltração linfocítica difusa da tiroide, pela presença de autoanticorpos contra TPO (TPOAb) e Tg (TgAb) e pela evidência de bócio geralmente difuso e assintomático ou atrofia da glândula.^(27, 29) O diagnóstico de tiroidite de Hashimoto é baseada na deteção, durante a fase aguda, de níveis elevados de TPOAb e/ou TgAb associado a hipotiroidismo ou eutiroidismo.^(18, 25, 29)

Numa fase inicial da doença, o doente pode estar eutiroide dificultando o seu diagnóstico. No entanto, à medida que o parênquima da tiroide é substituído por tecido fibroso, instalam-se os sintomas de hipotiroidismo.^(23, 28) Contudo, numa fase inicial, fase de destruição celular e libertação de hormonas, os sintomas de hipertiroidismo podem sobrepor-se aos do hipotiroidismo.^(18, 29)

A tiroidite de Hashimoto é geralmente assintomática e não requer tratamento. No entanto, para pacientes que desenvolvem hipotiroidismo são administrados suplementos de hormonas da tiroide. A glândula da tiroide destes doentes pode apresentar um nódulo firme e ainda estar aderente a estruturas adjacentes como nódulos linfáticos aumentados, imitando cancro da tiroide. Pacientes com bócio bastante pronunciado, devido à tiroidite de Hashimoto, podem manifestar como sintomas disfagia, tosse ou sensação de asfixia, dispneia e rouquidão, podendo ser necessário recorrer a cirurgia para aliviar a compressão.⁽³⁰⁾

Disponibilidade de Iodo

O iodo é um micronutriente essencial na biossíntese das hormonas da tiroide, sendo que o consumo na dieta recomendado para adultos é de 150 µg/d segundo a OMS, UNICEF e ICCIDD.⁽³¹⁾

Dependendo da disponibilidade de iodo presente, a glândula da tiroide tem possibilidade de realizar uma série de processos capazes de aumentar ou limitar o uso de iodo na produção das suas hormonas. Deste modo, o tipo de doença que se manifesta será diferente dependendo do nível de iodo disponível.⁽¹⁷⁾

Muitas populações são afetadas por deficiência de iodo (DI), devido à reduzida quantidade de iodo disponível em alimentos e bebidas naturais, podendo apresentar hipotiroidismo e bócio.^(17, 32) Por outro lado, a toxicidade por consumo elevado de iodo só é atingida para níveis muito superiores ao intervalo recomendado de 100 – 200 µg/L, necessário à produção normal das hormonas, sendo que um consumo relativamente elevado de iodo é tolerado.⁽¹⁷⁾ O uso de sal iodado, usado pela primeira vez na Suíça em 1920, evitou a deficiência em iodo na grande maioria dos países em todo o mundo.⁽³³⁾

Quando o consumo de iodo está abaixo de um determinado limite, o mecanismo de regulação da tiroide aumenta a atividade dos vários processos envolvidos no seu uso

para a produção de hormonas da tiroide. No entanto, se esta adaptação não for suficiente para manter a produção normal de hormonas, a atividade da tiroide será aumentada por feedback do hipotálamo e hipófise, levando a um aumento da síntese e secreção de TSH. Por sua vez, a tiroide também tem mecanismos que detetam quando o iodo se encontra em excesso, diminuindo a atividade dos processos envolvidos na síntese e secreção das hormonas da tiroide, de modo a evitar uma situação de hipertiroidismo.⁽¹⁷⁾

Uma deficiência severa de iodo pode causar hipotiroidismo devido à falta de substrato para a produção das hormonas da tiroide. No entanto, a deficiência ligeira a moderada de iodo não está associada com hipotiroidismo. Pelo contrário, pode estar ligada ao hipertiroidismo, pois para níveis moderadamente baixos de iodo, a tiroide vai compensar as necessidades de modo a manter uma produção normal de hormonas. No entanto, uma hiperatividade prolongada da tiroide em explorar o iodo limitado tem tendência para desenvolver aglomerados de células foliculares com funcionamento autónomo. Este mecanismo ainda não está totalmente compreendido. A ingestão de níveis baixos de iodo leva a um aumento de regulação de muitos processos da tiroide que podem levar ao aumento da glândula. Outro fator importante pode ser o aumento da regulação da produção de H_2O_2 para facilitar a produção das hormonas da tiroide. Excesso de H_2O_2 pode promover mutações de células da tiroide e, assim, estar envolvida no desenvolvimento de aglomerados de células foliculares com funcionamento autónomo.⁽¹⁷⁾

O risco de doença aumenta tanto para níveis acima como abaixo do intervalo recomendado necessário para a biossíntese de hormonas da tiroide. Assim sendo, a disponibilidade de iodo numa população deve encontrar-se num intervalo estreito, de forma a prevenir disfunções causadas por deficiência ou excesso de iodo.⁽¹⁷⁾

TIROIDE NA GRÁVIDA

Durante a gravidez, alterações hormonais e necessidades metabólicas resultam em alterações significativas na função da tiroide que têm lugar em diferentes fases da gestação. É importante ter conhecimento das alterações fisiológicas associadas à gravidez e como se manifesta a disfunção da tiroide, de modo a tratar a grávida de forma segura.^(9, 34)

Na grávida, a função da tiroide precisa de ser avaliada bioquimicamente dado que o estado hipermetabólico dificulta a sua avaliação clínica.⁽³⁴⁾ Considerando as alterações fisiológicas que advêm da gravidez, como a expansão de 50% do volume de plasma, o aumento da produção de TBG, a deficiência em iodo causada pelo aumento da biossíntese das hormonas da tiroide para manter a homeostase materna e satisfazer as necessidades do feto e uma eliminação renal aumentada de iodo, os intervalos de referência das hormonas da tiroide usados para não-grávidas não são apropriados para grávidas (Tabela 47).^(9, 34) Assim sendo, os resultados bioquímicos devem ser interpretados usando intervalos de referência específicos para grávidas.⁽³⁵⁻³⁷⁾

Tabela 47 - Intervalos de referência da função da tiroide recomendados para grávidas.^(34, 38)

	População não grávida	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre
fT4 (pmol/L)	9 – 26	10 – 16	9 – 15,5	8 – 14,5
fT3 (pmol/L)	2,6 – 5,7	3 – 7	3 – 5,5	2,5 – 5,5
TSH (mU/L)	0,3 – 4,2	0 – 5,5	0,5 – 3,5	0,5 – 4

PRINCIPAIS ALTERAÇÕES DURANTE A GRAVIDEZ

Durante a gravidez, o eixo hipotálamo-hipófise-tiroide materno sofre uma série de alterações fisiológicas para adaptar-se às necessidades, tanto da mãe como do feto (Tabela 48).⁽³⁹⁾

Tabela 48 - Principais alterações encontradas na função da tiroide ao longo da gravidez.⁽¹⁰⁾

Mudanças Fisiológicas	Atividade da Tiroide Face às Mudanças
↑ Estrogénio	↑ TBG
↑ TBG	↑ necessidade de T4 e T3 ↑ T4 e T3
↑ hCG	↓ TSH ↑ fT4
↑ Eliminação renal de Iodo	↑ bócio em regiões com DI ↑ necessidade de consumo de iodo ↓ produção de hormonas em regiões com DI
↑ D3	↑ necessidade de T4 e T3 ↑ degradação de T4 e T3
↑ Necessidade de T4 e T3	↑ Tg ↑ volume da tiroide ↑ bócio em regiões com DI

Sob a influência do estrogénio, que estimula a produção hepática e reduz a degradação periférica, a concentração de TBG aumenta significativamente, prolongando o tempo de semi vida de 15 minutos para 3 dias.^(36, 38, 40) Às 20 semanas de gestação, a concentração de TBG atinge o seu máximo para mais do dobro da concentração inicial (Figura 38).^(36, 38) Consequentemente, a capacidade de transporte de TBG aumenta, permitindo assim o aumento adequado das hormonas da tiroide. A TBG tem uma maior afinidade para se ligar à T4, mantendo os seus níveis em equilíbrio com níveis baixos de fT4. Na gravidez existe uma afinidade ainda maior entre a proteína transportadora e a T4, o que pode explicar os baixos níveis das hormonas livres.⁽⁴¹⁾

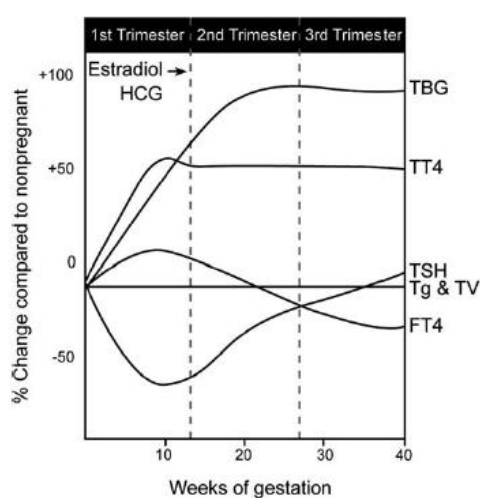


Figura 38 - Alterações dos níveis das hormonas da tiroide durante a gravidez. O aumento acentuado de hCG estabelece uma reação cruzada com TSHr, levando a um ligeiro aumento de fT4 e uma diminuição de TSH na primeira metade de gestação. O aumento acentuado de estrogénio estimula a produção de TBG e consequentemente o aumento de T4 total (TT4). Tg e o volume da tiroide (TV) mantêm-se praticamente inalterados ao longo da gestação.⁽¹²⁾

Em paralelo, no primeiro trimestre, há um aumento significativo na produção de hCG pela placenta, atingindo o seu pico máximo entre as 9 e 11 semanas de gestação (Figura 39). A concentração de hCG começa a diminuir gradualmente até atingir o ponto mais baixo às 20 semanas teor que se mantém até ao final da gravidez. Geralmente, o nível do pico é maior e mais prolongado em gravidezes múltiplas. Durante o processo de implantação, o embrião secreta ativamente hCG, detetado no soro materno a partir do 8º dia após ovulação. O papel principal de hCG é de prolongar a atividade hormonal do corpo lúteo a produzir progesterona e manter o endométrio gestacional.⁽⁴²⁾

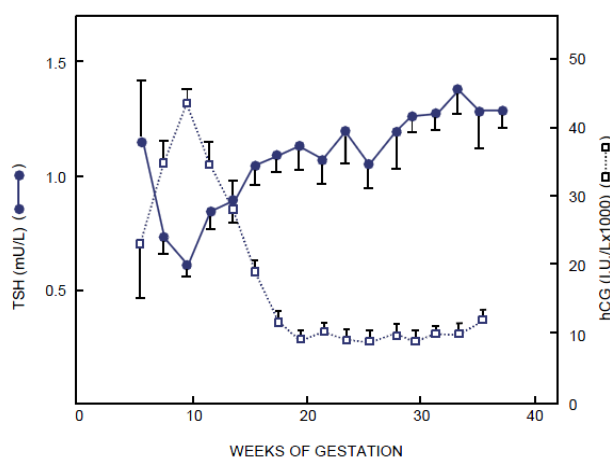


Figura 39 - Variação dos níveis de hCG e TSH durante a gestação. No primeiro trimestre, há um aumento significativo na produção de hCG pela placenta, atingindo o seu pico máximo entre as 9 e 11 semanas de gestação. A concentração de hCG começa a diminuir gradualmente até atingir o ponto mais baixo às 20 semanas, teor que se mantém até ao final da gravidez. Ao longo da gravidez, a TSH tem uma evolução inversa. TSH diminui até às 10 semanas, a partir da qual começa a aumentar.⁽⁴³⁾

Estruturalmente, a hCG partilha subunidades alfa e beta semelhantes com a TSH, conferindo-lhe um efeito *thyroid-like* que estimula TSHr a produzir hormonas da tiroide para manter os níveis adequados de fT4 necessários para o desenvolvimento fetal até este produzir as hormonas autonomamente.^(38, 43) Pelo contrário, com o aumento da concentração de hCG, a TSH diminui.⁽⁴³⁾ Por volta das 10 semanas, a concentração de TSH vai aumentando, até que, no terceiro trimestre, os valores normais de TSH tendem a ser ultrapassados ligeiramente.⁽³⁵⁾

Durante a gravidez as necessidades de consumo de iodo pode triplicar como resultado do aumento da filtração glomerular em combinação com o aumento da secreção das hormonas e transferência transplacentária, para satisfazer as necessidades do feto. Tudo isto contribui para o esgotamento de iodo e causar ou agravar a deficiência em iodo (Figura 40).^(36, 38)

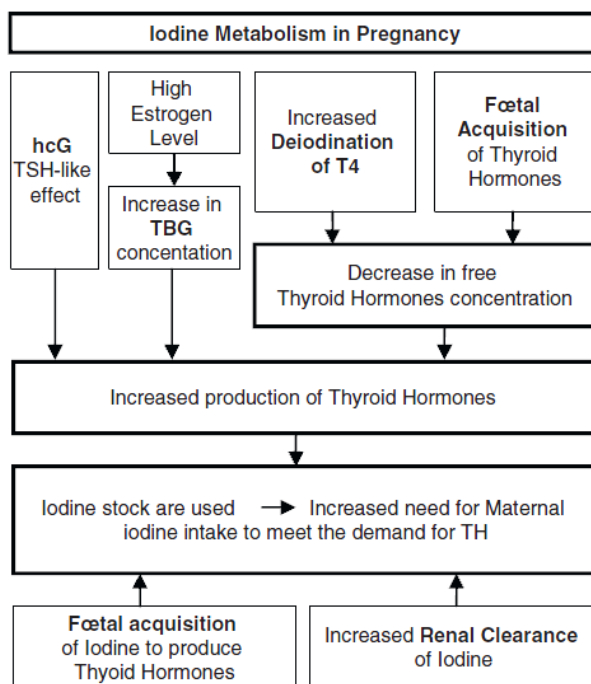


Figura 40 - Metabolismo do iodo na grávida. A necessidade aumentada no abastecimento de iodo, para responder às necessidades de produção das hormonas da tiroide, deve-se ao aumento na produção das hormonas, na depuração renal de iodo elevada e à transferência transplacentária de hormonas e iodo.⁽⁹⁾

Para mulheres grávidas saudáveis, com disponibilidade de iodo abundante ou suficiente, a mudança metabólica na glândula da tiroide tem como objetivo ajustar a produção hormonal de forma a alcançar um novo equilíbrio. No entanto, para mulheres grávidas saudáveis provenientes de regiões com disponibilidade de iodo limitada, a adaptação fisiológica é progressivamente substituída por alterações patológicas, como bócio e hipotireoidismo.^(40, 44) Isto é particularmente preocupante uma vez que a necessidade de iodo aumenta em 50% devido ao aumento da produção das hormonas da tiroide necessárias tanto para a mãe como para o feto.⁽⁴⁵⁾

Ainda, com a gestação a concentração da desidrodinase D3 aumenta na placenta. As hormonas T4 e T3 são inativadas através da remoção de moléculas de iodo, que ficam disponíveis para serem transportados para o feto. Por consequência, vai contribuir para a diminuição dos níveis das hormonas em circulação, no terceiro trimestre e, ainda, para a redução da transferência de T4 para o feto.⁽⁴⁶⁾

O volume da tiroide também pode ser afetado com a necessidade aumentada das hormonas da tiroide. Há um aumento do volume da glândula que alcança o máximo no terceiro trimestre, regressando rapidamente à normalidade logo após o parto.⁽⁴⁷⁾

Considerando as alterações fisiológicas até agora evidenciadas, além da expansão de volume do plasma, ocorre ainda um aumento no fluido extracelular e no volume de água corporal. Foi demonstrado que este último está correlacionado com o volume da tiroide, onde a retenção da água extracelular se reflete no aumento do peso corporal, e por conseguinte, no aumento do índice de massa corporal (IMC).⁽⁴⁷⁾

Todas estas alterações representam uma mudança metabólica enorme que requer um aumento na produção das hormonas totais materna, de modo a alcançar um novo equilíbrio que será mantido até ao parto.⁽⁴⁰⁾ No entanto, como resultado destas mudanças fisiológicas, nos níveis das hormonas da tiroide, os testes da função da glândula devem ser interpretados de forma diferente para uma mulher grávida em comparação a uma mulher não grávida. Assim, deve considerar-se um intervalo maior para TSH e menor para fT4 e fT3.⁽³⁸⁾ O doseamento de T4 e T3 total não são de confiança dado que os níveis das hormonas biologicamente ativas, fT4 e fT3, não sofrem grande variação.^(38, 43, 46)

DISFUNÇÕES NA GRÁVIDA

A função da tiroide é influenciada pela gravidez em que cerca de 2 – 3% das mulheres são afetadas pela disfunção da tiroide e cerca de 10% sofre da doença de origem autoimune.⁽⁴⁸⁾ Embora a maioria das mulheres com disfunções da tiroide sejam diagnosticadas antes da concepção, podem surgir mulheres que manifestem disfunção pela primeira vez durante a gravidez. Muitas vezes a sintomatologia pode ser atribuída à gravidez o que pode dificultar o seu diagnóstico e consequentemente a sua terapêutica.⁽³⁸⁾

Hipertiroidismo na Grávida

Hipertiroidismo afeta menos de 0,5% de mulheres grávidas sendo menos comum do que o hipotiroidismo.^(38, 49) A causa mais comum de hipertiroidismo na grávida é a doença autoimune de Graves, que afeta cerca de 0,4% das mulheres grávidas. Por outro lado, a forma não imune mais comum inclui o hipertiroidismo gestacional transiente, frequentemente associado a hiperémese gravídica (Figura 41).^(48, 50) Outras causas menos comuns incluem hipertiroidismo iatrogénico secundário ao tratamento com T4, tiroidite de Quervain e adenoma tóxico.⁽³⁸⁾

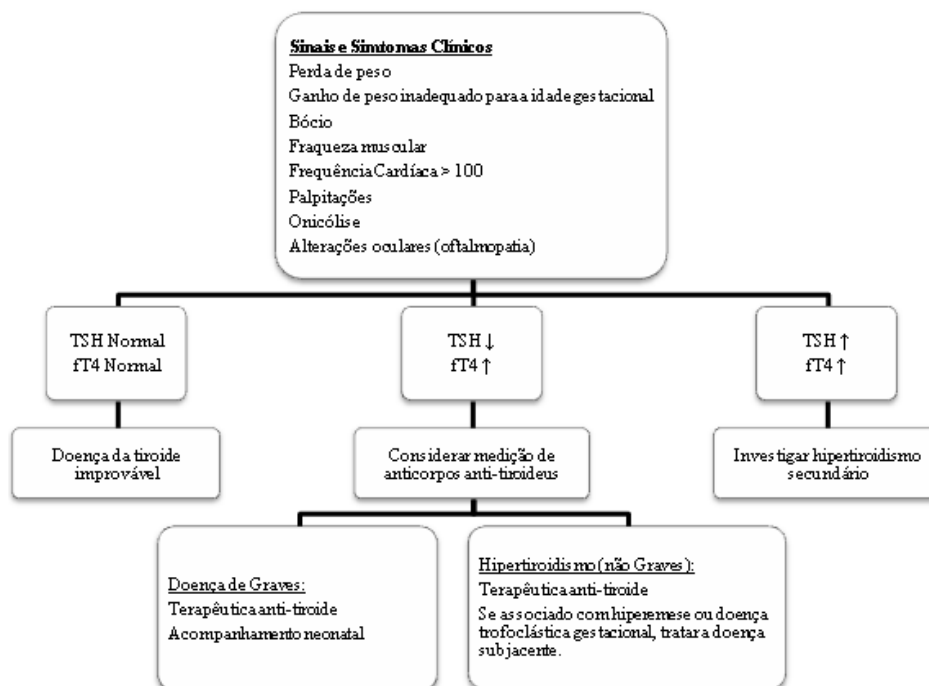


Figura 41 - Algoritmo usado na avaliação de hipertiroidismo durante a gravidez.⁽¹⁰⁾

I. Doença de Graves

A doença de Graves pode resultar em complicações maternas e fetais, se não for controlada corretamente, nomeadamente, pré-eclampsia, malformações fetais, parto prematuro e baixo peso do neonato.^(48, 49) No entanto, para mulheres onde o diagnóstico é feito corretamente e o tratamento é imediatamente iniciado, o prognóstico tanto para a mãe como para o feto é bom.⁽⁴⁹⁾

É importante considerar situações clínicas de mulheres diagnosticadas com doença de Graves antes da gravidez que estão a receber tratamento, mulheres que estão em remissão ou consideradas curadas após o tratamento prévio e, finalmente, mulheres no qual o diagnóstico de doença de Graves não foi estabelecido antes da concepção, mas apresentam TSHrAb.⁽⁴⁹⁾ O diagnóstico diferencial pode ser um desafio para o clínico se o bócio e oftalmopatia não são detetados e se TPOAb e TSHrAb são negativos. Ocasionalmente, a gravidade dos sintomas requer terapia antitiroide.⁽⁴⁸⁾

Na maioria dos casos, em mulheres diagnosticadas pela primeira vez na gravidez, os sintomas antecedem a gestação por uma questão de meses. Os sinais e sintomas de doença de Graves são semelhantes aos observados em não-grávidas. No entanto, alguns desses mesmos sintomas são vistos numa gravidez normal, tais como

intolerância ao calor, falta de ar, insónias, pulsação ligeiramente elevada e diminuição na tolerância ao exercício. Geralmente, o bócio está quase sempre presente, assim como um exame cuidadoso aos olhos pode revelar sinais de exoftalmia.⁽⁴⁸⁾

Durante o primeiro trimestre, os sintomas têm tendência a piorar devido ao efeito estimulante de hCG placentária sobre TSHr.⁽³⁸⁾ No entanto, normalmente observa-se uma melhoria no segundo e terceiro trimestre, possivelmente devido a um aumento no nível de anticorpos inibidores de TSHr, a imunossupressão parcial, típico em grávidas, com um decréscimo significativo do título de TSHrAb e um aumento significativo dos níveis de TBG, que tende a reduzir os níveis das frações fT4 e T3.^(38, 48, 49) Posteriormente, os sintomas podem piorar novamente, durante o período pós-parto, devido à exacerbação da doença de Graves ou ao desenvolvimento da tiroidite silenciosa ou pós-parto.⁽⁴⁸⁾

Um componente importante na avaliação de mulheres grávidas com doença de Graves são os TSHrAb com atividade estimulante (Figura 41). Níveis elevados de TSHrAb atravessam a barreira placentária podendo afetar a função tiroideia fetal e neonatal. O risco de tirotóxicose fetal/neonatal aumenta com valores de TSHrAb 3 a 5 vezes acima do valor normal.⁽⁴⁸⁾

II. Hipertiroidismo Gestacional

Hipertiroidismo gestacional é cerca de dez vezes mais frequente, mas menos severo, que o hipertiroidismo causado por doença de Graves em mulheres grávidas.^(38, 50) Esta disfunção é transitória e ocorre em 40-60% dos casos com hiperémese gravídica.^(36, 38, 50)

Em mulheres sem antecedentes de doença de Graves, a ausência de TSHrAb detetável e o aparecimento de sintomas após concepção ajudam na diferenciação do hipertiroidismo gestacional da doença de Graves.^(38, 50) No hipertiroidismo gestacional, os parâmetros da função tiroideia estão alterados, com níveis de fT4 elevados e/ou TSH suprimido, na ausência de autoimunidade da tiroide.^(46, 48) Estas alterações estão essencialmente relacionadas com a estimulação direta da glândula da tiroide associado aos níveis elevados da hCG, que induz uma forma transiente de hipertiroidismo durante a primeira metade da gestação.^(49, 50) Este perfil bioquímico de hipertiroidismo tem mais probabilidade de acontecer durante uma gravidez múltipla, doença trofoblástica ou

hiperémese gravídica, pois apresentam concentrações ainda mais elevadas de formas hCG com efeitos estimulantes da atividade da tiroide.^(35, 36, 46, 51)

Os sinais e sintomas são compatíveis com hipertiroidismo, nomeadamente perda de peso ou a ausência de aumento de peso, taquicardia e fadiga inexplicada. No entanto, ao contrário do que acontece na doença de Graves, mixedema pré-tibial, bócio e exoftalmia não estão presentes no hipertiroidismo gestacional. Hiperémese gravídica está frequentemente associada aos casos tirotóxicos mais severos.⁽⁵⁰⁾ Este é caracterizado por náusea e vômitos severos (com início às 4-6 semanas até cerca das 12 semanas), perda de peso, desidratação e cetonúria. Em casos mais graves, pode levar a alterações hepáticas e eletrolíticas, frequentemente resultando em hospitalização.^(36, 48, 52) No entanto, algumas manifestações clínicas da doença nem sempre são evidentes dado que, por exemplo, o vômito está descrito como um dos sintomas para o diagnóstico de gravidez.^(50, 53)

Os níveis de fT4 normalizam espontaneamente por volta das 14-20 semanas, com resolução de vômitos; no entanto, a TSH pode permanecer suprimida durante várias semanas e não necessita de terapêutica antitiroide.^(38, 48)

Hipotiroidismo na Grávida

Estima-se que cerca de 2% das mulheres grávidas sofrem de hipotiroidismo ou apresentam evidências de hipotiroidismo subclínico.⁽³⁷⁾ A maioria dos casos deve-se a doenças autoimunes, como é o caso da tiroidite de Hashimoto (Figura 42), podendo, ainda, estar associada a doenças autoimunes adicionais, como diabetes *mellitus* tipo I.^(35, 37) Outras causas incluem tireoidectomia de nódulos benignos, bócio ou malignidade e após cirurgia ou radioterapia para hipertiroidismo, hipotiroidismo congénito, doença da hipófise ou hipotalâmica e imunoglobulinas que se ligam ao TSHr bloqueando a sua atividade.^(35, 37, 48)

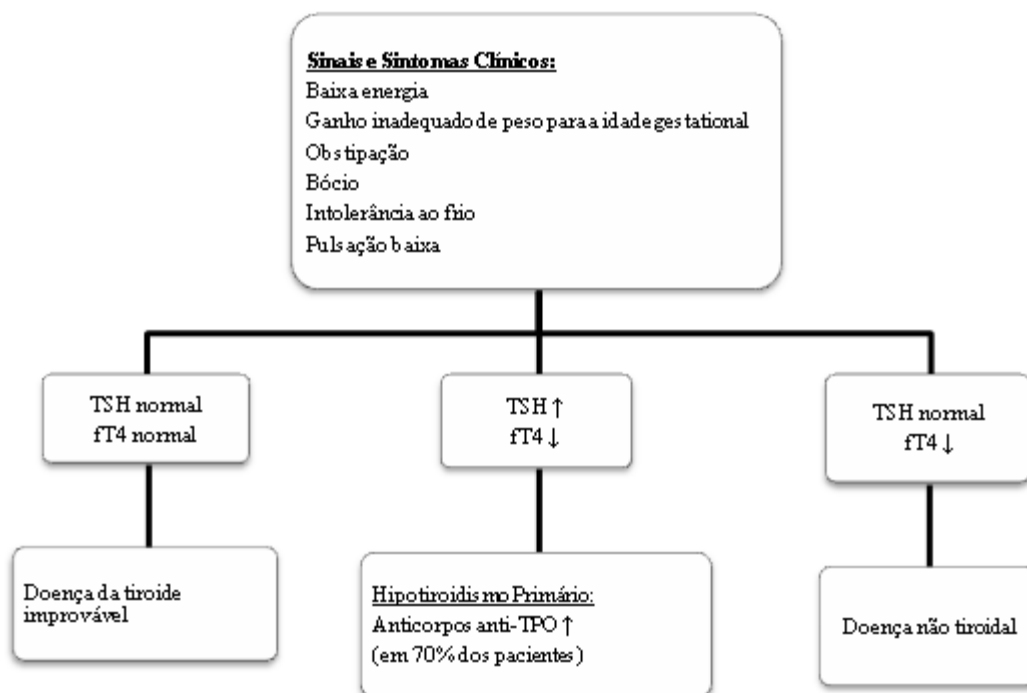


Figura 4210 - Algoritmo usado na avaliação de hipotiroidismo durante a gravidez.⁽¹⁰⁾

I. Hipotiroidismo Primário ou Subclínico

Quando a mulher grávida com hipotiroidismo não é tratada ou é indevidamente tratada, pode ocorrer eventos adversos graves. Uma das complicações mais conhecidas é a presença de um quociente de inteligência (QI) reduzido nas crianças de mães com hipotiroidismo sem reposição durante o primeiro trimestre.^(37, 48) Por outro lado, diversas complicações obstétricas têm sido descritas como, por exemplo, um aumento do risco de aborto espontâneo, morte fetal ou neonatal, assim como, parto prematuro e sofrimento fetal. Alguns estudos, ainda, descreveram a ocorrência de hipertensão gestacional (eclampsia, pré-eclampsia e hipertensão induzida pela gravidez), descolamento da placenta e hemorragia pós-parto.⁽⁴⁸⁾

Do ponto de vista materno, o objetivo é manter o eutiroidismo, sendo que o ajuste da dose de tiroxina, com base nos sintomas e sinais clínicos, é particularmente desafiador na gravidez, dado que alguns podem manifestar-se numa gravidez normal, como obstipação, cansaço, aumento de peso e adelgaçamento do cabelo (Figura 42).⁽³⁶⁾

Estudos relevaram que existe uma maior proporção de perda da gravidez em mulheres com TSH entre 2,5 - 5,0 mIU/L, durante o primeiro trimestre, enquanto no

segundo trimestre de gravidez, a prevalência de morte fetal é 4 vezes maior em mulheres com uma concentração de TSH ≥ 6 mIU/L, em comparação às mães com TSH < 6 mIU/L.⁽¹³⁾ Vários estudos têm demonstrado que os requisitos de levotiroxina aumentam significativamente (30-50%) para manter o eutiroidismo nas mulheres grávidas com hipotireoidismo, de modo a que a perda precoce do feto seja significativamente menor.^(48, 54) Um estudo revelou que as mulheres que não foram tratadas adequadamente sofreram um aborto, enquanto as mulheres com hipotireoidismo primário ou subclínico que foram corretamente tratadas com levotiroxina chegaram com a gravidez a termo.⁽¹³⁾

II. Tiroidite de Hashimoto na Grávida

Aproximadamente 10% das mulheres em idade fértil apresentam TPOAb.⁽³⁷⁾ Um estudo revelou que 6% de mais de 17 000 mulheres grávidas apresentavam TPOAb no soro, antes das 20 semanas de gestação. No primeiro trimestre apresentavam, geralmente, níveis de TSH mais elevados e de fT4 e T4 mais baixos em comparação com as mulheres com TPOAb negativo.⁽¹³⁾

Mulheres eutiroides com TPOAb positivos sofrem um risco de aborto 2 - 4 vezes superior, assim como uma incidência três vezes superior de parto prematuro (antes das 37 semanas de gestação), tiroidite pós-parto, tiroidite após perda fetal e descolamento da placenta. No entanto, a relação entre os anticorpos tiroideus e as complicações obstétricas é pouco clara, podendo agir diretamente sobre a placenta ou sobre o óvulo fecundado, levando à rejeição.⁽⁸⁾ Estes anticorpos podem estar relacionados com um efeito direto, ou podem servir de marcador para outras síndromes autoimunes.⁽¹³⁾ Deste modo, pode refletir uma forma leve de hipotireoidismo ou um desequilíbrio autoimune na mulher grávida.⁽⁸⁾

Disponibilidade de Iodo na Grávida

O iodo é um componente importante para a formação das hormonas da tiroide e está diretamente relacionado com o crescimento e desenvolvimento dos seres humanos.⁽³³⁾ Durante a gravidez, os requisitos de iodo nas mulheres aumentam mais de 50%, implicando um maior risco de DI do que na população em geral.^(32, 44) Se uma

mulher cronicamente deficiente em iodo engravida, ao apresentar reservas de iodo insuficientes para atender às necessidades acrescidas, pode desenvolver alterações patológicas progressivas que irão afetar negativamente a saúde materna e fetal.⁽⁴⁴⁾

A DI na gravidez pode levar a uma série de consequências adversas, incluindo abortos espontâneos, nados-mortos, anomalias congênitas, aumento da mortalidade perinatal e cretinismo.⁽⁴⁵⁾ Por outro lado, foi demonstrado que a ingestão excessiva de iodo pode estar associada a distúrbios clínicos como tiroidite de Hashimoto e hipertiroidismo.⁽³³⁾

Os níveis de iodo no qual pode existir um risco de deficiência intelectual não estão completamente estabelecidos. Danos cerebrais não são causados diretamente pela falta de iodo mas, indiretamente, devido a síntese insuficiente das hormonas da tiroide pela mulher grávida. Assim sendo, o risco vai depender não só dos níveis de iodo disponíveis mas, também, na capacidade da tiroide materna e da criança em produzir hormonas para um determinado nível de iodo consumido.⁽¹⁷⁾ Diversos estudos demonstraram que uma DI severa, numa dada população, está associada à elevada frequência de bócio e hipotiroidismo e que cretinismo e deficiência intelectual menos severa também podem ser comum nestas populações. Dado que o intervalo de consumo de iodo é relativamente estreito, desenvolve-se doença tanto para consumos superiores como inferiores desse intervalo (Tabela 49).⁽¹⁷⁾ Assim sendo, a existência de cretinismo sugere uma grave carência de iodo em mulheres grávidas, enquanto a existência de bócio visível sugere uma carência de iodo moderada a grave.⁽⁴⁵⁾

A DI existe numa população se a prevalência de bócio for superior a 5%.⁽⁴⁵⁾ Perante uma DI materna severa, a necessidade de captação de iodo por parte da mãe ultrapassa as necessidades do feto, podendo resultar em cretinismo; do mesmo modo, pode causar hipotiroidismo excessivo devido à falta de substrato para a produção das hormonas da tiroide.^(17, 36) Em DI ligeira a moderada, as pequenas alterações no volume da tiroide são difíceis de detetar por palpação.⁽⁴⁵⁾ Não está associada a hipotiroidismo mas, pelo contrário, a hipertiroidismo. Quando a ingestão de níveis de iodo é moderadamente baixo, a glândula da tiroide é capaz de compensar e manter a produção das hormonas da tiroide normal. No entanto, o preço da hiperatividade da tiroide prolongada para explorar a reserva de iodo limitada tende a desenvolver um crescimento e função de agregados de células foliculares autónomo.⁽¹⁷⁾ Por outro lado, pode ocorrer excesso de iodo quando a ingestão de iodo é muito alta, geralmente devido a níveis

demasiado elevados de iodo no sal ou resultantes de uma má monitorização. Um súbito aumento na ingestão de iodo pode causar hipertensão induzida por iodo ou hipotireoidismo. No entanto, a extensão do risco depende da rapidez com a ingestão de iodo é aumentada e a gravidade da deficiência de iodo pré-existente.⁽³²⁾

Tabela 49 - Riscos de doença na população associado à disponibilidade de iodo fora do intervalo recomendado.⁽¹⁷⁾

Consumo de Iodo	Média da Concentração de Iodo Urinário (µg/L)	Doença
DI Severa	< 25	Cretinismo Bócio Hipotireoidismo
DI Moderada	25 - 50	QI baixo Bócio Hipotireoidismo Hipertireoidismo
DI Ligeira	50 - 100	Bócio Hipertireoidismo
Ótimo	100 - 200	
Mais do que adequado	200 - 300	Hipotireoidismo Doença de Graves Precoce
Excessivo	> 300	Hipotireoidismo Bócio Doença de Graves Precoce

Como já foi mencionado anteriormente, a exigência aumentada de iodo deve-se ao aumento da produção das hormonas da tiroide materna para manter o eutireoidismo, à transferência das hormonas para o feto no primeiro trimestre, antes da tiroide fetal funcionar autonomamente, transferência de iodo para o feto, particularmente mais tarde na gestação e, ainda, a um aumento da depuração renal de iodo.⁽⁴⁴⁾ Este último é causado pelo aumento da taxa de filtração glomerular que, por sua vez, se deve ao excesso de estrogénio circulante. A depuração renal de iodo começa a aumentar durante a primeira semana de gestação e persiste até ao termo.⁽⁹⁾

TIROIDE NO FETO

IMPORTÂNCIA DAS HORMONAS DA TIROIDE NO FETO

Como já foi referido anteriormente, as hormonas da tiroide são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da vida fetal e extrauterina, através da sua regulação de processos metabólicos que promovem o crescimento do organismo, da função cardíaca, maturação do pulmão e desenvolvimento e diferenciação das células do sistema nervoso central.⁽⁵⁵⁾ De modo a permitir este desenvolvimento, mesmo antes do feto iniciar a síntese das hormonas da tiroide, é exposto a hormonas maternas em quantidades limitadas.⁽¹⁰⁾

A transferência das hormonas maternas para o feto tem um papel fundamental tanto antes como após a síntese das hormonas da tiroide pelo feto.⁽¹⁰⁾ No primeiro trimestre, o feto depende exclusivamente das hormonas da tiroide e do iodo materno, que vão regular o desenvolvimento normal do feto.^(10, 42) A placenta é permeável à passagem da iodotironina T4 (Figura 43) mas é impermeável a TSH e T3.⁽³⁵⁾

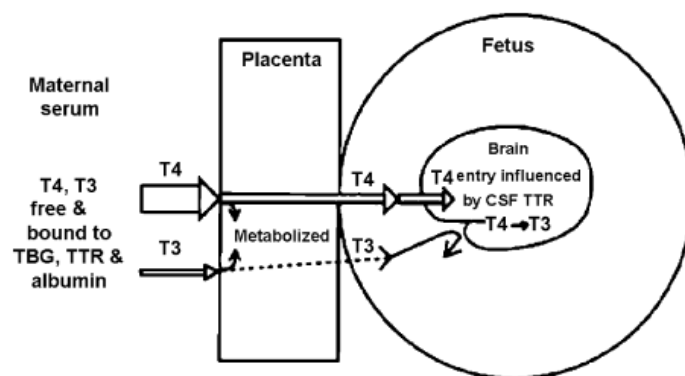


Figura 43 - Transferência das hormonas maternas com um papel fundamental no desenvolvimento neurológico do feto.⁽¹⁰⁾ A placenta é permeável à passagem da iodotironina T4 mas é impermeável a TSH e T3.⁽³⁵⁾ Uma vez atravessada a barreira transplacentária, as hormonas da tiroide são transportadas pela TBPA para o cérebro do feto.⁽¹⁰⁾

A placenta e a membrana embrionária formam uma barreira eficiente que previne a livre passagem das hormonas da tiroide da mãe para o feto, evitando que concentrações tóxicas de fT4 e fT3 atinjam os tecidos fetais, antes de serem necessários para o desenvolvimento e, eventualmente, a passagem das hormonas do feto para a mãe. No entanto, a presença de uma barreira eficiente não exclui a possibilidade de haver passagem de algumas iodotironinas.⁽⁵⁶⁾

A passagem das hormonas é estritamente regulada pelas iodotironinas desidrinases, que asseguram o mínimo de hormonas da tiroide para o feto. A transferência materna de hormonas da tiroide não para, mesmo com o funcionamento autónomo da tiroide fetal, continuando até ao termo da gravidez, sendo que cerca de 30% das hormonas da tiroide no feto são de origem materna.^(42, 56) A fonte predominante para o desenvolvimento normal do cérebro do feto é a T4 materna, convertida no local pelas iodotironinas desidrinases a T3.^(10, 39, 46) Por outro lado, a disponibilidade de T4 e T3 maternas depende dos níveis das hormonas tanto livres como ligadas às proteínas transportadoras na vez atravessada a placenta, as hormonas da tiroide são transportadas pela TBPA para o cérebro do feto.⁽¹⁰⁾ Ainda, atendendo ao papel importante do iodo na síntese das hormonas e em função da eliminação renal aumentada de iodo, a quantidade de iodo materno disponível torna-se vital para o desenvolvimento do feto.⁽⁴²⁾

Manter o eutiroidismo materno é de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento normal, em particular neurológico, do feto.⁽⁴²⁾ O desenvolvimento e a maturação do cérebro têm uma progressão espacial e temporal.⁽¹⁰⁾ Assim sendo, no início da gestação, as hormonas maternas são necessárias para a proliferação e migração neural. A partir do segundo trimestre, tanto as hormonas maternas como fetais são cruciais para neurogénese, migração dos neurónios, crescimento dos axónios, ramificação dendrítica e sinaptogénese.⁽³⁹⁾ Estes processos ocorrem essencialmente quando o feto está suplementado pelas hormonas maternas. O desenvolvimento cerebral, no início do terceiro trimestre, envolve multiplicação, migração e mielinização das células gliais, usando principalmente hormonas da tiroide produzidas pelo próprio feto.⁽¹⁰⁾

DESENVOLVIMENTO DA TIROIDE NO FETO

Durante o desenvolvimento pré-natal, a glândula da tiroide fetal surge como uma proliferação epitelial às 3 – 4 semanas, acabando por completar a sua formação às 9 – 10 semanas.^(18, 39) Durante o desenvolvimento do feto, a glândula da tiroide deve descer do forame cego, localizado na base da língua, para a parte inferior do pescoço anterior lateral à traqueia. Um desenvolvimento anormal da glândula da tiroide pode manifestar-se em malformações congénitas.⁽¹⁸⁾

O feto tem capacidade de produzir as hormonas da tiroide às 8 – 10 semanas de gestação, mas antes desse período, enquanto a tiroide do feto ainda está imatura, a fT4 materna serve como a única fonte de hormonas da tiroide para o desenvolvimento do feto.^(10, 39) Durante este período, há evidências de recetores nucleares de hormonas no cérebro, evidenciando o papel importante das hormonas no desenvolvimento neurológico.^(39, 57)

Às 12 semanas de gestação, a tiroide do feto tem a capacidade de captar ativamente iodo, sendo que a capacidade de sintetizar T4 ocorre pouco depois.⁽¹⁰⁾ Durante o mesmo período, há produção e libertação de TSH e TRH da hipófise e hipotálamo, respetivamente.⁽⁵⁷⁾ No entanto, a síntese e secreção significativa das hormonas da tiroide controlada pela TSH, da hipófise fetal, só acontece a partir do segundo trimestre (entre as semanas 16 – 20 de gestação).^(13, 39)

Os níveis de TSH e T4 na corrente sanguínea do feto permanecem baixos até ao segundo trimestre.⁽⁴²⁾ A partir deste período, quando a tiroide do feto funciona independentemente da mãe, alterações na placenta evitam a transferência excessiva de T4 materna.⁽³⁶⁾ Se as concentrações de T4 e T3 nos fluidos fetais atingirem as mesmas concentrações que no soro materno, os tecidos estariam expostos a concentrações elevadas de iodotironinas livres, podendo mesmo ser submetidos a níveis tóxicos. Assim, para evitar estes excessos, os padrões de desenvolvimento de iodotironinas e das atividades das iodotironinas desidinases, D2 e D3, apresentam uma especificidade espacial e temporal, com algumas divergências no córtex cerebral das outras áreas do cérebro, especialmente cerebelo.⁽⁵⁶⁾ O conhecimento do mecanismo de ação das hormonas da tiroide no cérebro deve-se essencialmente a estudos experimentais em animais.⁽³⁹⁾

As concentrações de T3 e fT3 ao longo da vida fetal são muito reduzidas em comparação com as concentrações encontradas no soro materno e na população adulta em geral (Figura 44). Por outro lado, tanto T4 como fT4 aumentam de forma estável com o avançar da gestação, atingindo concentrações maternas no início do terceiro trimestre. Não foram encontrados nenhuma correlação entre concentrações materna e fetal de T4 ou fT4, de T3 ou fT3, ou de TSH.⁽⁵⁶⁾

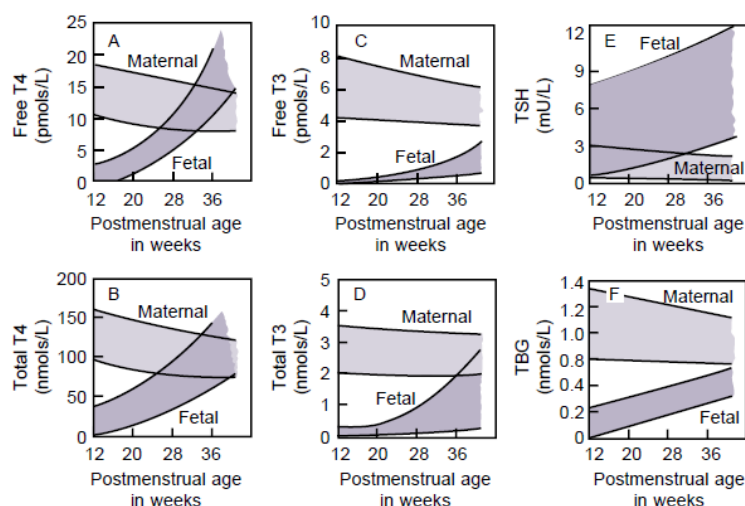


Figura 44 - Os gráficos A – F correspondem aos diferentes parâmetros da tiroide desde as 12 semanas após concepção até ao nascimento. Estes resultados foram obtidos *in vivo* por cordocentese, sem interferir com a ligação normal entre a mãe e o feto. As áreas sombreadas nos gráficos A e B mostram que T4 e fT4 fetal atingem concentrações maternas após o segundo trimestre, enquanto T3 e, especialmente, fT3 permanecem baixas durante toda a gravidez. O gráfico E chama especial atenção para os níveis muito elevados de TSH fetal que, na sua maioria, estão sempre superiores aos níveis maternos.⁽⁵⁶⁾

Muito antes da maturação do sistema hipotálamo-hipófise no feto, a TSH em circulação encontra-se mais elevada do que na mãe ou adulto. A bioatividade da TSH está bastante aumentada em relação à TSH materna, confirmando que não é de origem materna nem está sob controlo neuroendócrino do hipotálamo.⁽⁵⁶⁾

Após o nascimento, a TSH, T4 e T3 são libertadas abruptamente criando um estado hipertiroide no recém-nascido, possivelmente para facilitar os ajustes no sistema termorregulador para a vida extrauterina. É nesta fase que é alcançado um sistema hipotálamo-hipófise-tiroide regulado por *feedback*.^(39, 42)

A expressão e atividade aumentada de D3, o principal inativador fisiológico das hormonas da tiroide, não estão restritos apenas à barreira que separa o útero da placenta, mas também se encontra na pele e no epitélio do pulmão, intestino delgado e trato urinário fetal.⁽⁵⁶⁾ Assim sendo, além de inativador das iodotironinas, a D3 restringe o acesso das hormonas, protegendo os tecidos em diferenciação do excesso de hormonas.⁽¹¹⁾

Entre as semanas 13 – 20, apesar da concentração de T3 em circulação ser muito baixa, no córtex cerebral a T3 aumenta para níveis comparáveis aos que são reportados

no adulto. A atividade de D2 está aumentada enquanto a atividade de D3 é muito reduzida. Por outro lado, durante o primeiro trimestre, foram encontradas quantidades reduzidas de T3 no cerebelo com atividade aumentada de D3. A concentração de T3 só começa a aumentar a partir do segundo trimestre devido à diminuição da atividade de D3. Outras regiões com atividades aumentadas de D3, como mesencéfalo, gânglios basal, tronco cefálico, medula espinal e hipocampo, também têm concentrações reduzidas de T3. Isto vem suportar a teoria de que a T3 é de facto necessária no córtex cerebral antes do segundo trimestre, quando a mãe é a única fonte de fT4 para os tecidos. Além disso, vem confirmar o papel importante da D2 e D3 na biodisponibilidade local de T3 durante a vida fetal: D2 gera T3 a partir de T4 e D3 protege áreas do cérebro de T3 em excesso, até ser necessário diferenciação.⁽⁵⁶⁾

As reduzidas concentrações de T4 e elevadas concentrações de rT3 na circulação fetal deve-se à atividade D3 na placenta que converte grandes proporções de T4 em rT3 e de T3 em 3,3'-diiodotironina (T2) durante a transferência placentária.⁽¹¹⁾

Embora a expressão e atividade enzimática de D2 sejam encontradas, a D3 é a enzima predominante. Tanto a expressão como a atividade de D2 e D3 na placenta diminuem com o avançar da gravidez.⁽⁵⁶⁾

EFEITO DA DISFUNÇÃO MATERNA NO FETO

Variações muito subtis no função da tiroide na grávida ou mulher a amamentar pode causar efeitos prejudiciais no feto.⁽⁴²⁾ Atendendo aos diferentes estadios da gravidez, uma disfunção da tiroide materna vai afetar diferentes regiões no cérebro fetal. Uma disfunção da tiroide numa fase inicial da gravidez vai afetar a os gânglios basais enquanto o desenvolvimento do cerebelo e hipocampo são influenciados numa fase mais tardia.⁽³⁹⁾ Consequentemente, a função da tiroide fetal pode ser afetada pela passagem transplacentária de TSHrAb materno, causando hipertiroidismo fetal, e pela passagem de tioamidas, causando hipotiroidismo fetal.⁽³⁸⁾

Os mecanismos de regulação são importantes na proteção do feto contra a disfunção da tiroide materna. Perante uma situação de hipertiroidismo materno, há um aumento da D3 enquanto numa situação de hipotiroidismo materno, há um aumento da D2. No segundo trimestre de gestação, foi encontrado D2 no cérebro fetal que aumenta em resposta a uma diminuição da concentração de T4 plasmática.^(11, 58) Por outro lado, a

D1 não parece estar envolvida nos processos de regulação para a geração de T3 intracelular. Pensa-se que a sua atividade se apresenta diminuída durante a vida fetal.⁽⁵⁸⁾

Hipertiroidismo Fetal

Apesar de ser raro, o hipertiroidismo fetal surge em aproximadamente 2-5% das mulheres grávidas com doença de Graves ativa ou tratada por cirurgia ou radioiodoterapia.^(35, 37) Esta condição resulta da passagem transplacentária de elevados níveis de TSHrAb, 3-4 vezes maior do que o normal, após as 24 semanas de gestação, estimulando a glândula da tiroide fetal.^(35, 37, 38, 59)

Um diagnóstico clínico de hipertiroidismo fetal pode ser feito com base em taquicardia fetal, movimentos fetais excessivos, crescimento intrauterino restrito, arritmias, hidrópia, idade óssea avançada e presença de bócio fetal. Por sua vez, a presença de bócio pode causar polidrâmnio, devido a dificuldades de deglutição e à extensão do pescoço, aumentando a possibilidade de um trabalho de parto obstruído e morte fetal.^(38, 60)

Se a suspeita de diagnóstico ocorrer no período pré-natal, pode ser necessário obter uma amostra de sangue intrauterina do feto para confirmação, embora não seja utilizado usualmente para chegar a um diagnóstico.^(36, 38) Após confirmação do diagnóstico fetal, aumenta-se a dose da medicação antitiroideia da mãe, adicionando, se necessário, T4 para evitar o hipotiroidismo materno uma vez que não atravessa a placenta.⁽³⁵⁾ Alternativamente, se o tempo gestacional estiver suficientemente avançado, a indução do parto pode ser preferível. Assim sendo, os testes à função da tiroide fetal serão realizados no sangue colhido do cordão umbilical no momento do parto.⁽³⁸⁾

Hipotiroidismo Fetal

A falta de hormonas da tiroide materna pode ter efeitos irreversíveis no feto. Isso pode levar ao crescimento anormal do cérebro, assim como ao desenvolvimento de danos cerebrais que, por sua vez, podem manifestar-se num desenvolvimento cognitivo insuficiente, atraso mental e paralisia cerebral.⁽¹⁰⁾ O hipotiroidismo durante o desenvolvimento do cérebro produz hipomielinização, atraso na migração e proliferação celular, diminuição da formação de sinapses e desregulação de neurotransmissores.⁽⁶¹⁾

Estas consequências adversas devem-se à insuficiente transferência transplacentária de hormonas da tiroide maternas para o feto em desenvolvimento, durante a primeira metade da gestação, antes do funcionamento autónomo da tiroide fetal.⁽⁴⁹⁾

Como mencionado anteriormente, durante o segundo trimestre, o fornecimento das hormonas da tiroide para o desenvolvimento do feto são quase exclusivamente de origem materna, essenciais para a multiplicação neuronal, migração e organização; enquanto no terceiro trimestre, ocorre a multiplicação das células gliais, a migração e mielinização, o fornecimento das hormonas da tiroide são essencialmente de origem fetal. Portanto, enquanto o hipotiroidismo severo materno durante o segundo trimestre resultará em défices neurológicos irreversíveis, numa fase de desenvolvimento posterior, hipotiroidismo materno levará a danos menos graves, podendo, até, ser parcialmente reversível.⁽⁴⁹⁾ O neurodesenvolvimento fetal depende da geração local de T3 cerebral a partir de T4, por ação da D2. Assim sendo, perante hipotiroidismo materno, o cérebro de um feto hipotiroide está T3 deficiente, mesmo que os níveis de T3 materna e fetal em circulação sejam normais.⁽⁵⁶⁾

Efeito da Disponibilidade de iodo no Feto

Os efeitos de DI sobre o desenvolvimento do cérebro fetal e do recém-nascido têm despertado especial atenção dado que é considerada como sendo a causa mais comum de problemas mentais.⁽³³⁾ Nas áreas de DI moderada a grave, tanto a produção das hormonas de tiroide materna como fetal estão comprometidas, conduzindo a bócio e hipotiroidismo fetal, crescimento fetal reduzido, assim como a graves danos no desenvolvimento do cérebro fetal.^(31, 44) As consequências da DI dependem do estadio da gestação e da gravidade com que se manifesta o hipotiroidismo.⁽⁴⁴⁾

Quando a DI é ligeira a moderada, como mecanismo adaptativo e protetor para assegurar que os tecidos cerebrais têm um fornecimento adequado da T3, a atividade da D2 aumenta significativamente, enquanto a atividade da D3 diminui. Por outro lado, quando existe DI moderada a grave, os níveis da T4 e T3 no tecido fetal e cérebro fetal estão reduzidos. O nível baixo da T3 cerebral não é causado pela incapacidade da D2 para dar uma resposta à falta das hormonas, mas devido a um fornecimento de substrato T4 muito reduzido.⁽¹¹⁾ Consequentemente, uma DI grave durante a gravidez é a causa

mais frequente de hipotireoidismo congênito, podendo, por sua vez, resultar em cretinismo, uma forma irreversível de crescimento retardado e atraso mental.^(31, 62)

CONSEQUÊNCIAS DA DISFUNÇÃO DA TIROIDE NO RECÉM-NASCIDO

O recém-nascido de termo, sofre mudanças significativas a nível das concentrações das hormonas da tiroide e TSH, possivelmente como resposta a ajustes no sistema termorregulador para a vida extrauterina.⁽⁵⁷⁾ A TSH aumenta rapidamente atingindo um pico 30 minutos após o nascimento. Consequentemente, há um aumento da T4 até 2 vezes mais, acompanhada por um aumento de 8 vezes da T3, atingindo um pico entre as 24 e 36 horas.^(57, 63) Ainda durante a primeira semana, há uma diminuição gradual da T4 e T3, assim como uma diminuição lenta da TSH. Quanto aos recém-nascidos prematuros, durante as primeiras semanas de vida, os níveis das hormonas tendem a ser inferiores. Só às 3-8 semanas é que os níveis da T4 e T3 sobem para níveis encontrados em recém-nascidos de termo.⁽⁵⁷⁾

Os efeitos adversos do hipertireoidismo materno, durante a gravidez, sobre as crianças, a longo prazo, ainda não são muito claros. Através de estudos da avaliação da função da tiroide materna, sabe-se que o hipertireoidismo evidente materno não está associado à composição corporal infantil nem a manifestações cardiovasculares adversas assim como não há associação com a perturbação de hiperatividade e “Défice de Atenção” e perturbação do “Espectro Autista” em hipertireoidismo materno tratado, em comparação com mulheres sem disfunção da tiroide pré-existente.⁽⁵⁹⁾

Hipertireoidismo e Tirotoxicose no Recém-Nascido

Apesar de ser raro, cerca de 1-5% das crianças de mães com doença de Graves, sofrem de tirotoxicose neonatal.^(35, 60) Esta condição resulta da passagem transplacentária de concentrações significativamente elevadas de TSHrAb que estimulam os recetores de TSH da glândula da tiroide fetal.^(59, 60) Os anticorpos manifestam-se tipicamente entre os 7 e 10 dias de vida, após os efeitos protetores da medicação antitireoide de origem materna deixarem de estar presentes, devido ao tempo de meia-vida significativamente mais longo dos TSHrAb (21 dias).^(35, 38) À medida que a doença desaparece, os níveis de TSHrAb no soro diminuem.⁽⁷⁾

Relativamente a sinais e sintomas, manifestam um período transitório de bócio e oftalmopatia, acompanhadas de outras manifestações clínicas características da doença de Graves.⁽⁷⁾ Podem surgir alguns sinais não específicos, como irritabilidade/agitação, sono agitado, dificuldade na sucção e baixo ganho de peso, que podem dificultar a diferenciação dos comportamentos normais de um recém-nascido.⁽³⁸⁾

Hipotiroidismo no Recém-Nascido

Após o nascimento pré-termo, a TSH pode aumentar um pouco mas permanece abaixo do ponto de *cut-off*, de 20 mU/L, para o hipotiroidismo congénito.^(57, 64) Esta situação é geralmente referida como hipotiroidismo transiente do recém-nascido prematuro.⁽⁵⁷⁾ É a disfunção da tiroide mais comum nos prematuros, caracterizada por níveis de T4 e T3 temporariamente baixos e níveis de TSH normais ou baixos.^(11, 63) Níveis de T4 baixos, especialmente se persistentes, podem ser um fator negativo que contribui para um défice de desenvolvimento neurológico na função cognitiva e motora, enquanto níveis baixos de T3 está associado à redução de QI.^(15, 63) Estudos revelaram que hipotiroidismo materno não tratado, durante o segundo trimestre, está associado a uma perda de 7 pontos no QI de crianças com idade de 7-9 anos em comparação com crianças de mães eutiroides tratadas com T4.^(44, 46) Esta diferença deve-se à passagem transplacentária de T4 que tem um papel protetor sobre o cérebro fetal.^(46, 65)

A incidência de hipotiroxinémia aumenta com a diminuição do período de gestação do prematuro.⁽⁶⁶⁾ Assim, em recém-nascidos prematuros com 30-37 semanas, os níveis das hormonas da tiroide seguem um padrão semelhante ao dos recém-nascidos de termo. O mesmo não acontece para recém-nascidos prematuros de 30 semanas. O aumento da TSH é menos brusco, seguido por um pequeno aumento da T4 e um aumento mínimo da T3, durante as primeiras 24 horas.^(57, 63) Posteriormente, há uma queda dos níveis da fT4 até atingir o ponto mais baixo, aos 7 dias de vidas. Em resposta à fT4, a TSH aumenta, mas continua inferior a 20 mU/L. Por sua vez, a rT3 aumenta lentamente, atingindo os níveis normais de termo, por volta das 8 semanas de vida. Como resultado da escassez da T4, a rT3 está elevada, mostrando um declínio mais brusco durante as primeiras semanas.⁽⁵⁷⁾

Concentrações de TSH acima de 20 mU/L não estão associados a hipotiroidismo transiente, no entanto, deve suspeitar-se de hipotiroidismo congénito, quer permanente

quer transitório.⁽⁵⁷⁾ Esta disfunção atinge cerca de 1:3000/4000 nados vivos e é caracterizada pela deficiente estimulação da glândula da tiroide por uma produção inadequada de TSH, muitas vezes associada à imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide como acontece, por vezes, nos recém-nascidos prematuros, ou, então, devido a uma deficiência de iodo fetal.⁽⁶⁴⁾

Inicialmente, os sintomas de hipotiroidismo congénito são indeterminados, no entanto, a história clínica materna e da gravidez podem ajudar. Em 20% dos casos, a gestação estende-se para além das 42 semanas. Pode, também, encontrar-se evidências de doença da tiroide autoimune materna ou de uma dieta deficiente em iodo. Os neonatos geralmente manifestam um choro rouco, icterícia prolongada, letargia, têm dificuldade na sucção e obstipação. Por sua vez, podem apresentar hérnia umbilical, macroglossia e pele fria ao toque ou manchada. A nível ósseo, podem ter uma fontanela posterior ampla que, juntamente com icterícia persistente e dificuldade na sucção, são as características clínicas mais marcantes.⁽⁶⁵⁾ Algumas crianças com hipotiroidismo congénito podem apresentar um ligeiro bócio palpável que, normalmente, é encontrado em dishormonogénese da tiroide, onde há defeito na produção das hormonas.^(64, 65) Por outro lado, a existência de fenda palatina está associada a situações de disgenesia.⁽⁶⁴⁾

Devido às consequências potencialmente irreversíveis, ou com risco de vida, associadas à deficiência das hormonas da tiroide, a maturação pulmonar e o cérebro dos recém-nascidos prematuros têm recebido atenção especial.⁽¹⁵⁾ Estudos revelam que existe uma relação entre os baixos níveis de T4 e T3 e a síndrome de dificuldade respiratória nos prematuros. Crianças com níveis muito baixos de T4 na primeira semana de vida requerem mais tempo de hospitalização, com ventilação assistida. Ainda, em prematuros com níveis de T4 muito baixos, há um risco maior de hemorragias intraventricular, assim como um risco duas vezes superior de danos na substância branca cerebral com forma ecolucente. Nos casos mais severos, prematuros com níveis de fT4 muito baixos na primeira semana de vida estão associados a uma maior taxa de mortalidade.⁽⁵⁷⁾

Disponibilidade de Iodo no Recém-Nascido

Embora a DI possa ocorrer em qualquer idade, as consequências mais devastadoras acontecem no feto em desenvolvimento e durante a infância. Uma carência

de iodo durante a gravidez e durante a lactação é a principal causa para o atraso mental a nível mundial, devido ao fornecimento inadequado das hormonas da tiroide para o desenvolvimento do cérebro fetal ou neonatal.⁽⁶⁷⁾ Numa perspetiva mais global, a causa mais frequente de hipotireoidismo, incluindo a sua forma congénita, é a carência de iodo que atinge cerca de 1/3 da população mundial.⁽⁶⁴⁾ A partir de uma metanálise realizada em 1994, concluiu-se que a disfunção da tiroide, devido a DI, resultou em populações com uma média de QI 13,5 pontos inferior ao controlo, com disponibilidade de iodo suficiente.⁽⁶⁷⁾

Os casos de DI mais graves, resultam em crianças com hipotireoidismo congénito que, dependendo da severidade da DI, pode ter consequências severas no neurodesenvolvimento das crianças, com um atraso mental e alterações neurológicas, assim como outras anomalias físicas, manifestando-se como cretinismo endémico.^(31, 40, 45, 64)

O cretinismo pode ser neurológico ou mixedematoso. O cretinismo neurológico endémico, a forma mais comum, é caracterizado por problemas de audição e fala (surdos-mudos) e estrabismo.^(44, 46) A atividade motora voluntária pode estar comprometida, envolvendo diplegia espástica ou paralisia dos membros inferiores; distúrbios de postura, dificuldade de locomoção e ataxia. Geralmente, crianças com cretinismo neurológico são eutiroides mas, em alguns casos, podem apresentar bócio e hipotireoidismo.⁽⁴⁴⁾ Por sua vez, cretinismo mixedematoso, tipicamente encontrado em África, pode ser explicado pelo fato de nesta zona de DI também estar associada uma deficiência em selénio. A deficiência em selénio resulta numa acumulação de peróxido na glândula da tiroide hiperestimulada e o excesso de peróxido induz a destruição das células da tiroide, conduzindo à fibrose do parênquima e hipotireoidismo.⁽⁴⁰⁾ É caracterizado, ainda, por nanismo, mixedema, pele seca e engrossada, escassez de cabelo e unhas quebradiças, voz profunda e rouca, atraso pubertário, maturação esquelética retardada, músculos abdominais fracos, função intestinal pobre e reflexos dos tendões lentos. A maturação do rosto é anormal, com olhos grandes, nariz em sela com maturação tardia da configuração naso-orbital, atrofia mandibular e lábios engrossados.^(40, 44)

A ingestão de iodo dos recém-nascidos é inteiramente dependente do teor de iodo de leite materno e complementos lácteos. Se a mãe tem um aporte nutricional de iodo adequado, o leite materno é a melhor fonte de iodo para o recém-nascido.⁽¹⁵⁾ Nesta

condição, há uma conversão aumentada da T4 em T3 mediada pela atividade da D2 cerebral. No entanto, quando a mulher sofre DI ligeira a moderada a atividade da D2 está significativamente aumentada, enquanto a atividade da D3 nestas circunstâncias está diminuída.⁽¹¹⁾ Assim sendo, nos grupos vulneráveis, como mulheres grávidas e recém-nascidos, em regiões de disponibilidade de iodo insuficiente, a suplementação de iodo é essencial para evitar os muitos efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento fetal e neonatal.⁽⁴⁴⁾

DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

HIPERTIROIDISMO

O uso de ultrassonografia pode ser útil na diferenciação entre um processo inflamatório/autoimune de um nódulo tóxico.⁽³⁷⁾ O diagnóstico de hipertiroidismo pode ser facilmente confirmado por testes bioquímicos adequados e simples. Regra geral, mulheres com sintomas clínicos significativos de hipertiroidismo apresentam níveis de TSH inferiores a 0,1 mU/L, bem como níveis de fT4 e T3 séricos elevados. No primeiro trimestre, a concentração de TSH pode estar transitoriamente suprimida em 10-20% de mulheres eutiroides, com valores inferiores a 0,2 mU/L, no momento do pico de hCG. Durante este período, o grau e a duração de supressão de TSH devem ser consideradas para o diagnóstico. Por outro lado, a presença de anticorpos deve alertar o clínico para a possibilidade de doença da tiroide ser de origem autoimune.⁽⁴⁹⁾ TSHrAb são específicos de doença de Graves de modo que se não estiverem presentes é pouco provável o seu diagnóstico.⁽³⁷⁾

O tratamento ideal deve garantir que a mulher esteja clinicamente e bioquimicamente eutiroides antes e durante a gravidez.⁽³⁸⁾ Para o tratamento de hipertiroidismo existe várias opções, desde fármacos, cirurgia ou radioiodoterapia. A cirurgia é reservada, normalmente, para o segundo trimestre, para os casos que necessitem de doses muito elevadas de medicação, em que haja suspeita ou diagnóstico definitivo de carcinoma da tiroide, ou bócio a restringir as vias aéreas.^(38, 46) A radioiodoterapia, durante a gravidez, é contraindicada dado que o iodo radioativo atravessa a placenta e danifica permanentemente a tiroide fetal.^(36, 38) No entanto, caso seja necessário recorrer à radioiodoterapia, no período pós-natal, a amamentação deve ser cessada algum tempo antes de iniciar a terapia, de modo a minimizar a absorção de

radioatividade nos seios e, assim, reduzir a possibilidade de dar leite com iodo radioativo ao recém-nascido. Por fim, a terapia farmacológica é a mais recomendada durante a gravidez. No tratamento de hipertireoidismo são normalmente usados propiltiouracil (PTU), metimazol (MMZ) e carbimazol (CMZ - um precursor do MMZ).⁽³⁸⁾

Todas estas tioamidas inibem a produção de hormonas da tiroide, reduzindo a utilização do iodo e o acoplamento de moniodotirosinas e diiodotirosinas, sem acelerar a degradação das hormonas que, por sua vez, levam entre 3-4 semanas até diminuírem em circulação.⁽³⁸⁾ O CMZ e MMZ inibem a tiroperoxidase, reduzindo a síntese de T4 e T3. Por sua vez, o PTU bloqueia a D1 evitando que a T4 se converta na sua forma biologicamente ativa, T3.⁽³⁷⁾ Têm ainda um efeito imunossupressor, reduzindo o título de TSHrAb, influenciando diretamente o desenvolvimento da doença de Graves.⁽⁴⁶⁾ Como o título de TSHrAb diminui durante a gravidez, as doses de medicação podem ser reduzidas ou até eliminadas reduzindo a possibilidade hipotireoidismo fetal. No período pós-parto, a maioria das mulheres retoma a dose de pré-gravidez.⁽³⁸⁾

As tioamidas atravessam a barreira transplacentária, podendo, deste modo, afetar a função tiroideia do feto.⁽⁴⁹⁾ O PTU é mais solúvel em água sendo que apenas uma pequena quantidade é transferida da circulação materna para fetal e, conseqüentemente, apenas 0,0025 - 0,077% de PTU é transferida para o leite materno, em comparação com os 0,47% de CMZ.^(36, 38, 46) A não ser que seja necessário uma terapêutica dirigida, também, para a supressão da função da tiroide fetal, há preferência no uso de PTU em relação a CMZ e MMZ.⁽⁴⁹⁾ O objetivo do tratamento é controlar os sintomas da tirotoxicose materna com a menor dose possível e, assim, evitar o hipertireoidismo fetal e neonatal.⁽³⁸⁾ Este risco pode ser minimizado assegurando que a dose mínima do tratamento é usado para manter as hormonas da tiroide livres materna no terço superior do intervalo normal para a grávidas.⁽³⁷⁾

A terapêutica com PTU e CMZ pode causar hipotireoidismo no feto ou recém-nascido, não estando este risco diretamente correlacionado com a dose ministrada dosagem. Dado que não inibem a atividade de D2 ou D3, os níveis intracelulares normais de T3 são mantidas no cérebro fetal em desenvolvimento, desde que haja iodo suficiente disponível. Aproximadamente 10-20% dos recém-nascidos, com mãe em tratamento no momento do parto, apresentam hipotireoidismo transitório assintomático

que pode mascarar hipertiroidismo neonatal, enquanto 1-2% dos recém-nascidos apresentam pequenos bócio.^(46, 49)

A doença de Graves materna pode afetar o feto uma vez que o aumento precoce de TSHrAb na gestação e a não redução do título dos anticorpos no segundo trimestre, pode constituir um risco de hipertiroide fetal e neonatal.⁽⁴⁹⁾ A avaliação da função da tiroide materna e TSHrAb ao longo da gravidez, sobretudo no último trimestre, é fundamental para prever quais serão as crianças com maior probabilidade de vir a apresentar hipertiroidismo neonatal transitório.⁽⁶⁰⁾ Este risco pode ser avaliado através da detecção de bócio fetal com ultrassonografia e de taquicardia com batimentos superiores a 160 bpm, entre outros sinais e sintomas mencionados anteriormente. Em situações raras, pode ser necessário uma colheita de sangue do cordão umbilical para o diagnóstico ou monitorização da terapia. Quando a taquicardia fetal é persistente, deve iniciar-se a terapia antitiroide com PTU ou MMZ na mãe para manter o eutiroidismo materno e fetal.⁽⁴⁹⁾ O tratamento do recém-nascido inclui os mesmos fármacos utilizados durante a gravidez. Em alguns casos pode ser utilizado um bloqueador β -adrenérgico, como o propranolol, para controlo da taquicardia. Com uma terapêutica adequada, a maioria dos recém-nascidos melhora rapidamente, permitindo uma suspensão progressiva dos fármacos.⁽⁶⁰⁾

No caso de hipertiroidismo gestacional, o foco da terapia é corrigir os desequilíbrios metabólicos provocado pelos vômitos prolongados e tentar minimizar os vômitos. Neste caso, uma terapêutica antitiroide não é recomendada, uma vez que não há um aumento intrínseco da atividade da tiroide. As drogas antitiroide iriam atravessar a placenta com o potencial de tornar o feto hipotiroide. Quando a tirotoxicose associada a hCG está tratada, uma terapêutica antitiroide é ineficaz ou, então, requer doses muito elevadas.⁽³⁶⁾

HIPOTIROIDISMO

No diagnóstico de disfunções da tiroide, além dos testes bioquímicos, a ecografia é um exame complementar inócuo e facilmente acessível, com uma maior precisão com a utilização simultânea do *doppler*. Permite definir com maior exatidão a localização, bem como as dimensões e características da tiroide que nem sempre são passíveis de ser avaliadas pela simples palpação, principalmente no recém-nascido.⁽⁶⁴⁾

Se o hipotireoidismo é diagnosticado durante a gravidez, é importante repor rapidamente o eutireoidismo com administração de levotiroxina (LT4). Esta estratégia é muito importante, durante o primeiro trimestre, para diminuir o risco de aborto espontâneo, assim como fornecer a quantidade adequada de T4 para o desenvolvimento do cérebro fetal. Após o parto, a toma de LT4 é reduzida para níveis de pré-gravidez e, posteriormente, a função da tireoide deve ser monitorizada.⁽⁴⁸⁾ Por outro lado, as mulheres diagnosticadas com hipotireoidismo antes de engravidar, já estão com uma dose de LT4 estável e estão bioquimicamente eutireoides. Durante este período, onde as náuseas e vômitos são comuns, deve minimizar-se qualquer omissão da dose.⁽³⁸⁾ Geralmente, necessitam de um aumento da dosagem de tiroxina. Idealmente, o aumento deve ser feito antes das 12 semanas de gestação, para garantir o fornecimento de T4 suficiente para o desenvolvimento do cérebro fetal, antes do início da função pituitária-tireoide fetal.⁽³⁸⁾ Mesmo após o nascimento, a toma de LT4 é segura durante a lactação.⁽³⁸⁾

Em mulheres com hipotireoidismo devido a tireoidectomia total, após diagnóstico de carcinoma da tireoide, a administração de levotiroxina tem como objetivo suprimir totalmente a TSH, para reduzir o risco de recorrência de carcinoma.⁽³⁷⁾ Nestes casos, de acordo com o oncologista, pode ser necessário aumentar a dose para manter a supressão completa mas, atendendo que apenas pequenas quantidades de T4 atravessam a barreira transplacentária, o feto não está em risco de tirotoxicose.^(37, 38) Por outro lado, mulheres com hipotireoidismo autoimune não costumam precisar de alterar a sua dose de medicação.⁽³⁸⁾

Para medir concentrações de iodotironinas muito baixas em tecidos fetais são necessários métodos de extração adequadas que permitam a purificação e determinação por radioimunoensaio sensível e específico. A maioria dos métodos disponíveis comercialmente desenvolvidos para o soro humano não são adequados para as concentrações muito baixas encontradas até meados da gestação no soro fetal humano, obtido após aborto terapêutico ou por cordocentese.⁽⁵⁶⁾

A carência de hormonas da tireoide, particularmente nas formas severas de hipotireoidismo congénito, pode ter consequências severas no desenvolvimento intelectual das crianças. O diagnóstico precoce e o tratamento com levotiroxina permitem evitar as sequelas graves da doença, em particular as suas repercussões neurológicas.⁽⁶⁴⁾

Nos países com programas de triagem neonatal, todas as crianças com hipotireoidismo congénito são diagnosticados por meio de testes de triagem neonatal. Nos recém-nascidos em locais sem programas de triagem neonatal, o diagnóstico pode ser feito após o desenvolvimento de manifestações clínicas de hipotireoidismo.⁽⁶¹⁾ Na década de 60, Robert Guthrie desenvolveu um método laboratorial fácil e acessível para medição da fenilalanina numa amostra de sangue total, colhida em papel de filtro. Com este método, mais conhecido como “teste do pezinho”, o sangue é obtido através da punção cutânea do calcanhar do recém-nascido. Além do rastreio da fenilcetonúria, o teste do pezinho está, também, adaptado para o rastreio de hipotireoidismo congénito, que é cerca de 3-4 vezes mais frequente do que a fenilcetonúria. Esta metodologia foi adotada pela maioria dos países dado que contribuiu para a erradicação do atraso mental grave, como cretinismo, assim como o rastreio de outras doenças congénitas endócrinas e metabólicas. Geralmente, dado que a permanência pós-parto é cada vez mais curta, a colheita tem vindo a ser efetuada entre o terceiro e o sexto dia de vida, por vezes mais cedo; embora idealmente a colheita deva ser feita entre o sexto e o décimo dia. Além disso, a necessidade de antecipar a data da colheita, para o intervalo entre o terceiro e o sexto dia, está relacionada com o fato de, quanto mais cedo se diagnosticar e iniciar a terapêutica, melhor será o prognóstico da doença.⁽⁶⁴⁾

Em Portugal, o valor limite da TSH é de 20 mU/L. Acima deste valor, a suspeita de hipotireoidismo congénito é elevada e o recém-nascido é imediatamente referenciado. Valores de TSH inferiores a 10 mU/L são considerados normais; enquanto valores entre 10-20 mU/L é considerado suspeito e exige a determinação da T4 total na mesma amostra. Se a T4 for inferior a 6,5 µg/dL, confirma-se a suspeita de hipotireoidismo e o recém-nascido é então referenciado. Perante a suspeita de hipotireoidismo congénito, avalia-se a função tiroideia (TSH e fT4) numa amostra de sangue. Confirmada a suspeita, inicia-se de imediato o tratamento com LT4.⁽⁶⁴⁾

DISPONIBILIDADE DE IODO

Estima-se que a deficiência de iodo afete aproximadamente 1,880 bilhões de pessoas no mundo e podendo resultar em cretinismo irreversível, complicações na gravidez, bócio endémico, produção das hormonas da tiroide comprometida, deficiência mental e diminuição da função cognitiva.⁽⁶⁷⁾ Em Portugal continental, estudos recentes em grávidas seguidas em maternidades e crianças das escolas demonstraram que o

aporte de iodo está longe de atingir os valores referidos pela OMS.⁽⁶⁸⁾ Assim sendo, há necessidade de um teste simples, prático e económico para monitorizar os níveis de iodo na urina.⁽⁶⁷⁾ Em Portugal, o aporte insuficiente de iodo reflete-se sobretudo nas grávidas, o que será de esperar tendo em conta o aumento das necessidades em hormonas da tiroide e, consequentemente, em iodo. Na prática, o aporte de iodo é avaliado mediante o estudo da eliminação urinária, geralmente, numa amostra de urina ocasional.⁽⁶⁸⁾ A concentração de iodo urinário é um indicador preciso do aporte de iodo uma vez que 90% do iodo ingerido é eliminado na urina em 24 horas. Mesmo em áreas com uma adequada ingestão de iodo, uma proporção significativa das mulheres grávidas têm concentração de iodo urinário abaixo dos níveis recomendados.⁽³¹⁾ De acordo com a OMS e ICCIDD, considera-se um aporte adequado (Tabela 50), nas grávidas, iodúrias iguais ou superiores a 150 µg/L. Nas crianças, considera-se um aporte adequado, iodúrias iguais ou superiores a 100 µg/L. Valores inferiores a 20 µg/L são considerados muito baixos, entre 20-50 µg/L é moderadamente baixo e entre 50-100 µg/L é ligeiramente baixo.^(68, 69)

Tabela 50 - Limites para suficiência de iodo numa população baseado na média da concentração de iodo urinário.⁽⁶⁹⁾

	Grávidas (µg/L)	Lactação (µg/L)	Crianças < 2 anos (µg/L)
Insuficiente	< 150	< 100	< 100
Adequado	≥ 150	≥ 100	≥ 100

Um dos sintomas clínicos mais comum de DI é a presença de bócio, com uma prevalência de 5% na população. Bócio pode ser avaliado por palpação ou ultrassonografia. Em DI ligeira a moderada, as pequenas alterações no volume da tiroide são difíceis de detetar por palpação, de modo que a ultrassonografia é mais objetiva e sensível para a medição do volume da tiroide.⁽⁴⁵⁾

Mais de 52% da população na Europa têm uma ingestão insuficiente de iodo.⁽³⁸⁾ Estudos realizados em áreas com DI ligeiro na Europa, revelaram um aumento na eliminação urinária de iodo e redução do volume da tiroide com a suplementação de iodo.⁽⁶²⁾ Atualmente a OMS recomenda para mulheres grávidas e lactantes uma ingestão de 250 µg/dia de iodo, a fim de manter níveis adequados de tiroxina.⁽³⁸⁾

O desenvolvimento do cérebro inicia-se cedo na vida fetal, de modo que quantidades suficientes de iodo, consumido por gestantes, numa fase inicial da gravidez, têm um efeito positivo sobre o desenvolvimento fetal. A suplementação materna de iodo

tem um impacto positivo sobre o QI de crianças que vivem em áreas onde a DI é comum. Um estudo realizado no Zaire revelou que crianças, de 6 anos de idade, de mães suplementadas com iodo durante a gravidez tinham mais 10 pontos de QI do que crianças de mães não suplementados.⁽⁶²⁾ Em áreas com programas de sal iodado, apesar das mulheres não grávidas terem uma ingestão adequada de iodo, a maioria das mulheres grávidas mostram uma ingestão insuficiente de iodo. Assim sendo, é importante monitorizar o aporte de iodo durante a gestação e recomenda-se a suplementação de iodo durante a gravidez.⁽³¹⁾

CONCLUSÃO

Durante a gravidez, a mulher sofre alterações hormonais e fisiológicas que requer um aumento na produção das hormonas totais, de modo a alcançar um novo equilíbrio que deve ser mantido até ao parto. As hormonas da tiroide têm um papel importante no crescimento e desenvolvimento fetal, prolongando-se desde cedo no período embrionário até depois do nascimento. Durante a primeira metade da gestação, o feto está protegido de níveis baixos de T4 graças à transferência transplacentária de T4 materna que satisfaz inteiramente as suas necessidades. Para assegurar a quantidade mínima de hormonas da tiroide para o feto, a D2 e D3 apresentam uma especificidade espacial e temporal, que controlam a passagem das hormonas, mesmo com o funcionamento autónomo da tiroide fetal. A capacidade de produzir hormonas fetais inicia-se às 8 - 10 semanas de gestação, no entanto a síntese e secreção controlada pela TSH só acontece a partir do segundo trimestre.

Ao longo da vida fetal, a T3 e fT3 estão reduzidas, enquanto a T4 e fT4 aumentam com o avançar da gestação atingindo a concentração materna no terceiro trimestre. Após o nascimento, a TSH, T4 e T3 do recém-nascido de termo aumentam abruptamente criando um estado hipertiroide transitório. No entanto, nos prematuros, dado que as concentrações são inferiores, é frequente o aparecimento de hipotiroidismo transiente do prematuro. A incidência de hipotiroxinémia aumenta com a diminuição do tempo de gestação do prematuro.

Atendendo aos diferentes estadios da gestação, uma disfunção da tiroide materna vai afetar o feto de forma diferente bem como o tratamento a implementar. Como mecanismo de regulação das iodotironinas desiodinase, perante hipertiroidismo materno, a D3 está elevada, enquanto, numa situação de hipotiroidismo materno o aumento ocorre na D2. As concentrações elevadas de hCG podem induzir, frequentemente, hipertiroidismo gestacional transiente no primeiro trimestre, enquanto a doença de Graves, se não for tratada adequada e atempadamente, pode ter repercussões graves na mulher e no feto. A passagem transplacentária de TSHrAb materno, após as 24 semanas de gestação, estimula a glândula da tiroide fetal, causando hipertiroidismo fetal, assim como, quando em tratamento, a passagem de tioamidas maternas podem causar hipotiroidismo fetal. Hipotiroidismo primário ou subclínico materno sem reposição de T4, no primeiro trimestre, poderá refletir-se na criança ao apresentar um QI reduzido. Muitas vezes, o hipotiroidismo nas grávidas está associado à carência

acentuada de iodo. Durante a gestação, a deficiência de iodo moderada a severa é potencialmente mais nefasta, aumentando os riscos de abortos espontâneos e mortalidade infantil. Crianças de mães com deficiência de iodo estão em risco de deficiência cognitiva, que se pode revelar em dificuldade na aprendizagem escolar, sendo o cretinismo a manifestação mais severa.

Tendo como objetivo manter o eutiroidismo da grávida e minimizar os efeitos adversos, o diagnóstico correto e atempado é muito importante para o início precoce do tratamento adequado, que pode incluir, em muitas situações, a suplementação de iodo.

BIBLIOGRAFIA

1. Lee JH, Anzai Y. Imaging of thyroid and parathyroid glands. *Semin Roentgenol.* 2013;48(1):87-104.
2. McPhee SJ, Ganong WF. Doença da Tireoide. *Fisiopatologia da Doença - Uma Introdução à Medicina Clínica.* 5ª ed. Brasil: McGraw-Hill; 2007. p. 484-500.
3. Campbell ID. Thyroid and parathyroid hormones and calcium homeostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2011;12(10):465-8.
4. Burtis CA, Ashwood ER, Brunis DE. Thyroid Disorders. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 766-9.
5. Mihai R. Physiology of the pituitary, thyroid and adrenal glands. *Surgery.* 2011;29(9):419-27.
6. Dunn JT, Dunn AD. The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis. *Biochimie.* 1999;81(5):505-9.
7. Little JW. Thyroid disorders. Part I: hyperthyroidism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):276-84.
8. Balucan FS, Morshed SA, Davies TF. Thyroid autoantibodies in pregnancy: their role, regulation and clinical relevance. *J Thyroid Res.* 2013;2013:182472.
9. Trumpff C, De Schepper J, Tafforeau J, Van Oyen H, Vanderfaeillie J, Vandevijvere S. Mild iodine deficiency in pregnancy in Europe and its consequences for cognitive and psychomotor development of children: A review. *J Trace Elem Med Biol.* 2013.
10. Ahmed OM, El-Gareib AW, El-bakry AM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Thyroid hormones states and brain development interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2008;26(2):147-209.
11. Darras VM, Hume R, Visser TJ. Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):37-47.
12. LaFranchi S. Thyroid hormone in hypopituitarism, Graves' disease, congenital hypothyroidism, and maternal thyroid disease during pregnancy. *Growth Horm IGF Res.* 2006;16 Suppl A:S20-4.
13. Leung AM. Thyroid function in pregnancy. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(2-3):137-40.
14. Chistiakov DA. Thyroid-stimulating hormone receptor and its role in Graves' disease. *Mol Genet Metab.* 2003;80(4):377-88.
15. Ares S, Quero J, de Escobar GM. Iodine balance, iatrogenic excess, and thyroid dysfunction in premature newborns. *Semin Perinatol.* 2008;32(6):407-12.
16. Safford SD, Skinner MA. Thyroid and parathyroid disease in children. *Semin Pediatr Surg.* 2006;15(2):85-91.
17. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S, et al. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010;24(1):13-27.
18. Loevner LA. Imaging of the thyroid gland. *Semin Ultrasound CT MR.* 1996;17(6):539-62.
19. Pimentel L, Hansen KN. Thyroid disease in the emergency department: A clinical and laboratory review. *The Journal of Emergency Medicine.* 2005;28(2):201-9.
20. Biondi B. Natural history, diagnosis and management of subclinical thyroid dysfunction. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2012;26(4):431-46.
21. Little JW. Thyroid disorders. Part II: hypothyroidism and thyroiditis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2006;102(2):148-53.

22. Intenzo CM, Dam HQ, Manzone TA, Kim SM. Imaging of the Thyroid in Benign and Malignant Disease. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2012;42(1):49-61.
23. Juliano AF-Y, Cunnane MB. Benign Conditions of the Thyroid Gland. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2012;33(2):130-7.
24. Abe T, Suzuki T, Unno M, Tokui T, Ito S. Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2002;13(5):215-20.
25. Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse Med*. 2012;41(12 P 2):e611-25.
26. McManus C, Luo J, Sippel R, Chen H. Is thyroidectomy in patients with Hashimoto thyroiditis more risky? *Journal of Surgical Research*. 2012;178(2):529-32.
27. Öztürk Ü, Vural P, Özderya A, Karadağ B, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Oxidative stress parameters in serum and low density lipoproteins of Hashimoto's thyroiditis patients with subclinical and overt hypothyroidism. *International Immunopharmacology*. 2012;14(4):349-52.
28. Zantour B, Sfar MH, Alaya W, Chebbi W, Chatti K, Jerbi S. Hashimoto's thyroiditis and severe hypothyroidism, associated with a single hot nodule. *Revista Española de Medicina Nuclear*. 2011;30(5):317-9.
29. Müssig K, Künle A, Säuberlich A-L, Weinert C, Ethofer T, Saur R, et al. Thyroid peroxidase antibody positivity is associated with symptomatic distress in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012;26(4):559-63.
30. Wormer BA, McHenry CR. Hashimoto's thyroiditis: Outcome of surgical resection for patients with thyromegaly and compressive symptoms. *The American Journal of Surgery*. 2011;201(3):416-9.
31. Marchioni E, Fumarola A, Calvanese A, Piccirilli F, Tommasi V, Cugini P, et al. Iodine deficiency in pregnant women residing in an area with adequate iodine intake. *Nutrition*. 2008;24(5):458-61.
32. Andersson M, de Benoist B, Rogers L. Epidemiology of iodine deficiency: Salt iodisation and iodine status. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;24(1):1-11.
33. de Lima LF, Barbosa Júnior F, Navarro AM. Excess ioduria in infants and its relation to the iodine in maternal milk. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2013;27(3):221-5.
34. Cotzias C, Wong SJ, Taylor E, Seed P, Girling J. A study to establish gestation-specific reference intervals for thyroid function tests in normal singleton pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;137(1):61-6.
35. Girling J, Cotzias C. Thyroid and other endocrine disorders in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2007;17(12):349-55.
36. Girling J. Thyroid disease in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2008;18(10):259-64.
37. Girling J, Martineau M. Thyroid and other endocrine disorders in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2010;20(9):265-71.
38. Girling J, Sykes L. Thyroid disorders and other endocrinological disorders in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2013;23(6):171-9.
39. Ghassabian A, Henrichs J, Tiemeier H. Impact of mild thyroid hormone deficiency in pregnancy on cognitive function in children: Lessons from the Generation R Study. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. (0).
40. Glinoe D. The regulation of thyroid function during normal pregnancy: importance of the iodine nutrition status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2004;18(2):133-52.
41. Fister P, Gaberscek S, Zaletel K, Krhin B, Hojker S, Gersak K. Thyroid function in the third trimester of pregnancy and after delivery in an area of adequate iodine intake. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2011;112(1):52-5.

42. Feldt-Rasmussen U, Mathiesen ER. Endocrine disorders in pregnancy: Physiological and hormonal aspects of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;25(6):875-84.
43. Hershman JM. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;18(2):249-65.
44. Zimmermann MB. The role of iodine in human growth and development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2011;22(6):645-52.
45. Skeaff SA. Assessing iodine intakes in pregnancy and strategies for improvement. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2012;26(2-3):141-4.
46. Girling JC. Thyroid disorders in pregnancy. *Current Obstetrics & Gynaecology*. 2006;16(1):47-53.
47. Fister P, Gaberšček S, Zaletel K, Krhin B, Geršak K, Hojker S. Thyroid volume changes during pregnancy and after delivery in an iodine-sufficient Republic of Slovenia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009;145(1):45-8.
48. Negro R, Mestman JH. Thyroid disease in pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(6):927-43.
49. Glinoe D. Management of hypo- and hyperthyroidism during pregnancy. *Growth Hormone & IGF Research*. 2003;13, Supplement(0):S45-S54.
50. Glinoe D. The Systematic Screening and Management of Hypothyroidism and Hyperthyroidism During Pregnancy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1998;9(10):403-11.
51. Öztürk Arslan E, Cengiz L, Arslan M. Thyroid function in hyperemesis gravidarum and correlation with serum leptin levels. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2003;83(2):187-8.
52. Leylek ÖA, Çetin A, Toyaksi M, Erselcan T. Hyperthyroidism in hyperemesis gravidarum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 1996;55(1):33-7.
53. Tsang IS, Katz VL, Wells SD. Maternal and fetal outcomes in hyperemesis gravidarum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 1996;55(3):231-5.
54. Tahboub R, Arafah BM. Sex steroids and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;23(6):769-80.
55. Olivares JL, Olivi GI, Verdasco C, Ortiz VA, Mayer MA, Cresto JC. Low iodine intake during pregnancy: Relationship to placental development and head circumference in newborn. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2012;59(5):326-30.
56. Escobar GMD, Obregón MaJ, Rey FED. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;18(2):225-48.
57. Kok JH, Briet JM, van Wassenae AG. Postnatal thyroid hormone replacement in very preterm infants. *Seminars in Perinatology*. 2001;25(6):417-25.
58. van Wassenae AG, Kok JH. Hypothyroxinaemia and thyroid function after preterm birth. *Seminars in Neonatology*. 2004;9(1):3-11.
59. Labadzhyan A, Brent GA, Hershman JM, Leung AM. Thyrotoxicosis of pregnancy. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*. 2014;1(4):140-4.
60. Jerónimo M, Moinho R, Nunes Vicente I, Oliveira A, Dias A, Mimoso G, et al. Hipertiroidismo neonatal transitório. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2014;9(2):157-61.
61. Cattani D, Goulart PB, Cavalli VLdLO, Winkelmann-Duarte E, dos Santos AQ, Pierozan P, et al. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and

morphological parameters in the hippocampus of developing rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;375(1–2):14-26.

62. Melse-Boonstra A, Gowachirapant S, Jaiswal N, Winichagoon P, Srinivasan K, Zimmermann MB. Iodine supplementation in pregnancy and its effect on child cognition. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2012;26(2–3):134-6.

63. Williams FLR, Visser TJ, Hume R. Transient hypothyroxinaemia in preterm infants. *Early Human Development*. 2006;82(12):797-802.

64. Rodrigues AL, Carvalho A, Pereira Duarte C, César R, Anselmo J. Hipotireoidismo congénito. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2014;9(1):41-52.

65. Maynika VR, Stephen HL. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:17-.

66. van den Hove MF, Beckers C, Devlieger H, de Zegher F, De Nayer P. Hormone synthesis and storage in the thyroid of human preterm and term newborns: Effect of thyroxine treatment. *Biochimie*. 1999;81(5):563-70.

67. Zava TT, Kapur S, Zava DT. Iodine and creatinine testing in urine dried on filter paper. *Analytica Chimica Acta*. 2013;764(0):64-9.

68. Limbert E, Prazeres S, Madureira D, Miranda A, Ribeiro M, Abreu FS, et al. Aporte do iodo nas Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2012;7(2):2-7.

69. Leung AM, Pearce EN, Braverman LE. Iodine Nutrition in Pregnancy and Lactation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2011;40(4):765-77.

ANEXOS

ANEXO 1 - Número de amostras de hemoculturas.

O número de amostras de hemoculturas a efetuar depende do diagnóstico clínico provável.

Suspeita	Hemoculturas	Considerações
Sépsis aguda Meningite Osteomielite Artrite Sépsis de pneumonia não tratada	2 a 3	De locais diferentes, antes de iniciar a terapêutica.
Síndrome febril	3	Quando de etiologia desconhecida, como brucelose, salmonelose, abscesso oculto, entre outros, faz-se 2 colheitas iniciais e uma terceira 24 a 36h depois.
Endocardite aguda	3	Picadas separadas, com intervalos de 1 a 2h e antes de iniciar a terapêutica
Endocardite subaguda	3	Colheitas com intervalos de 15 minutos. Se forem negativas às 24h, colhe-se mais três hemoculturas no dia seguinte.

Doentes com terapêutica antimicrobiana instituída há duas ou três semanas e com infecção de etiologia desconhecida, são colhidas duas hemoculturas por dia, imediatamente antes da toma do medicamento, durante três dias consecutivos.

ANEXO 2 - Canal IMI - Detecção RF/DC

Este canal usa o RF/DC como método de detecção. A amostra de sangue é aspirada, diluída (1:250) e enviada para a câmara de detecção. No seu interior existe um pequeno orifício ladeado por dois elétrodos onde passa corrente contínua (DC) e rádio-frequência (RF). As células suspensas em reagente hemolítico atravessam o orifício, alterando as correntes. O tamanho das células vai alterar a DC enquanto RF é alterada pela estrutura e densidade celular. Estas alterações são detetadas e registadas sob a forma de impulsos elétricos. Assim, atendendo à amplitude de cada impulso (Figura i), o detetor combina os métodos de modo a formar-se um diagrama de dispersão, refletindo o tamanho e densidade celular simultaneamente.

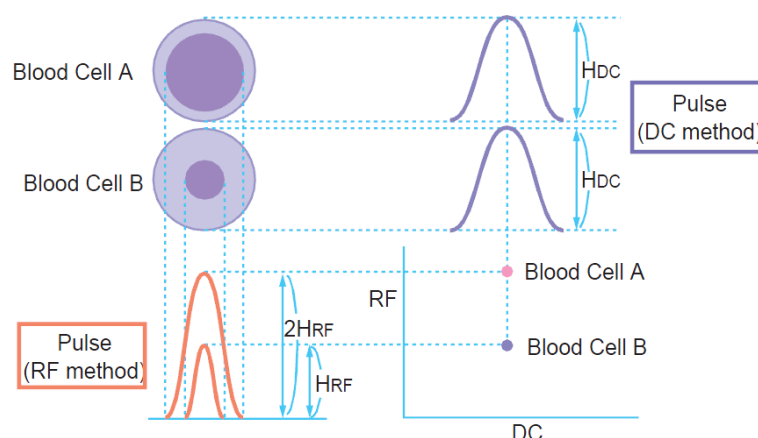


Figura i - Relação entre o impulso elétrico no método de detecção RF/DC e a sua distribuição no diagrama de dispersão.

ANEXO 3 - Canal RBC/PLT - Focagem Hidrodinâmica

O canal RBC/PLT faz a contagem e determina o tamanho dos eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT) usando os métodos de impedância e Focagem Hidrodinâmica (HDF).

A amostra é diluída (1:500) e à medida que as partículas são injetadas, o fluxo envolve a coluna de partículas (*front sheath fluid*), sob ligeira pressão, de modo a alinhá-las partícula a partícula permitindo a sua passagem pelo orifício (Figura ii).

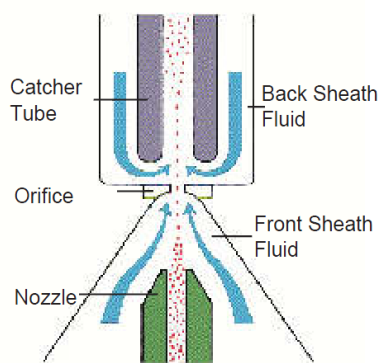


Figura ii - Diagrama esquemático do método de detecção por Focagem Hidrodinâmica.

Após atravessar o orifício, a amostra é envolvida novamente por reagente (*back sheath*) para o tubo de recuperação de modo a evitar o retorno da amostra e de gerar impulsos artificiais. Este método melhora a exatidão da contagem das células sanguíneas e reprodutibilidade.

ANEXO 4 - Canal HBG – Método de SLS-Hb

O canal HBG usa o método de SLS-Hb para determinação da hemoglobina. A amostra é aspirada e diluída (1:500). Na presença do reagente hemolítico dá-se a lise dos eritrócitos (Figura iii), a alteração da conformação da molécula de globina, a oxidação do ferro e finalmente a formação do complexo SLS-Hb.

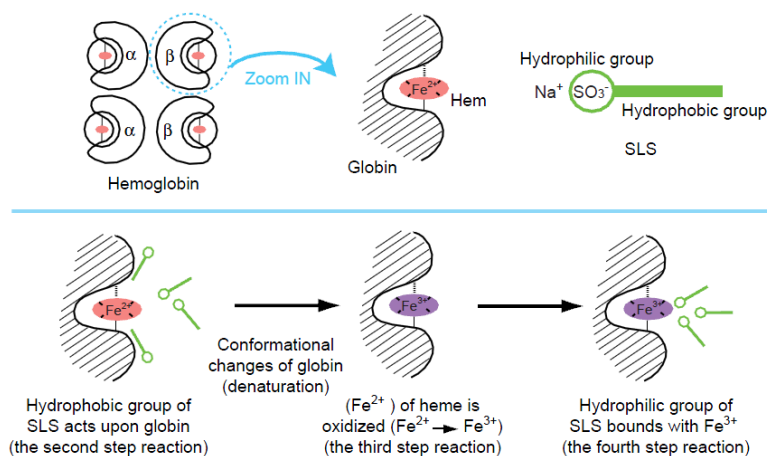


Figura iii - Mecanismo de reação do método SLS-Hb.

O produto final é um composto colorido que é medido espectrofotometricamente pela leitura da absorvância do pico a 535 nm e do pico adjacente a 560 nm.

ANEXO 5 - Canal 5Diff, WBC/BASO, NRBC e RET/PLT-O - Citometria de Fluxo por Laser Semicondutor

Os canais 5Diff, WBC/BASO, NRBC e RET/PLT-O usam como método de detecção a Citometria de Fluxo por Laser Semicondutor. É considerado um dos melhores métodos para a determinação de populações celulares, analisando características fisiológicas e químicas das células. Adaptou-se à técnica de citometria de fluxo a utilização do corante de polimetina, altamente específico.

O feixe de laser semicondutor é emitido para as células sanguíneas que passam na câmara de fluxo, separando-as usando três sinais (Figura iv):

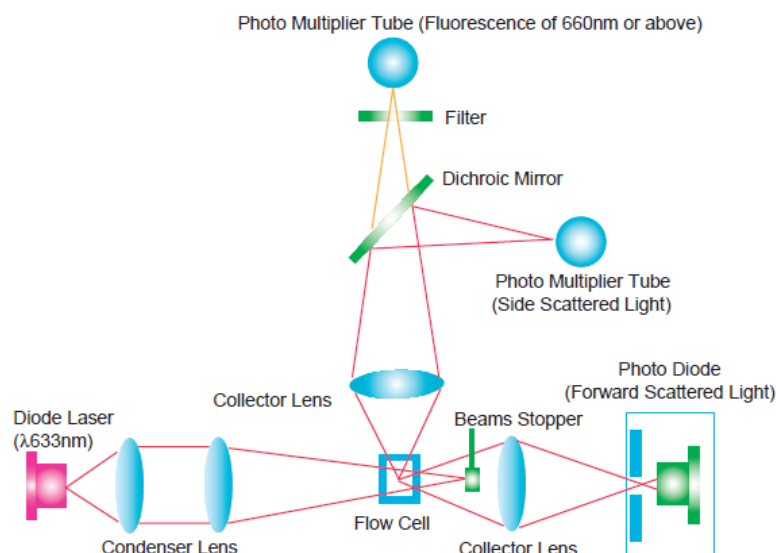


Figura iv - Unidade ótica do aparelho Sysmex XE-2100 e XE-5000.

- *forward scatter*: indica o volume da célula, sinal recebido pelo fotodiodo;
- *side scatter*: indica estrutura interna da célula, como a lobularidade e grânulos no citoplasma, sinal recebido pelo fotomultiplicador;
- *side fluorescence*: indica a quantidade de material genético presente (DNA e RNA), sinal recebido pelo fotomultiplicador.

A luz recebida pelo detetor é convertida em impulsos elétricos de modo a formar diagramas de dispersão para análise.

ANEXO 6 - Classificação de Motilidade dos Espermatozoides

É utilizado um sistema de classificação da motilidade dos espermatozoides que distingue espermatozoides com motilidade progressiva (rápidos e lentos) e não progressiva dos imóveis.

Espermatozoides progressivos são os que se movimentam ativamente, tanto linearmente como em círculos largos, independentemente da velocidade (rápidos ou lentos). Espermatozoides não progressivos são todos os outros padrões de movimento sem progressão. Finalmente, espermatozoides imóveis não têm movimento. O somatório das percentagens de progressivos rápidos e progressivos lentos deve ser igual

ou superior a 32%. Este parâmetro é importante no diagnóstico de astenozoospermia, ou seja, diminuição da mobilidade progressiva dos espermatozoides.

ANEXO 7 - Meios de cultura usados no laboratório de Microbiologia para os diferentes tipos de amostras.

Meio de Cultura	Caraterísticas do Meio
Caldo BHI (<i>Brain and Heart Infusion</i>)	- Caldo de enriquecimento; - Caldo especificamente adaptado ao crescimento dos microrganismos exigentes aeróbios, composto por uma base nutritiva enriquecida com glucose e peptona; <i>Incubação:</i> em condições aeróbias, durante 72h, a 37° C
Caldo GN	- Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>; - Tem como fontes de energia o manitol e a dextrose. O manitol, em concentração mais elevada do que a dextrose, promove o crescimento de espécies fermentadoras de manitol, como <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>, e limita o crescimento de <i>Proteus</i> e outros fermentadores de dextrose; - Para inibir bactérias Gram-positivas e outras negativas, o caldo é composto por citrato de sódio e desoxicolato de sódio; <i>Incubação:</i> em condições aeróbias, durante 72h, a 37° C.
Caldo de Schaedler + Vitamina K3	- Caldo de enriquecimento para anaeróbios; - Tem um papel importante pois o poder redutor e a presença de vários fatores de crescimento, nomeadamente hemina, extrato de levedura, vitamina K3, facilitam o crescimento destes germes; <i>Incubação:</i> em condições anaeróbias, durante 72h, a 37°C.
Caldo Tioglicolato	- Caldo de enriquecimento; - Utilizado para a deteção das bactérias anaeróbias e, também, permite a deteção das bactérias aeróbias; - Tem um papel muito importante porque diminui o potencial de óxido-redução do meio e neutraliza a atividade antibacteriana dos derivados de mercúrio; - Não é necessário incubar em anaerobiose; <i>Incubação:</i> em condições aeróbias, durante 72h, a 37° C.
CLED (<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>)	- Meio de isolamento dos microrganismos do trato urinário; - Permite, também, diferenciar os microrganismos fermentadores da lactose dos não fermentadores; - A presença ou ausência de fermentadores de lactose é observada pela alteração do pH do meio; - O fraco conteúdo em eletrólitos do meio, permite limitar a invasão da gelose pelos <i>Proteus</i> spp.; - Um tempo de incubação superior a 24h pode levar a uma realcalinização do meio, modificando a coloração das colónias; <i>Incubação:</i> em condições aeróbias, durante 24 a 48h, a 37° C.

ANEXO 7 (Continuação)

Meio de Cultura	Caraterísticas do Meio
Gelose Campylosel	- Meio de isolamento seletivo de <i>Campylobacter</i> spp. intestinais; - A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento das espécies pesquisadas. A capacidade nutritiva foi melhorada pela utilização de agentes redutores; - A seletividade é assegurada pelos antibióticos e antifúngicos presentes no meio que inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos; - Incubação: em microaerofilia durante 48h a 42° C.
Gelose Chocolate e PolyViteX (PVX)	- Isolamento de bactérias fastidiosas; - Destina-se mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes como <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i>; - É composto por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX; - Pode ser usado para subcultivar estirpes bacterianas para obter culturas puras; - Incubação: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 48h, a 37° C. No entanto, em amostras de LCR, incuba durante 72h.
Gelose Chocolate e PolyViteX VCAT3 (VCA3)	- Isolamento seletivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>, a partir de amostras polimicrobianas (urogenitais, orofaríngeas, LCR, hemoculturas, entre outras); - É composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e PolyViteX; - A seletividade do meio é obtida pela combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos; - Incubação: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 48h, a 37° C.
Gelose Gardnerella	- Meio de isolamento seletivo de <i>Gardnerella vaginalis</i> a partir de colheitas genitais; - A presença de sangue humano facilita o seu crescimento e permite a obtenção de uma β-hemólise; - Os antibióticos, como Anfotericina B, presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes Gram-negativo bem como leveduras; - Incubação: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 48h, a 37° C.
Gelose Hektoen (Hekt)	- Meio de isolamento seletivo e diferenciação de <i>Salmonella</i> ou <i>Shigella</i>, a partir de amostras de fezes; - Os microrganismos que fermentam um dos três açúcares contidos no meio originam colônias amarelas ou amarelas-salmão, outros produzem colônias verdes ou azul-esverdeadas. Os microrganismos que produzem sulfeto de hidrogénio (H₂S) originam colônias com centro negro; - A inibição de microrganismos Gram-positivo obtém-se pela mistura de sais biliares e de corantes; - Incubação: em condições aeróbias, durante 24h, a 37° C.

ANEXO 7 (Continuação)

Meio de Cultura	Caraterísticas do Meio
Gelose Legionella (BCYE)	- Meio de isolamento seletivo de <i>Legionella</i>; - O carvão ativado absorve qualquer substância tóxica no extrato de levedura e estimula o crescimento de <i>Legionella</i>. O tampão ACES estabiliza o pH do meio a 6,9, que é o pH ótimo para o crescimento; - O meio BCYE fornece uma excelente inibição de crescimento de bactérias Gram-positivo, da maioria das bactérias Gram-negativo, leveduras e fungos, através de uma combinação otimizada de três antibióticos; <i>Incubação</i>: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 10 dias, a 37° C.
Gelose MacConkey (MCK)	- Meio de isolamento seletivo para bacilos Gram-negativos; - A gelose com cristal de violeta permite evidenciar a fermentação da lactose pela viragem do vermelho neutro; - A seletividade em relação às bactérias Gram-positivo é proporcionada pelos sais biliares e o cristal violeta; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 24h, a 37° C.
Gelose Mueller Hinton 2 (MH2)	- Meio destinado para antibiograma por difusão em disco ou tira <i>E-test</i>, para o estudo da sensibilidade aos antibióticos e sulfamidas; - A sua concentração em iões bivalentes é ajustada assegurando a precisão correta da determinação da sensibilidade das <i>Pseudomonas</i> aos aminosídeos e às tetraciclinas; - O seu baixo teor em timina – timidina, elementos inibidores da atividade das sulfamidas, diminui os fenómenos de crescimento em torno dos discos e permite uma melhor determinação dos diâmetros dos halos de inibição; - A composição do meio permite o crescimento de bactérias não exigentes; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias ou em atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 24h, a 37° C.
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)	- Meio de Isolamento seletivo para leveduras e fungos filamentosos; - A presença de peptonas e glucose favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas; - A presença de Gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. O Cloranfenicol melhora a seletividade em relação a algumas espécies, por vezes, resistentes à Gentamicina como estreptococos, Proteus, entre outros; - O pH do meio é ligeiramente ácido, favorecendo mais o crescimento dos fungos do que o crescimento de bactérias; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 1 - 5 dias, a 30° C ou temperatura ambiente.

ANEXO 7 (Continuação)

Meio de Cultura	Caraterísticas do Meio
Gelose de Sangue (COS)	- Meio de isolamento para crescimento de microrganismos fastidiosos; - Contém uma mistura de peptonas especialmente adaptadas à cultura dos microrganismos fastidiosos (estreptococos, <i>Listeria</i>, ...); - A presença de sangue permite a determinação de hemólise, que é um critério básico para a orientação da identificação de bactérias; <i>Incubação</i>: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 24 a 48h, a 37° C. No entanto, em amostras de LCR, incuba durante 48 a 72h.
Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Carneiro (SCS)	- Meio de isolamento de bactérias anaeróbias estritas e facultativas; - A presença de fatores de crescimento, tais como o extrato de levedura, a hemina e a vitamina K3, bem como a adição de sangue de carneiro, permite o crescimento das espécies mais fastidiosas. O agente redutor (L-cistina) e a elevada concentração de dextrose na gelose favorecem o crescimento de espécies anaeróbias; <i>Incubação</i>: em condições anaeróbias, durante 48h, a 37° C.
Gelose SMAC (MacConkey com Sorbitol)	- Isolamento seletivo de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica de serotipo O157:H7; - A presença de sorbitol permite a diferenciação das <i>E. coli</i> O157:H7. Este serotipo não fermenta sorbitol e apresenta colónias incolores. Os outros serotipos fermentam o sorbitol originando colónias rosas e vermelhas; - A seletividade em relação às bactérias Gram-positivo é fornecida pelos sais biliares e cristal de violeta; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 24h, a 37° C.
Gelose SS	- Isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> ou <i>Shigella</i>, a partir de amostras de fezes, suspensões e meios de enriquecimento; - O meio permite evidenciar colónias que fermentam lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H₂S); - A inibição de microrganismos Gram-negativo obtém-se pela mistura de sais biliares e de corantes. <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 24h, a 37° C.
Gelose Yersinia (CIN)	- Isolamento seletivo de <i>Yersinia</i> spp.; - O manitol e o vermelho neutro presentes no meio permitem a diferenciação das Yersinias pela coloração das colónias; - A presença de colato, desoxicolato, cristal de violeta, Irgasan e os antibióticos Cefsuladina e Novobiocina, inibem o desenvolvimento das bactérias Gram-positivo e da maioria das Gram-negativo; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 48h, a 30° C.
Meio de Brucella	- Meio de diferenciação de <i>Brucella</i> spp.; - O meio enriquecido com peptonas, extrato de levedura e dextrose, permite o crescimento de organismos fastidiosos; - As colónias típicas de <i>Brucella</i> spp. apresentam um aspeto esferoide, ligeiramente amareladas e translúcidas; <i>Incubação</i>: atmosfera 5 – 10% CO₂, durante 4 a 5 dias, a 37° C. No entanto, antes de dar resultado negativo, incubar até perfazer 21 dias.

ANEXO 7 (Continuação)

Meio de Cultura	Caraterísticas do Meio
Meio de Coletsos	▪ Tubo em rampa para isolamento de micobactérias; ▪ Meio enriquecido pela presença de ovo, de oligoelementos e de piruvato, que favorece o crescimento de micobactérias; ▪ O crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> caracteriza-se por colónias com um aspeto designado “couve-flor”. As contaminações bacterianas são em geral detetadas rapidamente e podem levar a uma alteração da cor do meio; ▪ <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 8 semanas, a 30° - 35° C.
Meio de Fletcher	▪ Meio de isolamento da <i>Leptospira</i>; ▪ Meio enriquecido, semissólido usado para a cultura de <i>Leptospira</i> com peptona e soro de coelho; ▪ Contém 5-fluorouracil para o crescimento seletivo da <i>Leptospira</i>; ▪ <i>Incubação</i>: durante 6 semanas no escuro, à temperatura ambiente.
Meio de Granada	▪ Meio seletivo e diferencial de <i>Streptococcus agalactiae</i> (estreptococos do grupo B); ▪ Utiliza a Granadaene, um pigmento vermelho poliénico, para diferenciar estreptococos do grupo B das outras bactérias patogénicas; ▪ Quando positivo, há alteração do pH do meio para laranja; ▪ Inibe a maioria dos microrganismos que não pertencem às espécies <i>S. agalactiae</i>; ▪ <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 18-36h, a 37° C.
Meio de Lowenstein-Jensen (LJ-T)	▪ Tubo em rampa para isolamento de micobactérias; ▪ Meio enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula de batata, fornecendo crescimento de micobactérias; ▪ À semelhança do meio de Coletsos, o crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> caracteriza-se por colónias com um aspeto designado “couve-flor”; ▪ <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 8 semanas, a 30° - 35° C.
Meio de TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bilis e Sacarose)	▪ Isolamento de diferenciação seletivo de <i>Vibrio cholerae</i>, <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. alginolyticus</i> em amostra de fezes; ▪ Meio permite diferenciar os microrganismos fermentadores de sacarose dos não fermentadores de sacarose; ▪ A concentração elevada de sódio favorece o desenvolvimento de <i>V. cholerae</i> que é halotolerante e de outras espécies <i>Vibrio</i> que são halófilas; ▪ O pH de 8,6 permite potenciar o desenvolvimento de <i>V. cholerae</i> uma vez que este é sensível a ambientes ácidos; ▪ <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 48h, a 37° C.

ANEXO 8 - Meios de cultura do sistema BACTEC usados no laboratório de Microbiologia para amostras de sangue e para a pesquisa de micobactérias para as diferentes amostras biológicas.

Frascos BACTEC	Caraterísticas do Meio
Lytic/10 Anaerobic/F	- Meio líquido de soja-caseína digerida previamente reduzido e enriquecido com CO₂, destina-se a ser utilizado em hemoculturas anaeróbias e isolamento qualitativo de microrganismos anaeróbios a partir do sangue; <i>Incubação</i>: durante 5 dias, a 37° C.
MGIT	- Tubo indicador de crescimento de micobactérias, suplementado com BACTEC MGIT <i>Growth Supplement</i> e mistura antibiótica BBL MGIT <i>Panta</i>; - O meio líquido MGIT contém de base Meio Líquido Middlebrook 7H9 modificado; - O BACTEC MGIT <i>Growth Supplement</i> está enriquecido com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase, essenciais para o crescimento rápido de micobactérias; <i>Incubação</i>: em condições aeróbias, durante 42 dias, a 35° - 37° C.
Myc/F Lytic	- Formulação de meio líquido de Middlebrook 7H9 e de BHI, para o isolamento de micobactérias a partir de amostras de sangue, e de leveduras e fungos a partir de sangue e fluídos corporais estéreis; - Tem o citrato de amónia férrico como fonte de ferro para estirpes específicas de micobactérias e fungos, saponina como agente de lise do sangue e proteínas e açúcares específicos para fornecerem suplementos nutritivos; <i>Incubação</i>: durante 42 dias, a 37° C.
Mycosis-IC/F	- Meio líquido destinado a ser utilizado em hemoculturas aeróbias; - Corresponde a um meio seletivo para leveduras e fungos; <i>Incubação</i>: durante 14 dias, a 37° C.
Peds Plus/F	- Meio líquido de soja-caseína digerida enriquecido com CO₂, destina-se a culturas de sangue aeróbias a partir de amostras pediátricas de volume geralmente inferior a 3 mL; <i>Incubação</i>: durante 5 dias, a 37° C.
Plus Aerobic/F	- Meio líquido de soja-caseína digerida, utilizado num procedimento qualitativo para a cultura aeróbia e isolamento de microrganismos (bactérias e leveduras) do sangue; <i>Incubação</i>: durante 5 dias, a 37° C.

ANEXO 9 - Teste de catálase

A enzima catálase medeia a hidrólise de H_2O_2 em O_2 e H_2O . A presença desta enzima na bactéria isolada é evidenciado quando um pequeno inóculo é entra em contacto com H_2O_2 e se dá a rápida libertação de O_2 sob a forma de bolhas. Por outro lado, a ausência da catálase é demonstrado com a ausência da produção de bolhas.

ANEXO 10 - Teste de coagulase *Pastorex*[®] STAPH-PLUS

Pastorex[®] STAPH-PLUS é um teste de aglutinação em látex rápido para a detecção simultânea do fator de afinidade de fibrinogénio, proteína A, e os polissacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus*. O reagente é constituído por partículas de látex sensibilizado com fibrinogénio e Ig G, bem como anticorpos monoclonais específicos contra polissacáridos capsulares de *S. aureus*. A combinação de fibrinogénio, Ig G e anticorpos monoclonais anti-capsulares no mesmo reagente permite o reconhecimento de estirpes altamente encapsuladas. Para as estirpes altamente encapsuladas, os anticorpos anti-polissacarídeos capsulares aglutinam as bactérias. Para as estirpes que perderam sua cápsula polissacarídica, as bactérias são aglutinadas pelo fibrinogénio e Ig G.

Isolados de *S. aureus* são misturados com o reagente de látex sobre uma lâmina e, visualmente, avalia-se a lâmina para a presença de aglutinação, indicativo da presença de organismos de *S.aureus*.

ANEXO 11 - Sistema automatizado *BD Phoenix*

São usados três painéis, *BD Phoenix PMIC*, *UNMIC* e *SMIC*, para a rápida identificação e testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos de Gram-positivos, negativos e estreptococos, aeróbios e anaeróbios facultativos, respetivamente. Estes painéis só se destinam a ser usados com o instrumento de sistema automatizado *Pheonix 100 Becton-Dickinson*.

A inoculação dos painéis é feita de acordo com o procedimento operativo do Phoenix. O aparelho faz as leituras dos alvéolos dos painéis, registando alterações de

turvação, fluorescência e mudanças de cor. Um alvéolo considera-se terminado quando não se registam alterações durante um período de tempo. Quando todos estão terminados, o aparelho dá um resultado de identificação e de sensibilidade. O tempo máximo para que o Phoenix dê um resultado é de 12h para identificação de espécie e 16h para os testes de sensibilidade a agentes anti-microbianos. É importante que o aparelho detete crescimento nos poços de controlo para poder dar resultados válidos. Dentro do instrumento existem uns painéis especiais, que servem para ajustar os sistemas de deteção ótico, incrustados na estação para não serem retirados por erro.

ANEXO 12 - Prova de sensibilidade à Novobiocina

A prova da novobiocina tem como objetivo testar o efeito da novobiocina em *Staphylococcus* coagulase negativo, ou seja, se o organismo é sensível ou resistente. *Staphylococcus saprophyticus* é resistente a novobiocina enquanto *S. epidermidis* é sensível.

O teste é realizado inoculando uma placa de Mueller-Hinton com uma suspensão com densidade 0,5 *McFarland*, com um disco impregnado de novobiocina. Se a zona de inibição for menor ou igual a 16 mm indica resistência (R); por outro lado, se halo de inibição for superior a 16 mm indica sensibilidade (S) à novobiocina.

ANEXO 13 - Prova de sensibilidade à Optoquina

A prova da optoquina tem como objetivo testar o efeito da optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídica) num determinado organismo, ou seja, se o organismo é sensível ou resistente. A optoquina lisa os pneumococos (teste positivo), enquanto os restantes estreptococos α -hemolíticos são resistentes (teste negativo).

O teste é realizado inoculando uma placa de GS com um disco impregnado de optoquina. Se formar um halo de inibição com diâmetro de 14 mm ou mais com disco de 6 mm, é sensível (S); se não formar halo de inibição é resistente (R); o resultado é duvidoso para qualquer halo de inibição com diâmetro inferior a 14 mm é duvidoso.

ANEXO 14 - Pesquisa de Estreptococos *SLIDEX Strepto Plus*

O *SLIDEX Strepto Plus*, é um teste rápido de aglutinação de micropartículas de látex, a partir de colónias isoladas, para identificar os estreptococos dos grupos A, B, C, D, F e G, segundo a classificação de *Lancefield*. O agrupamento das estirpes permitirá a orientação do tratamento antibiótico.

Após cultura, as colónias isoladas de estreptococos são colhidas e colocadas num tubo que contém o reagente de extração. Os estreptococos beta-hemolíticos possuem frequentemente antígenos específicos do grupo que são extraídos por uma enzima e identificados por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos dirigidos contra antígenos de grupo. Se o antígeno estiver presente, o reagente látex correspondente é aglutinado e se estiver ausente, o reagente látex permanece em suspensão homogénea.

ANEXO 15 - Prova de Bile-Esculina

A prova de bile-esculina baseia-se na capacidade destas bactérias hidrolisarem a esculina na presença de sais biliares. É usada para a pesquisa de *Enterococcus* spp. e de estreptococos do grupo D. As restantes bactérias Gram-positivas são inibidas pelos sais biliares neste meio, enquanto os enterococos e estreptococos do grupo D hidrolisam a esculina. Consequentemente, o pH do meio é alterado levando ao escurecimento deste. A cor castanho-escura resulta da combinação do produto final da hidrólise de esculina, a esculetina, com iões férricos formando um complexo de ferro fenólico.

Os tubos em rampa de bile-esculina agar são incubados a 37 ° C durante 24 a 48h. Considera-se um resultado positivo, ou seja, há hidrólise de esculina, quando há escurecimento da rampa do agar; e um resultado negativo quando não há escurecimento do meio.

ANEXO 16 - Prova de Fatores X e V

Determinados *Haemophilus* spp. requerem fatores de crescimento adicionais para crescerem *in vitro*, nomeadamente, apenas fator X (hemina), apenas fator V (NAD) ou a combinação dos dois fatores.

Esta prova consiste na inoculação do meio MH2 com uma suspensão do organismo de densidade 0,5 *McFarland* e a adição de discos impregnados com fator X, V e XV. Vai a incubar.

O resultado é positivo se houver crescimento em torno do disco XV e entre os discos X e V onde os halos se encontram, demonstra que requer a presença de ambos os fatores para o crescimento, indicativo de *H. influenzae*; ou se houver crescimento em torno do disco V, com leve crescimento em torno do disco XV, demonstra que o organismo requer apenas o fator V para crescimento, indicativo de *H. parainfluenzae*. O resultado é dado como negativo se houver crescimento em toda a superfície do meio, o que mostra que o organismo não requer nenhum fator para crescimento.

ANEXO 17 - Sistema de identificação de *Neisseria* e *Haemophilus* API NH

O sistema API NH da *BioMérieux*, é um sistema padronizado para a identificação de *Neisseria* e *Haemophilus* e *Moraxella catarrhalis*, englobando minitestes em 10 microtubos que contêm substratos desidratados, para efetuar 12 testes de identificação, bem como a detecção de uma penicilinase nos *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

O princípio do *kit* consiste na assimilação dos vários substratos desidratados, sendo o desenvolvimento dos microrganismos detetado pela opacidade nas cúpulas, como reação positiva. O organismo a testar é colocado em suspensão, em *API[®] NACl 0,85% Medium*, de opacidade equivalente ao padrão 4 de *McFarland* e transferida para o meio de cultura *API[®] C Medium* e inoculada na galeria. Após 24 a 48h de incubação lê-se o crescimento em cada cúpula no aparelho *ATBTM Expression* ou visualmente. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por mudanças de cor espontâneas ou através da adição de reagentes.

ANEXO 18 - Antibiógrama para *Haemophilus* e *Moraxella catarrhalis* ATB HAEMO EU.

A galeria ATB HAEMO EU da *BioMérieux* permite determinar a sensibilidade de *Haemophilus* e *Moraxella catarrhalis* aos antibióticos em meio semissólido em

condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de microdiluição.

A galeria contém 16 pares de cúpulas contendo antibióticos com uma ou duas concentrações. O organismo a testar é colocado em suspensão e depois transferida para o meio de cultura e inoculada na galeria. Após incubação, a leitura do crescimento faz-se quer visualmente quer com o aparelho *ATBTM Expression*. O resultado obtido permite classificar a estirpe como S, I, ou R e dar CMI para a Ampicilina e Moxifloxacina.

ANEXO 19 - Teste de *Kligler* para orientar a identificação das enterobactérias.

O teste de *Kligler* realiza-se num tubo em rampa com gelose de *Kligler*. Este meio é essencialmente usado para orientar a identificação das enterobactérias, permitindo detetar a fermentação da glucose e da lactose, a produção de H₂S e de gás. Recomenda-se uma incubação a 37°C com a cápsula desbloqueada durante 24h.

Este meio apresenta-se com um sedimento e uma rampa. A leitura efetuada ao nível do sedimento, onde a fermentação da glucose presente em fraca concentração no meio, traduz-se por uma acidificação que leva a uma viragem do sedimento do vermelho de fenol a amarelo; a produção de gás traduz-se pelo aparecimento de bolhas podendo até fragmentar da gelose; a produção de H₂S na presença de citrato de ferro dá lugar à formação de um precipitado negro no meio. Ao nível da rampa, a fermentação da lactose, presente em forte concentração no meio, dá lugar a uma acidificação e a uma viragem do vermelho de fenol a amarelo da rampa.

ANEXO 20 - Hidrólise de ureia

O teste tem como objetivo diferenciar bactérias com capacidade em hidrolisar a ureia em amónia (NH₃), CO₂ e H₂O pela ação da enzima urease. A formação de NH₃ alcaliniza o meio alterando a cor do meio de laranja claro para vermelho fenol (pH 6,8 para 8,1). Se houver alteração do meio, o resultado é positivo para a presença de urease; se não houver alteração do pH do meio, o resultado é dado como negativo.

ANEXO 21 - *E. coli* O157 Test

O serotipo de *Escherichia coli* mais frequentemente isolado em casos de colite hemorrágica e de síndrome urémico hemolítica é a O157:H7. O isolamento deste serotipo nas fezes diarreicas, particularmente, quando se observa presença de sangue, é indicativo de uma cepa produtora de verocitotoxina.

O teste *E. coli* O157 Test é um teste de aglutinação em látex para identificação do serotipo *E. coli* O157, uma estirpe potencialmente produtora de verocitotoxina. Este teste demonstra por aglutinação em lâmina de partículas de látex azul sensibilizados com anticorpo de coelho específicos reativos com o antígeno do serotipo O157:H7 de *E. coli*.

ANEXO 22 - Teste da Oxidase – Método de Kovac

Este teste tem como objetivo diferenciar as enterobactérias das não enterobactérias. Permite determinar a presença ou ausência da atividade de oxidase no citocromo C nas bactérias através da oxidação do substrato dicloridrato de tetrametil-p-fenilenediamina. O citocromo oxidase produzido pelo microrganismo não oxida diretamente o reagente p-fenilenediamina. Oxida o citocromo C que, por sua vez, oxida o reagente para formar um composto com a cor púrpura.

Os organismos que contêm o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória são positivos para a oxidase e tornam o reagente com o substrato púrpura. Os organismos que não contêm o citocromo C na sua cadeia respiratória, não oxidam o reagente deixando-o incolor dentro dos limites de tempo do teste, por isso, são negativos para a oxidase.

ANEXO 23 - Princípio dos testes realizados no *Cobas e411* da *Roche Diagnostics*.

Parâmetro	Princípio do Teste
B-hCG Livre	▪ O ensaio é baseado na técnica de <i>sandwich</i>.
PAPP-A	▪ A primeira incubação consiste na amostra com anticorpos monoclonais biotinados específicos anti-β-hCG/PAPP-A/Tg e um anticorpo monoclonal específico anti-β-hCG livre marcado com um complexo de ruténio que vão reagir entre si e formar um complexo <i>sandwich</i>.
Tiroglobulina	▪ Segue-se uma segunda incubação, após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina. ▪ A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são então removidos com reagente. A aplicação de corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. ▪ Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de 2 pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.
Anti-tiroglobulina	▪ O ensaio é baseado no princípio de competição. ▪ A amostra é incubada com Tg biotinada e os anticorpos de amostra fixam-se ao antígeno. ▪ De seguida, adicionam-se os anticorpos anti-Tg marcados com complexo de ruténio e micropartículas revestidas de estreptavidina, os imunocomplexos produzidos ligam-se à fase sólida pela interação da biotina-estreptavidina. ▪ A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são então removidos com reagente. A aplicação de corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. ▪ Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de 2 pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.

ANEXO 24 - Princípio dos parâmetros das tiras teste *URISYS 2400* da *Roche Diagnostics*, para as urinas tipo II.

Parâmetro	Princípio do Teste
pH	O papel do teste contém os indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol que reagem especificamente com iões de hidrogénio (H^+). Os valores de pH mais frequentes da urina recente de indivíduos saudáveis compreendem entre 5 e 6.
Leucócitos	O teste mostra a presença de esterases leucocitárias. Estas esterases catalisam a hidrólise de éster indoxil em indoxil que, por sua vez, reagem com o sal de diazónio produzindo um corante violeta. A reação não é afetada pela presença de bactérias, tricomonas ou eritrócitos na urina.
Nitritos	O teste é baseado no princípio da prova de Griess e é específico para nitritos. A reação mostra a presença de nitritos, o que se traduz indiretamente em bactérias produtoras de nitritos na urina através de uma coloração rosa-vermelhada na correspondente zona de teste. Mesmo uma ligeira coloração rosa indica de bacteriúria significativa.
Proteínas	O teste é baseado no princípio do erro proteico de um indicador de pH. É particularmente sensível a albumina. O teste não é afetado pela presença de quinina, quinidina, cloroquina, tolbutamina e um pH elevado até 9.
Glucose	A determinação da glucose é baseada numa reação específica da glucose oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste é independente do pH e densidade específica da urina e não é afetada pela presença de corpos cetónicos.
Corpos Cetónicos	O teste é baseado no princípio da prova de Legal e é mais sensível a ácido acetoacético do que à acetona.
Urobilinogénio	Um sal de diazónio estável reage quase de imediato com o urobilinogénio originando um corante azo vermelho. Este teste é específico para urobilinogénio e não está suscetível aos conhecidos fatores de interferência que afetam a prova de <i>Ehrlich</i> .
Bilirrubina	O teste é baseado no acoplamento da bilirrubina com o sal de diazónio. Mesmo a mais ligeira coloração rosa constitui um resultado positivo, ou seja, patológico. Outros constituintes urinários produzem uma coloração amarela, mais ou menos, intensa.
Sangue	A ação semelhante à peroxidase da hemoglobina e mioglobina catalisa especificamente a oxidação do indicador por meio de um peróxido de hidrogénio orgânico contido no papel do teste, obtendo-se uma coloração azul-esverdeada.
Zona de Compensação	Esta zona branca, o qual não se encontra nenhum reagente impregnado, permite a compensação instrumental para a cor urinária intrínseca, para testar a presença de leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubina. Esta ajuda na prevenção de falsos positivos quando a amostra é muito colorida.

ANEXO 25 - Classificação dos cilindros urinários, e respectivas considerações clínicas, de acordo com a sua forma, tamanho e conteúdo.

Cilindros	Considerações Clínicas
Hialinos	▪ Matriz composta por proteína de <i>Tamm-Horsfall</i> e albumina; ▪ Em sedimentos não corados, são incolores; ▪ A presença 0-2 cilindros hialinos por campo é considerado normal, podem estar presente após exercício extremo, desidratação, exposição ao calor e stress emocional; ▪ Patologicamente estão aumentados em glomerulonefrites agudas, pielonefrites, doenças renais crônicas e falha cardíaca congestiva.
Eritrocitários	▪ Dado que a presença de eritrócitos na urina já é indicativo de sangramento no trato genito-urinário, a presença de cilindros hemáticos consegue ser ainda mais específico, mostrando sangramento dentro do nefrônio; ▪ Cilindros eritrocitários estão essencialmente associados a danos no glomérulo (glomerulonefrite) que permite a passagem das células através da membrana glomerular.
Leucocitários	▪ São indicativos de inflamação ou infecção; ▪ Estão frequentemente associados a pielonefrites e são um dos principais marcadores para distinguir uma pielonefrite, infecção do trato urinária superior, de uma infecção do trato urinário inferior; ▪ Também podem estar presentes na inflamação não bacteriana, tais como nefrite intersticial aguda e pode fazer-se acompanhar de cilindros eritrocitários na glomerulonefrite.
Epiteliais	▪ Cilindros contendo células epiteliais renais representam uma destruição tubular avançada, produzindo estase urinária assim como danos no revestimento tubular; ▪ Estão associados a químicos e metais pesados ou toxicidade induzida por drogas, infecções virais e rejeição de aloenxerto; ▪ Podem acompanhar os cilindros leucocitários em casos de pielonefrite.
Cerosos	▪ São representativos de extrema estase urinária, indicando insuficiência renal crônica; ▪ Geralmente são vistos juntamente com outros cilindros associados com a condição de que tenha causado essa insuficiência renal.
Granulosos	▪ Podem ser de grânulos finos ou grossos e tanto podem ter significado clínico como não; ▪ Em estados de doença, cilindro granulosos podem representar desintegração de cilindros epiteliais e células tubulares ou agregados de proteínas filtradas pelo glomérulo.

ANEXO 25 (Continuação)

Cilindros	Considerações Clínicas
Lipídicos	▪ São vistos juntamente com corpos gordos ovais e gotas de gordura em situações que causam lipidúria; ▪ São frequentemente associados à síndrome nefrótica, mas também podem ser vistos em necrose tubular tóxica, diabetes <i>mellitus</i> e lesões por esmagamento.
Largos	▪ Tal como os cilindros cerosos, estes representam extrema estase urinária e até podem ser considerados como sendo os cilindros de insuficiência renal; ▪ Como um molde dos túbulos contornados distais, a presença de cilindros largos indicam destruição das paredes tubulares. Ainda, quando o fluxo de urina para os tubos coletores fica severamente comprometida, formam-se os cilindros nesta área e aparecem largos; ▪ Todos os tipos de cilindros podem aparecer sob a forma de cilindros largos. No entanto, considerando-se a estase urinária, os cilindros mais comuns são os granulares e os cerosos.

ANEXO 26 - Determinação Quantitativa de Açúcares Redutores com *CLINITEST*[®] Reagent Tablets da Bayer Corporation.

O teste *CLINITEST*[®] Reagent Tablets da Bayer Corporation, é um método de aquecimento para a determinação semiquantitativa de açúcares redutores na urina. Cada *tablet* contém sulfato de cobre, ácido cítrico, hidróxido de sódio e carbonato de sódio. Quando adicionado a uma mistura de água e de urina, o *tablet* é rapidamente dissolvido por ação do carbonato de sódio e ácido cítrico, os quais atuam como efervescente. O hidróxido de sódio proporciona o meio alcalino necessário para a reação e o calor necessário é obtido através da reação de hidróxido de sódio com água e ácido cítrico. Os açúcares redutores na urina reagem com o sulfato de cobre para reduzir os iões cúpricos (Cu^{2+}) em óxido de cobre.

Para proceder a este teste, recomenda-se o uso de tubos de vidro, dado que o fundo do tubo vai ficar muito quente, caso se usem tubos de ensaio de plástico, estes podem expandir devido ao calor. Colocam-se 5 gotas de urina no tubo de vidro e 10 gotas de água. Adiciona-se o *tablet* e observa-se a reação completa, sem agitação. Após um período de 15 segundos de espera, depois da efervescência ter terminado, agita-se suavemente o tubo e compara-se a cor obtida com a carta de cores do fornecedor (Figura v).

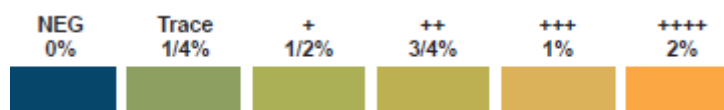


Figura v - Carta de cores *CLINITEST® Reagent Tablets* da *Bayer Corporation*, associada às diferentes quantidades de açúcares redutores presentes na amostra de urina. Os resultados são obtidos em percentagem (equivalente a gramas por decilitro).⁽³⁶⁾

O teste é classificado como negativo, quando se obtém o equivalente a 1/4%, e positivo para 1/2% (1+), 3/4% (2+), 1% (3+) ou 2% (4+). É necessário ter especial atenção, durante a reação, se a cor passa rapidamente de laranja brilhante para um castanho-esverdeado ou castanho-escuro. Neste caso, deve-se registar o resultado como sendo maior do que 2%. A falha na observação deste fenómeno pode levar a leituras falsamente baixas. Assim, para resultados de 2%, recomenda-se o uso do método de 2 gotas de urina para 10 gotas de água, ao invés de 5 gotas de urina para 10 de água, fazendo a leitura por comparação a partir da devida carta de cores adaptada para o método de 2 gotas. Este método irá permitir a quantificação de açúcares redutores até 5%, mas o fenómeno de passagem rápida ainda pode ocorrer para concentrações muito elevadas.

ANEXO 27 - Pesquisa de drogas de abuso *TOX/See™ Drug Screen Test* da *BioRad*.

TOX/See™ Drug Screen Test da *BioRad* é um teste imunocromatográfico rápido baseado no princípio de vínculos competitivos. As drogas de abuso, que podem estar presentes na urina, competem com a droga conjugada para os mesmos sítios de ligação do anticorpo. O dispositivo (Figura vi) consiste numa membrana com partículas revestidas de anticorpos monoclonais anti-drogas de ratinho e droga conjugada imobilizada na região de linha teste.

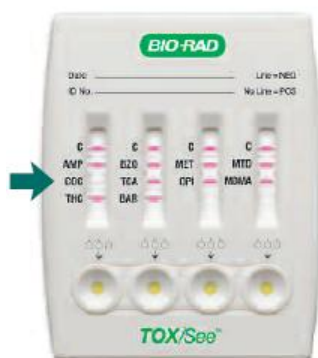


Figura vi - Dispositivo para pesquisa de drogas de abuso *TOX/SeeTM Drug Screen Test* da *BioRad*. A linha colorida na região de linha teste, numa determinada droga, indica um resultado negativo; a ausência da linha colorida na região de linha teste, numa determina droga, indica um resultado positivo.

Após a adição da amostra de urina, no respetivo poço do dispositivo de teste, esta migra por ação capilar. Ao passar pela região da linha teste, se a droga presente na amostra for inferior ao nível de concentração de *cuttoff*, não ocorrerá a saturação dos sítios de ligação do anticorpo. As partículas revestidas de anticorpo ligar-se-ão ao conjugado de droga imobilizado e aparecerá uma linha colorida na região da linha teste na tira da droga específica. Por outro lado, se a concentração da droga presente for superior ao nível de *cuttoff*, nenhuma linha colorida aparecerá na região de linha teste, indicativo da saturação dos sítios de ligação do anticorpo anti-droga. À semelhança de outros ensaios imunocromatográfico, como controlo do procedimento, na região da linha controlo, com anticorpos policlonais de cabra anti-Ig G de coelho e Ig G de coelho, deverá aparecer sempre uma linha colorida. Deste modo, confirma-se que o volume de amostra usado foi apropriado e que a absorção da membrana ocorreu devidamente.

ANEXO 28 - Pesquisa de drogas de abuso.

1. Anfetaminas

As anfetaminas (AMP) pertencem à classe de agentes simpatomiméticos com aplicações terapêuticas. Estão quimicamente relacionadas com as catecolaminas naturais do corpo humano, epinefrina e norepinefrina. Quando em doses elevadas, as

AMP estimulam o SNC e induz euforia, agilidade e uma sensação de energia e potência elevadas. As respostas cardiovasculares às AMP incluem aumento da pressão sanguínea e arritmias cardíacas e suprimem o apetite. Como consequências, AMP produzem ansiedade, paranoia, alucinações e comportamentos psicopata. Os efeitos das AMP perduram por 2 a 4h após o último consumo e permanece entre 4 a 24h no organismo. São excretadas na urina cerca de 30% das AMP de forma inalterada, sendo o restante derivados hidroxilados e desaminados.

2. Barbitúricos

Os barbitúricos (BAR) pertencem à classe de depressivos do SNC, essencialmente utilizados com fins terapêuticos como sedativos, sedativos hipnóticos e anticonvulsivos. Geralmente são administrados por via oral, e os seus efeitos são semelhantes à intoxicação por álcool. O uso crônico leva à tolerância e dependência física. Menos de 5% de BAR inalterados são excretados na urina e o período de detecção pode variar entre 4 a 7 dias.

3. Benzodiazepinas

As benzodiazepinas (BZO) pertencem à classe de fármacos usados terapeuticamente como ansiolíticos, anticonvulsivos e sedativos hipnóticos, podendo ser usadas, também, como sedativos antes de alguns procedimentos cirúrgicos e médicos e para o tratamento de retirada de álcool. Existe um grande risco de tolerância dependência física quando consumido em doses acima do prescrito. Se ocorrer interrupção do consumo, pode causar sintomas como dificuldade em dormir, problemas gastrointestinais, indisposição, perda de apetite, suores excessivos, tremores, debilidade, ansiedade e alterações na percepção. Menos de 1% de BZO são eliminadas na forma inalterada na urina. A maior parte da concentração de BZO na urina está conjugada. O período de detecção na urina pode variar entre 3 a 7 dias.

4. Cocaína

A cocaína (COC) é um poderoso estimulante e anestésico que atua diretamente no SNC. O uso imediato provoca euforia, autoconfiança, sensação de aumento de energia e inquietude, acompanhado de aumento do ritmo cardíaco, febre, dilatação das pupilas, estado de inconsciência, dificuldades de respiração e gradualmente causa tremores e suores excessivos. O aparecimento na urina ocorre pouco tempo

depois do consumo, sob a forma de benzoilecgonina. Este metabolito da cocaína permanece concentrado no organismo durante 5 a 8h, enquanto a cocaína permanece entre 0,5 a 1,5h, podendo ser detetada após 24 a 60h do consumo de cocaína.

5. Marijuana

A marijuana é um alucinogénico pertencente à classe dos canabinóides, cujo princípio ativo é o tetrahydrocannabinol (THC). Quando utilizado em doses elevadas, este produz efeitos ao nível do SNC, alteração do humor e percepção sensorial, a memória é afetada a curto prazo e ocorre a perda do raciocínio; os utilizadores também podem apresentar episódios de confusão mental e ansiedade. A marijuana atinge o pico máximo após 20 a 30 minutos de ser consumida, podendo perdurar entre 90 e 120 minutos. O metabolito urinário, ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxílico, pode ser detetado na urina após exposição à droga e permanece por 3 a 10 dias.

6. Metadona

A metadona (MTD), é uma droga sintética, pertencente à classe dos opiáceos. Este é um poderoso analgésico com um efeito de sedativo hipnótico e pode ser usada no tratamento do vício da heroína. A metadona tem um alto poder aditivo, ainda que este seja inferior ao da heroína. A toma de doses extra de metadona e a mistura com sedativos ou álcool aumentam o risco de *overdose*. A MTD atua contra a dor entre 12 a 48h depois de consumida.

7. Metanfetaminas

As metanfetaminas (MET) estão quimicamente relacionadas com as AMP, porém a ação das MET no SNC é maior. Esta é uma droga estimulante produzida em laboratórios clandestinos e possui um alto poder de dependência. Em doses elevadas provoca efeitos e respostas semelhantes às AMP. As MET podem ser detetadas entre 2 a 4h após consumo, tendo a droga uma semivida de 9 a 24h no corpo. Esta é excretada na urina sob a forma de AMP e seus derivados, no entanto, cerca de 10-20% de MET são excretadas inalteradas na urina. Dependendo do nível de pH da urina, MET podem ser detetadas na urina durante 3 a 5 dias.

8. Metilenodioximetanfetamina

A metilenodioximetanfetamina (MDMA), mais conhecida como Ecstasy, é uma droga sintetizada em laboratório. Os utilizadores sofrem frequentemente de tensão muscular e suor excessivo. A MDMA não é considerada um estimulante, apesar de apresentar características comuns com AMP, causando aumento da pressão arterial e frequência cardíaca. O seu efeito na fisiologia humana é a diminuição da reabsorção da serotonina, dopamina e noradrenalina no cérebro, sendo que estas substâncias ficarão em maior contato entre as sinapses, causando euforia, sensação de bem-estar, alterações da percepção sensorial, nomeadamente à sensibilidade à luz, dificuldade de focalização e visão turva em alguns consumidores.

9. Opiáceos

Os opiáceos (OPI) derivam do ópio e na sua composição estão incluídos produtos naturais como morfina e codeína, assim como a droga semissintética heroína. Os analgésicos derivados de opiáceos incluem um agrupamento de substâncias que controlam dores de grau excessivo no SNC, são usados principalmente na terapia da dor crônica e da dor aguda de alta intensidade. Quando consumidos em doses elevadas, produzem euforia e bem-estar, estados hipnóticos e tolerância e dependência. A cessação do consumo leva a síndrome de abstinência, caracterizada por tremores, febre, suores excessivos, respiração rápida, ansiedade, hostilidade, vômitos e diarreia. A morfina é eliminada na urina, assim como a codeína e heroína. Podem ser detetados na urina mesmo após vários dias do uso de opiáceos.

10. Antidepressivos tricíclicos

Os antidepressivos tricíclicos (TCA) são normalmente usados para o tratamento de depressão crônica ou profunda, transtorno obsessivo-compulsivo, ansiedade e dor neuropática. A *overdose* por TCA resulta na depressão profunda do SNC, cardiotoxicidade e produz efeitos anticolinérgicos. Estes antidepressivos são administrados por via intravenosa e são metabolizados no fígado. Tanto TCA como os seus metabolitos são excretados na urina e detetados até dez dias após consumo.

ANEXO 29 - Teste de Gravidez *PregTest 3 HCG* da *ELITech*

O kit *PregTest 3 HCG* da *ELITech* é um ensaio imunocromatográfico qualitativo rápido para a detecção da hormona hCG na urina, de preferência a primeira da manhã, ou soro não hemolisado, como auxiliar na detecção precoce da gravidez.

A membrana cromatográfica, na região da linha teste, está impregnada com anticorpo policlonal anti-hCG de cabra e na região da linha de controlo, está impregnada com anticorpo policlonal anti-ratinho de cabra. Durante o teste, a amostra de urina ou soro reage com o conjugado de anticorpo monoclonal anti-hCG de ratinho corado com partículas de ouro coloidal, também, impregnado na membrana. A mistura de reação migra ao longo da membrana, originando uma linha vermelha. A presença da linha vermelha é indicativo de um resultado positivo e, por outro lado, a ausência desta linha é indicativo de um resultado negativo.

Independentemente da presença ou ausência de hCG, à medida que a mistura de reação migra ao longo da membrana até à região da linha de controlo, uma linha vermelha irá sempre aparecer, confirmando que o teste foi realizado devidamente.

ANEXO 30 - Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes com *HEM-CHECK 1* da *A. MENARINI Diagnostics*.

O teste com *HEM-CHECK 1* da *A. MENARINI Diagnostics* é um ensaio imunocromatográfico direto, rápido e qualitativo para a detecção de sangue oculto nas fezes para despistagem do cancro colo-retal.

O método emprega uma combinação única de anticorpos de fase sólida policlonais e anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos para identificar seletivamente a hemoglobina humana com elevada sensibilidade e especificidade.

Depois de recolhida num cartão de recolha específico, a amostra é colocada numa solução de extração, adicionando-se algumas gotas desta solução ao poço do dispositivo de reação. À medida que a amostra se espalha pelo dispositivo absorvente, os anticorpos conjugados com fluorocromos ligam-se ao antígeno da hemoglobina

formando um complexo antígeno-anticorpo. Este complexo liga-se ao anticorpo da hemoglobina na zona de reação produzindo uma linha cor-de-rosa. Na ausência de hemoglobina não surge qualquer linha na zona de reação. A mistura de reação continua a espalhar-se pelo dispositivo absorvente passando pelas zonas de reação e de controlo. O conjugado liberto liga-se aos reagentes na zona de controlo produzindo uma linha cor-de-rosa, confirmando que o teste foi realizado devidamente.

