U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório de Estágio

Raquel Catarina de Abreu Moreira Maia

Novembro 2018

Agradecimentos

Após a finalização deste relatório, pretendo agradecer de forma sincera e em geral a todos os que contribuíram para a realização do mesmo.

Destaco a Dra. Conceição Senra Furtado, do Laboratório Professor Doutor Joaquim Jorge Nunes de Oliveira & Cia., S.a. Sem ela teria sido impossível ter aprendido tanto sobre o que de tudo se faz num laboratório de análises clínicas e por toda a força e empenho para que eu conseguisse finalizar o meu estágio e relatório.

Agradeço ao Diretor Técnico do Laboratório, Dr. Jorge Nunes de Oliveira por me ter dado a oportunidade de realizar este estágio no seu laboratório tendo-me dado a liberdade de utilizar tudo o que achava necessário para ter as devidas competências.

Agradeço também à Dra. Lucília por me ter orientado no departamento de Microbiologia e Hematologia, à técnica Salomé, à técnica Alice que me ajudou muito no departamento de Bioquímica e Imunologia, e a todos os outros funcionários que me fizeram sentir bem-recebida.

Resumo

Este relatório de estágio do Mestrado de Análises Clínicas pretende descrever todo o trabalho feito durante o estágio, entre 3 de janeiro a 13 de abril, perfazendo as 450 horas obrigatórias. O estágio foi realizado no Laboratório Professor Doutor Joaquim Jorge Nunes de Oliveira & Cia., S.a.

Neste relatório descrevo quais análises clínicas realizei nos diferentes departamentos em que tive contacto e os seus respetivos métodos, nomeadamente na microbiologia, hematologia, bioquímica e imunologia.

Abstract

This internship report from the Master of Clinical Analysis aims to describe all the work done during the internship, from January 3 to April 13, making up the 450 mandatory hours. The internship was carried out at the Professor Joaquim Jorge Nunes de Oliveira & Cia., S.a.

In this report I describe what clinical analyzes I performed in the different departments in which I came in contact and their respective methods, namely in microbiology, hematology, biochemistry and immunology.

Índice Geral

Agradecimentos ----------i

Resumo e Abstract ----------ii

Índice geral----------iii

Índice de figuras ----------vi

Índice de tabelas ----------vii

Lista de Abreviaturas ----------viii

Colheitas ----------1

1. Sangue ----------1
2. Urina ----------4
3. Critérios de rejeição de amostras ----------5

Microbiologia ----------6

Introdução ----------6

Aparelho utilizado ----------6

Análise microbiológica de produtos ----------8

1. Urina ----------8
2. Exsudado nasal ou orofaríngeo ----------10
3. Expetoração ----------12
4. Exsudado auricular ----------14
5. Exame bacteriológico de fezes ----------15
6. Aspirados de líquidos biológicos ----------17
7. Exame micológico ----------18
8. Exsudados purulentos ----------21
9. Exsudado vaginal, cervical ----------22
10. Exsudado uretral e estudo do esperma----------25
11. Estudo Citobioquímico do Esperma (Espermocultura) ----------26

Bioquímica ----------28

Introdução----------28

Aparelho utilizado----------28

Hidratos de Carbono----------29

Lípidos----------29

Eletrólitos----------32

Função Hepática----------35

Enzimas musculares----------39

Enzimas pancreáticas----------40

Função Renal----------41

Função eritroide, metabolismo do ferro----------44

Proteínas----------48

Eletroforese de proteínas ----------51

Análise de urinas ----------53

Pesquisa de drogas de abuso ----------56

Exame a fezes ----------57

Hematologia ----------58

Introdução----------58

Hemograma, plaquetas e reticulócitos----------58

Contador hematológico Sismex XT 2000i----------59

Interpretação de histogramas ----------60

Validação dos hemogramas ----------61

Citologia ----------62

Velocidade de sedimentação ----------63

Hemoglobina glicosilada ----------64

Imuno-hematologia ----------65

Estudo da hemóstase ----------69

Imunologia ----------74

Introdução----------74

Áreas de estudo ----------74

Marcadores tumorais----------76

Serologia infeciosa ----------77

Testes Serológicos de Imunologia----------87

Reações de deteção de Treponema pallidum ----------88

Referências bibliográficas ----------90

Índice de figuras

Figura 1. Mesa de trabalho----------1

Figura 2. Diferentes tubos utilizados e restante material----------3

Figura 3. Vitek 2 Compact----------6

Figura 4. Carta de identificação (esquerda) e Carta de antibiograma (direita)----------7

Figura 5. Clue cells----------24

Figura 6. Cobas 6000----------28

Figura 7. Capillarys sebia 2----------52

Figura 8. Perfil eletroforético e zonas de localização das proteínas. A figura da direita indica a posição que o fibrinogénio ocupa quando presente----------53

Figura 9. Urisys 2400----------54

Figura 10. Sismex XT 2000i----------60

Figura 11. Histograma----------61

Figura 12. Alifax Test 1----------63

Figura 13. Biorad D10----------65

Figura 14. Aparelho VIDAS blue----------77

Figura 15. Marcadores clínicos da hepatite A----------82

Figura 16. Marcadores bioquímicos presentes nas várias fases de uma infeção por hepatite B----------83

Índice de tabelas

Tabela 1: Classificação de amostras segundo o critério de Murray e Washington------13

Tabela 2: Interpretação dos grupos sanguíneos----------67

Tabela 3: Análises imunológicas realizadas no Cobas e601 e e411----------74

Tabela 4: Interpretação de resultados dos marcadores tumorais----------76

Tabela 5: Parâmetros determinados no Vidas blue----------78

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PSA	*Prostate Specific Antigen*
AFP	Alfa-feto proteína
PTH	Paratormona
hGR	Hormona de crescimento
AST	Aspartato Aminotransferase
LDH	Desidrogenase lática
CK	Creatinina quinase
CK-MB	Creatinina quinase fração MB
PAP	Fosfatase ácida prostática
HCL	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
UFC/mL	Unidades Formadoras de colónias por mililitro
b.a.a.r.	Bacilos álcool ácido-resistentes
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	*Low Density Lipoproteins*
HDL	*High Density Lipoproteins*
VLDL	*Very Low Density Lipoproteins*
IDL	*Intermediate Density Lipoproteins*
LP(a)	Lipoproteína a
ALT	Alanina amino-transferase
$_{\gamma}$ - GT	Gama-glutamil transferase
ALP	Fosfatase alcalina

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
LDH	Lactato desidrogenase
TGF	Taxa de filtração glomerular
CTFF	Capacidade total de fixação de ferro
IgG, IgA e IgM	Imunoglobulinas G, A e M
PCR	Proteína C reativa
HGB	Hemoglobina
RBC/PLT	*Red Blood Cells*/Plaquetas
HDF	método da focagem hidrodinâmica
4DIFF	Diferencial
WBC/BASO	*White Blood Cells*/Basófilos
RET	Reticulócitos
DNA	*deoxyribonucleic acid*
RNA	*riboxynucleic acid*
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HbF	Hemoglobina Fetal
Rh	Rhesus
T.P.	Tempo de protrombina
INR	Razão Normalizada Internacional
ISI	Índex de Sensibilidade Internacional
APTT	Tempo de Tromboplastina Ativada
TSH	Hormona Estimulante da Tiroide
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiiodotironina

Anti-Tg	Anticorpo Anti-tiroglobulina
Anti-TPO	Anticorpo Anti-tiroperoxidase
FSH	Hormona foliculoestimulante
LH	Hormona Luteinizante
D.H.E.A.-S	Sulfato de DiHidroEpiAndrosterona
β – HCG	*Human Chorionic Gonadotropin*
CEA	*Carcino Embryotnic Antigen*
CA 15.3	*Carbohydrate Antigen 15.3*
CA 19.9	*Carbohydrate Antigen 19.9*
CA 125	*Carbohydrate Antigen 125*
ELISA	*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*
ELFA	*Enzyme Linked Fluorescent Assay*
E2	Estradiol
HAV	Vírus da Hepatite A
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CMV	Citomegalovírus
ANAs	Anticorpos Antinucleares
SRC	Síndrome da Rubéola Congénita
HBV	Vírus da Hepatite B
Ag HBs	Antigénio de superfície
Ag HBc	Antigénio de core
Ag HBe	Antigénio de *early*
HCV	Vírus da Hepatite C
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SLE	Lúpus Eritematoso Sistémico
TPHA	*Treponema Pallidum Hemaglutination Assay*

Colheitas

No primeiro mês de estágio comecei na parte da manhã a fazer colheitas e da parte da tarde no departamento de microbiologia. Como é evidente na primeira semana estive a observar o técnico de análises a colher e a adaptar os hábitos e os doentes à minha presença.

As colheitas neste laboratório e nos seus vários postos de colheita são efetuadas a partir das 7h30min até ás 10h30min. Claro que na sede há colheitas durante todo o horário de abertura, sendo que há colheitas que podem ser efetuadas a qualquer hora.

No fim da manhã chegam à sede do laboratório as várias amostras biológicas dos diversos postos de colheitas. Também aprendi como se processa a receção e registo das amostras. Aprendi como se processa a amostra desde que chega até dar o resultado analítico final ao clínico.

Neste laboratório seguimos o Manual de Boas Práticas.

1. Sangue

Geralmente utilizamos o sangue venoso nas análises bioquímicas, imunológicas e endocrinológicas, é facilmente obtido de uma veia da fossa antecubital com agulha e seringa e sistema de vácuo. Nesta região a veia preferida é a mediana, visto ser habitualmente grande e fixa aos tecidos. Outras veias que poderão ser puncionadas são as dos pulsos, das costas das mãos, a veia femural e a veia jugular, embora punção seja mais dolorosa e tenha mais probabilidade de causar hematoma.

Para a realização da punção da veia mediana, o braço do utente deverá ser posicionado sobre o braço da cadeira de colheita, para que a veia seja submetida a um certo grau de tensão e tenha uma mobilidade reduzida. A pele deve ser desinfetada com álcool a 70% e deixar secar. Aplica-se ao braço um garrote sem causar desconforto. Deve evitar-se a aspiração rápida do sangue para evitar a hemólise. Liberta-se o garrote antes de se retirar a agulha. Após a sua remoção faz-se pressão diretamente no local da punção com algodão esterilizado embebido em álcool, mantendo o braço direito ou

ligeiramente elevado. Após o estancamento completo da hemorragia, aplica-se o adesivo (**figura 1**).



Figura 1. Mesa de trabalho (imagem obtida durante o estágio)

Após a colheita o sangue é transferido para os tubos adequados. Na maioria dos exames bioquímicos, imunológicos e endocrinológicos há necessidade de soro, obtido por coagulação do sangue total, utilizando-se para isso um tubo de colheita sem anticoagulante com gel ativador (tubo seco – tampa vermelha). O soro resulta do sobrenadante do sangue após coagulação e centrifugação. A centrifugação da amostra só deverá ser realizada após coagulação completa da mesma.

Para algumas determinações, por exemplo Hormona adrenocorticotrofina **(ACTH)**, é necessário plasma, utilizando-se para isso um tubo de colheita com **anticoagulante EDTA** (tampa roxa), que atua por formação de um quelato com cálcio, impedindo a perda dos fatores de coagulação. A amostra é centrifugada, separada e congelada no posto de colheita.

Para algumas determinações, por exemplo **Hemoglobina glicosilada**, é necessário sangue total colhido com **EDTA**.

Para as determinações do estudo da hemóstase utiliza-se o sangue colhido com citrato sódico.

Ver figura com os diferentes tubos utilizados (**figura 2**).



Figura 2. Diferentes tubos utilizados e restante material (imagem obtida durante o estágio)

Para algumas determinações são necessários cuidados especiais:

- Para certas determinações é preferível evitar-se a determinação em ocasiões particulares: **PSA** depois do exame retal, biópsia, prostectomia ou massagem prostática; **AFP** para rastreio pré-natal após amniocentese;
- Para certas determinações é preferível a colheita a uma determinada hora: **ACTH** e cortisol (9 horas da manhã); **PTH** (colheita depois das 7 horas da manhã);
- Para certas determinações é necessário um repouso de 30 minutos antes da colheita: hormona de crescimento **(hGR)** e **prolactina**;
- Para certas determinações é necessário um jejum mais prolongado, de 12 horas: triglicerídeos, homocisteína;
- Para certas determinações é especialmente importante evitar-se a hemólise: sobretudo, **glucose**, **AST**, **LDH** e **potássio**, mas também **insulina** (diminui falsamente os resultados), **bilirrubinas**, **CK**, **CK-MB**, **homocisteína**, **fármacos**, fosfatase ácida prostática (**PAP**) e **ACTH**;
- Para certas determinações é imprescindível a refrigeração imediata: fosfatase ácida prostática (**PAP**), hormona de crescimento (**hGR**);

- Para certas determinações deve proteger-se o tubo seco com papel alumínio, evitando a exposição da amostra à luz: vitamina B6 e catecolaminas.
- Certas determinações devem ser efetuadas o mais próximo possível após colheita: C3c, fosfatase ácida prostática (**PAP**);
- Certas amostras devem ser congeladas se não efetuadas no dia da colheita: soro para pesquisa de Auto anticorpos por imunofluorescência indireta.

2. Urina

Para determinações urinárias é necessário a colheita da **Urina TipoII** ou de uma urina de 24 horas.

A **Urina TipoII** é colhida pelo próprio utente, devendo ser a primeira urina da manhã ou urina retida na bexiga há mais de duas horas. Deverá ser colhida em jejum. A colheita deve ser efetuada para um recipiente específico cedido pelo laboratório. Urinas contaminadas com sangue menstrual devem ser rejeitadas.

A urina de 24 horas poderá ser utilizada para as seguintes determinações: **creatinina, clearance da creatinina, proteínas totais, microalbuminúria, ureia, ácido úrico, cálcio, fósforo inorgânico, magnésio, α-amílase, ionograma**. Para a sua correta obtenção o utente deverá rejeitar a primeira urina da manhã, colhendo de seguida toda a urina até ao dia seguinte (primeira urina da manhã seguinte inclusive), devendo a colheita ser efetuada para um recipiente próprio fornecido pelo laboratório.

Para algumas determinações são necessários cuidados especiais:

- Para certas determinações é preferível evitar-se a determinação em ocasiões particulares: **microalbuminúria** após exercício intenso, cirurgia, infeção urinária ou patologia renal aguda;
- Para certas determinações não congelar a urina: **microalbuminúria**;
- Certas determinações devem ser efetuadas o mais próximo possível após colheita**: β2-microglobulina**.

3. Critérios de rejeição de amostras

Utilizam-se os seguintes critérios de rejeição de amostras:

- Ausência de identificação ou identificação incorreta;
- Mau acondicionamento ou transporte;
- Volume insuficiente;
- Amostras significativamente hemolisadas.

Microbiologia

Introdução

No departamento de microbiologia estive 4 semanas e fiz um pouco de tudo o que neste departamento se faz com a orientação da chefe do departamento, Dra. Lucília e das técnicas de laboratório que lá trabalham.

Neste departamento de microbiologia chega todo o tipo de amostras biológicas, como urinas, exsudados orofaríngeos, exsudados vaginais, expetorações, exsudados purulentos (pus de ferida), fezes ou qualquer outro tipo da amostra biológica que seja de interesse clínico.

Conforme o tipo de amostra, ela é direcionada primeiro para semear nos meios de cultura apropriados dependendo do tipo de microrganismo que queremos isolar. Só depois é que fazemos os exames a fresco e/ou coloração destes produtos pois no contacto com a lâmina o produto perde a esterilidade.

Aparelho utilizado

Vitek 2 Compact

O aparelho Vitek 2 Compact (**figura 3**) é utilizado no laboratório para a identificação de isolados bacterianos e realização de antibiogramas.

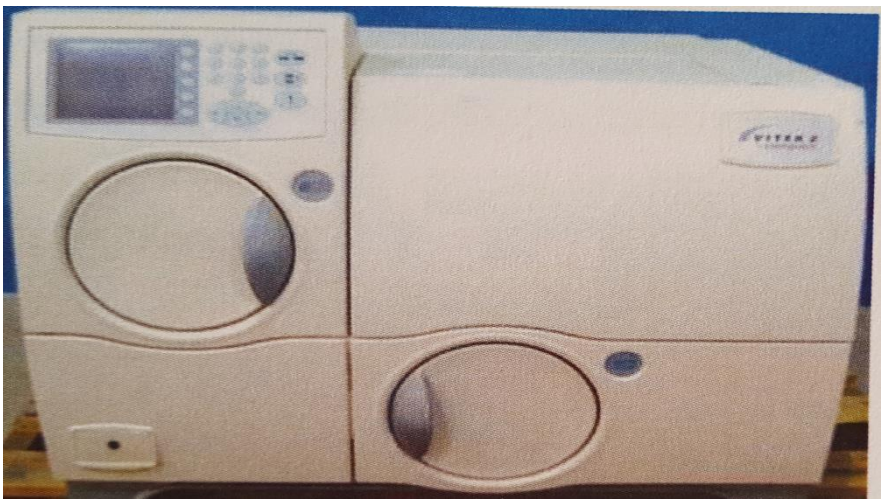


Figura 3. Vitek 2 Compact

Para este sistema existem 2 tipos de cartas (**figura 4**):

- **Cartas de identificação**: cada carta desta possui poços com substratos bioquímicos desidratados.

    - **GN –** Identificação de Gram negativo;
    - **GP** _ Identificação de Gram positivo;

- **Cartas de antibiograma**: cada carta desta possui poços com substratos de antibióticos.

    - **Ast – N244** – Antibiograma para Gram negativo
    - **Ast – P586** – Antibiograma para *Enterococcus* spp.
    - **Ast – P619** – Antibiograma para *Staphylococcus* spp.
    - **Ast – N222** – Antibiograma para *Pseudomonas* spp.

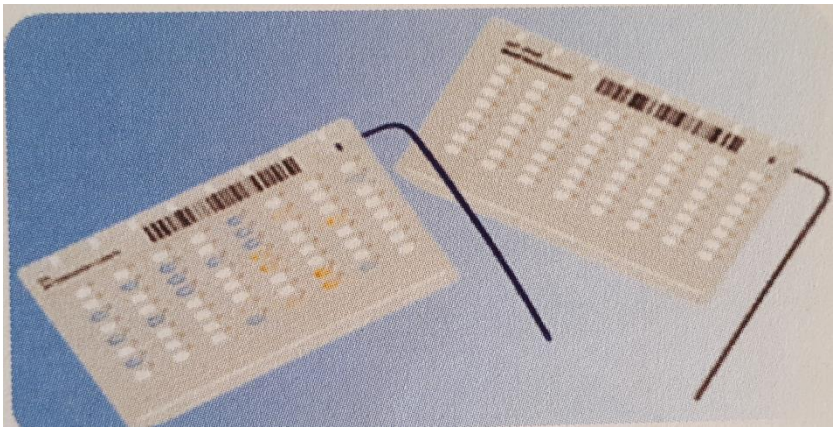


Figura 4. Carta de identificação (esquerda) e Carta de antibiograma (direita)

Todos os microrganismos isolados das diversas amostras e, com interesse clínico, são identificados e é feito o respetivo antibiograma por este sistema, permitindo uma maior segurança nos resultados. As cartas são seladas, o que permite reduzir ao máximo o risco de contaminações.

O procedimento para a realização dos testes de identificação dos microrganismos isolados e dos seus testes de sensibilidade aos antibióticos, através do sistema **Vitek 2 Compact**, é executado segundo as indicações do fornecedor.

Análise microbiológica de produtos

1. Urina

Introdução

As Infeções do Trato Urinário (ITU/UTI) são divididas em:

1. urinárias e
2. outras.

As urinárias são as a) cistites (infeções baixa) ou b) pielonefrites (infeção alta).

As 2. Outras são a) prostatite, b) orquite e c) epididimite.

As ITU são classificadas em ITU complicadas e ITU não complicadas.

As ITU complicadas têm como grupos de risco os algaliados, imunosuprimidos, anormalidades no trato urinário e exposição a antibióticos.

As ITU não complicadas os grupos de risco são ser do género mulher, idosos e jovens.

As bactérias que mais frequentemente afetam o trato urinário destacam-se as Gram Negativas da família da Enterobateriaceae a que pertence a *Escherichia coli (*UPEC-E: coli uropatogénica*), Klebsiella spp., Proteus spp.* e outras desta família; e de outra família a *Pseudomonas aeruginosa.*

Nas Gram Positivas destacam-se o *Staphylococcus spp* (mais frequente o *S. saprophyticus*), o *Enterococcus spp* e o *Streptococcus spp* Grupo B.

Colheita da amostra

A urina é um produto biológico que se pensava que era totalmente estéril, mas estudos recentes confirmam que não é bem assim. Durante a micção, a passagem pela a uretra arrasta alguns microrganismos qua a colonizam, podendo causar alguns problemas na interpretação do resultado da uro cultura.

Existem vários tipos de colheita:

- Colheita asséptica do segundo jato de micção

- Colheita da **Urina 24h**

- Colheita supra-púbica

- Colheita por algaliação – cateter vesical

- Colheita com saco pediátrico

Cuidados a ter na colheita asséptica do segundo jato de micção:

- Lavagem dos genitais externos (água e sabão)

- Recolha da primeira micção do dia diretamente para um recipiente estéril (sem entrar em contato com os órgãos genitais)

- Excluir o primeiro jato de urina

- Tapar o recipiente e evitar a sua exposição à luz e ao calor até à entrega no laboratório, idealmente nas primeiras 2h. Caso, não seja possível a amostra deve ser refrigerada.

Procedimento laboratorial

1. Exame direto:

Exame direto a fresco do sedimento urinário:

Centrifugação de 10ml de urina a 3000 rpm /15 minutos e do sedimento fazer o exame citológico.

Observação ao microscópio ótico do sedimento urinário, podendo ser observadas células epiteliais do trato urinário inferior ou superior, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais, bactérias e fungos

2. Exame cultural:

Serve para isolar o agente bacteriano responsável pela infeção urinária

As urinas são semeadas em meio Gelose CPS ID3 da BioMèrieux- meio cromogénico.

3. Quantificação e identificação bacteriana:

Após a incubação na estufa de 37ºC, as placas são observadas e é feita a contagem de colónias, de acordo com o descrito no folheto informativo do meio. Caso o resultado da cultura seja de significado clínico, procede-se para a identificação e antibiograma de acordo com as características macro e microscópicas da bactéria isolada no aparelho **Vitek 2 Compact**.

Interpretação de Resultados

Se as condições de colheita e de transporte forem adequadas, contagens de 10 000 (10^4 UFC/mL) a 100 000 (10^5 UFC/mL) podem ser significativas de infeção. Podem-se seguir os seguintes critérios:

Nº de UFC/ mL > 10^5 infeção urinária

Nº de UFC/mL < 10^4 contaminação uretral ou vaginal

Nº de UFC/mL entre 10^4 – 10^5 deve ser avaliada segundo os critérios clínicos

Uma urina contaminada geralmente apresenta mais do que um tipo de colónias, diz-se que urina é não valorizável e tem p.m.p (população microbiana polimorfa). Quando uma urina é infetada, geralmente tem um só tipo de colónias. Exceto no caso de doentes algaliados, em que se valorizam até 3 microrganismos diferentes.

2. Exsudado nasal ou orofaríngeo

Introdução

As infeções do trato respiratório superior provocam 10 milhões de mortes / ano em todo Mundo, sendo a doença mais comum pela qual os indivíduos recorrem aos cuidados médicos em Países Industrializados. Estas infeções podem ser de origem bacteriana ou víria.

As infeções da nasofaringe e orofaringe encontram-se colonizadas por uma flora polimorfa Gram Positiva.

Dentro da flora comensal há vários microrganismos potencialmente patogénicos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e leveduras.

Colheita da amostra

Exsudado nasal ou orofaríngeo é colhido com zaragatoa.

Procedimento laboratorial

Exame direto:

Coloração de Gram
- avaliação da flora
- deteção de leucócitos e células epiteliais

Exame cultural:

Os exsudados nasais são semeados em CPS + Gelose Chocolate + PolyVitex (PVX) e em MRSA2 (meio cromogénico) quando for pedido pelo clínico e deixar incubar 18 a 24h na estufa a 37ºC.
Fazer a Prova da Coagulase, se necessário
Fazer a Prova da Catalase, se necessário

Interpretação de resultados

O isolamento de *Staphylococcus aureus, Moraxella catarrhalis, S. pyogenes*, entre outros, pode não ter significado de uma infeção por estes agentes, visto que eles fazem parte da flora normal da nasofaringe. Devemos ter em atenção a desequilíbrios na flora saprófita e procurar ver se existe algum predomínio de algum tipo de colónias, ou se há colónias potencialmente sugestivas de patogénicos como *Streptococcus pneumoniae, Haemophlus influenzae* e *Neisseria meningitidis.*

No exsudado faríngeo, a pesquisa é orientada para os *Streptococcus* beta – hemolítico do grupo A de Lancefield (*S. pyogenes*).

3. Expetoração

Introdução

Este produto biológico envolve bactérias tanto do trato respiratório superior como do trato respiratório inferior que não deviam ter passado para essa zona. Esta parte do aparelho respiratório é protegida por ex. por epitélio ciliado e produz um muco.

As infeções do trato respiratório inferior podem ser agudas ou crónicas.

As agudas envolvem a traqueia e a árvore bronquial (traqueítes, bronquites e bronquiolites) e/ou o tecido pulmonar (alveolite, pneumonia e tosse convulsa).

As crónicas são a tuberculose, abcessos pulmonares, fibrose quistíca, nocardiose e etc.

Entre os sintomas mais comuns estão a tosse e a produção de expetoração.

As bactérias mais frequentes, nas infeções comuns são:

- *Streptococcus pneumoniae;*
- *Haemophilus influenzae;*
- *Moraxella catharralis;*

No caso de bronquites crónicas, a predominância dos isolados é de *Haemophilus influenzae* e *S. pneumoniae*.

Nos imunodeprimidos, os agentes mais comuns para isolar são *Klebsiella spp*, *Pseudomomnas spp.*

Colheita da amostra

Amostra representativa (tosse profunda, primeira da manhã, lavagem da boca com água).

Natural ou induzida

São 3 amostras de 3 dias diferentes pois é mais fiável para a pesquisa de micobactérias e fungos.

Claro que não deve ser usado para o diagnóstico de anaeróbios.

Transporte em frasco estéril, manipulada até 2h após a colheita ou refrigerada.

Aspirados traqueais devem ser encarados na mesma forma que a expetoração no que diz respeito à análise.

Procedimento laboratorial

Exame direto

- Avaliação macroscópica e microscópica da expetoração
- Escolher a parte mais purulenta da Amostra e não a saliva

- Efetuar 3 lâminas por cada amostra de cada dia perfazendo um total de 9 lâminas. Faz-se uma para a coloração de **Gram**, outra para a coloração de **Ziehl-Neelsen (b.a.a.r.)** e outra para se quisermos repetir.

Para avaliar a qualidade da amostra a partir do exame direto, observa-se ao microscópio (sem luz) a coloração Gram com a objetiva de 10x

Se é Boa: <10 cel. epiteliais; 25 neutrófilos

ou Neut. /cel. epiteliais > 5:1

Tabela 1: Classificação de amostras segundo o critério de Murray e Washington

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

Sendo uma Boa amostra podemos fazer o exame cultural

Exame cultural:

Os meios usados são Columbia agar + 5% sangue de carneiro, CPS e Gelose Chocolate + PolyViteX.

Interpretação dos resultados

Se o número de leucócitos é baixo, o Ziehl é negativo e a flora bacteriana na placa é polimorfa, então o exame cultural não tem significado clínico.

Se houver um número elevado de leucócitos e a flora é monomórfica ou com predomínio claro, devemos proceder à identificação e teste de suscetibilidade a antibióticos.

4. Exsudado auricular

Introdução

Este produto biológico também pertence ao trato respiratório superior, o ouvido interno e médio.

A otite média é uma patologia muito comum em latentes e crianças, uma vez que, a trompa de Eustáquio ainda está muito aberta. A maioria destes episódios tem origem viral e os patogénicos bacterianos são originários da nasofaringe, tais como, o *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*, e algumas vezes *Streptococcus pyogenes* ou *Moraxella catarrhalis* ou *Proteus mirabilis.*

A otite externa é semelhante ás infeções da pele e dos tecidos moles, com a agravante de o canal auditivo ser estreito e tortuoso. O ambiente húmido e temperado favorece a colonização por *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes*, e alguns oportunistas Gram negativos, como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*.

Colheita da amostra

Ouvido externo:

Colher exsudado auricular com uma zaragatoa.

Ouvido interno:

O exsudado é colhido pelo otorrinolaringologista e enviado ao laboratório em recipiente estéril.

Procedimento laboratorial

Exame direto:
Observação do esfregaço corado de Gram

Exame cultural:
Semear em Columbia agar + 5% sangue de carneiro, Gelose Chocolate + PolyViteX e meio Gelose CPS ID3 da BioMérieux.

Interpretação de resultados

Após o período de incubação das placas, fazer a leitura das mesmas e realizar a identificação e o respetivo teste de suscetibilidade a antibióticos das colónias suspeitas.

5. Exame bacteriológico de fezes

Introdução

As infeções do trato gastrointestinal podem ser devidas a bactérias e/ou pelas toxinas produzidas por elas no hospedeiro, por ex.:

Gastroenterite,

Bacteriemia,

Febre tifoide

A principal via de transmissão é a via fecal-oral.

Os principais veículos de transmissão são a água e a comida contaminada.

Os principais sintomas destas infeções são diarreia, vómitos, náuseas, dores abdominais e às vezes febre.

Normalmente estas infeções são autolimitadas, mas ás vezes alguns doentes com diarreias infeciosas precisam de estudos de diagnóstico e tratamento.

De entre os microrganismos mais comuns nas infeções do trato gastrointestinal encontram-se *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Campylobacter* sp.

Podendo também ser devido E. coli (serotipos EPEC, EHEC, ETEC, EIEC), *Vibrio cholerae (*outras *Vibrionaceae), Yersinia enterocolitica, Bacillus cereus, Clostridium perfringens.*

Colheita da amostra

Devem ser colhidas 3 amostras de 3 dias diferentes e alternados e conservadas no frigorífico até entrega no laboratório.

Procedimento laboratorial

Exame macroscópico:

Deve-se registar se as fezes são fezes formadas ou diarreicas, se têm a presença de muco, se têm a presença de sangue ou outra observação considerada importante (por ex. a presença de parasitas).

Exame direto:

Coloração de Gram

Exame cultural:

As fezes são semeadas em caldo Selenito F (caldo de enriquecimento), meio CPS, Gelose Hektoen Enteric Agar(HE).

Exame parasitológico:

Método de Willis:

Num tubo de centrifuga deitar uma solução saturada de cloreto de sódio, e juntar um pouco de fezes;

Perfazer o volume do recipiente até formar um menisco convexo no topo;

Sobre o tubo colocar uma lamela e deixar repousar por 20 minutos;

Colocar a lamela sobre a lâmina e ver ao microscópio.

Interpretação de resultados

Se houver crescimento de colónias suspeitas no meio Hektoen Enteric Agar que é um meio moderadamente seletivo e diferencial, isto é, aparecimento de colónias azuladas ou com produção de H2S que é indicado pela presença de colónias com centro preto, faz-se a identificação no Vitek 2 Compact podendo suspeitar de *Salmonella* sp e *Shigella* sp.

6. Aspirados de líquidos biológicos

Introdução

Existem alguns aspirados de líquidos biológicos mais comuns vindos de cirurgias ou de biopsias. Como por exemplo, aspirado líquido da anca, aspirado do joelho, aspirado de líquido sinovial.

Estes aspirados devem ser sempre tratados com cuidado pois à partida são produtos estéreis. Devem ser manipulados na câmara de fluxo laminar e com o bico de Bunsen ligado.

Colheita da amostra

Colheita é feita por médicos e colocada em recipiente estéril.

Procedimento laboratorial

Quando o produto vem em seringa devemos primeiro rejeitar as primeiras gotas, esterilizar à chama.

Exame cultural

Semear em meio Columbia agar + 5% sangue de carneiro (sementeira de 4 quadrantes).

Fazer um Caldo de enriquecimento em Soja (vortexar e colocar na estufa a 36%)

Fazer coloração de Gram

Interpretação de resultados

Verificar o crescimento e aspeto das colónias no meio.

Verificar se o meio de enriquecimento está límpido ou turvo. Deixar a incubar na estufa a 36ºC durante 24h. se não tiver turvo esperar durante 15 dias e verificar todos os dias. Se estiver turvo então fazer um Gram

7. Exame micológico

Introdução

Os fungos patogénicos mais comuns em doenças infeciosas da pele glabra, cabelo e unhas são os dermatófitos e geralmente as micoses causadas por estes fungos

são de localização única e autolimitada. Estes fungos possuem predileção por locais quentes e húmidos (virilhas, axilas, região interdigital).

Colheita da amostra

O exame micológico depende muito da colheita do produto patológico.

A quantidade de produto é muito importante para um bom resultado.

No caso de lesões múltiplas devem ser efetuadas colheitas separadas.

Material de colheita:

Raspador de Vidal
Bisturi, lâmina sem fio de corte
Lâmina de vidro
Pinça
Tesoura
Zaragatoa
Fita adesiva

Conservar:

Temperatura ambiente
24 horas (Em 12 meses pode manter a viabilidade)

Lesões na pele (escamas e crostas)

Minimizar as contaminações secundárias passando álcool a 70%;

Raspar vários pontos da pele principalmente os bordos da lesão;

Raspar vigorosamente com material não cortante, não provocar hemorragia;

Fita adesiva (exame direto)

Couro cabeludo e barba

Remover os cabelos atingidos com pinça, das zonas de alopecia, incluindo a raiz, quebrados na região de emersão do folículo piloso

Colher as escamas

Observar sob lâmpada de Wood (U.V. 360nm) se necessário para ver as hifas.

Lesões nas unhas

Remover partículas de unha afetada, na zona de contacto com o tecido são: Material de hiperqueratose e do bordo livre não é ideal, retirar esse material até à matriz ungueal.

Lavar com álcool a 70%

Colher o pus, no caso de perioníquia, leito ungueal.

Onicomicoses superficial branca (mancha esbranquiçada):

Raspar por cima da lesão com bisturi.

<u>Procedimento laboratorial</u>

Exame cultural:

Os produtos são semeados em Gelose Sabouraud Gentamicina Clanfenicol 2

<u>Interpretação de resultados</u>

Os resultados obtidos diferem em consonância com o tipo de produto. No caso de amostras de pelo, cabelo e pele é habitual a presença de dermatófitos (ex. *Microsporum* spp, *Trichophyton* spp*. Epidermophyton* spp. e nalguns casos de *Candida* sp e *Malassezia* (*Candida albicans* é um fungo de origem endógena).

8. Exsudados purulentos

Introdução

As secreções (pus) provenientes de supurações superficiais e de abcessos são heterogéneas tanto pela natureza dos agentes bacterianos como pela fisiopatologia da infeção. As infeções, quer endógenas quer exógenas, são sobretudo devidas a bactérias aeróbias e a fungos.

Colheita da amostra

Limpar a ferida com uma zaragatoa embebida em soro fisiológico estéril;

Com uma zaragatoa recolher o exsudado ou pus da ferida;

Colocar a zaragatoa no meio de transporte;

Com outra zaragatoa fazer o esfregaço em duas lâminas.

Procedimento laboratorial

Exame direto:

Coloração de Gram

Exame cultural:

A amostra é semeada em Columbia agar + 5% sangue de carneiro, Gelose CPS ID3, Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 e caldo de enriquecimento Todd-Hewiit (agitar com ajuda do agitador mecânico-Vortex).

Interpretação de resultados

Caso haja crescimento de colónias suspeitas de causar infeção ou colónias puras, é fazer a identificação e respetivo antibiograma no **Vitek 2 Compact**.

9. Exsudado vaginal, cervical

Introdução

As infeções genitais são infeções que ocorrem no trato genital feminino/masculino provocadas por um agente etiológico capaz de provocar síndromes clínicos e doenças.

O trato genital é dividido em trato genital inferior e superior. No inferior as infeções são adquiridas sexualmente ou por contato direto tanto na mulher como no homem (mais na uretra). As infeções no trato genital superior frequentemente é uma extensão da primoinfeção do trato genital inferior e os microrganismos que colonizam a vagina/ cérvix migram pela cavidade uterina e colonizam os seus órgãos.

As infeções são classificadas em **exógenas** e **endógenas.**

As **exógenas** são adquiridas através da transmissão sexual de microrganismos patogénicos dando origem ás doenças sexualmente transmissíveis (**DST**). Podem ser provocadas por bactérias *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum, Haemophilus ducray,* por parasitas *Trichomonas vaginalis* e por vírus Herpes simples vírus, HPV, HIV.

As infeções **endógenas** resultam de desequilíbrios da flora normal do paciente podendo provocar **V**aginose **B**acteriana e quando provocada por fungos é devido á *Candida albicans*.

As síndromes clínicas mais comuns **na mulher** são vaginite, cervicite, uretrite, doença inflamatória pélvica, úlceras genitais e proctite, e **no homem** são uretrite, epididimite, úlceras genitais, orquite, prostatite e proctite. Podem surgir infeções múltiplas. Doenças mais frequentes na mulher **V**aginose **B**acteriana, **C**andidíase (*Candida albicans*), **T**ricomoníase (*Trichomonas vaginalis).* A **V**aginose Bacteriana é devido ao aumento *Gardnerrella vaginalis,* bactéria normal da flora normal da flora vaginal e outros microrganismos; esse aumento é devido a lavagens sucessivas, múltiplos parceiros sexuais e antibióticos.

No caso das grávidas, no 3º trimestre de gravidez (35 semanas), faz-se a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo beta – hemolítico do grupo B), para prevenir a contaminação materno-fetal. Esta bactéria é responsável por meningites, septicemias e pneumonias no recém-nascido.

Colheita da amostra

Para obtermos o **exsudado vaginal** basta introduzir a zaragatoa na vagina.

Para o **exsudado cervical** já é preciso introduzir o espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico, colher o exsudado do fundo do saco posterior e/ou paredes vaginais com a zaragatoa inserida alguns milímetros passando o canal cervical e depois é rodada firmemente. Repetir a operação com 2ª zaragatoa e efetuar o esfregaço após a colheita.

Procedimento laboratorial

Exame a fresco:

Pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e leveduras no exame a fresco de **exsudado vaginal**.

Coloração de Gram:

Visualização da flora

Exame cultural:

Semear as amostras dos exsudados em Columbia agar + 5% sangue de carneiro, Gelose de Chocolate + PolyViteX, Gelose CPS ID 3 e Gelose chromID Candida.

Interpretação de resultados

Após a observação dos meios de cultura é feita a identificação e antibiograma das colónias suspeitas.

O diagnóstico da *Gardnerella vaginalis* é feito pela presença de pelo menos três dos quatro seguintes critérios (**critérios de Amsel**): corrimento branco ou cinzento, homogéneo e viscoso; fluido vaginal pH>4,5; liberação de odor amina, semelhante a peixe; microscopia.

Ao microscópio optico, a observação do Gram apresenta densos agregados de bacilos Gram negativo ou Gram variável, em células epiteliais e à volta delas. Esta células são designadas “clue cells” (figura 5).

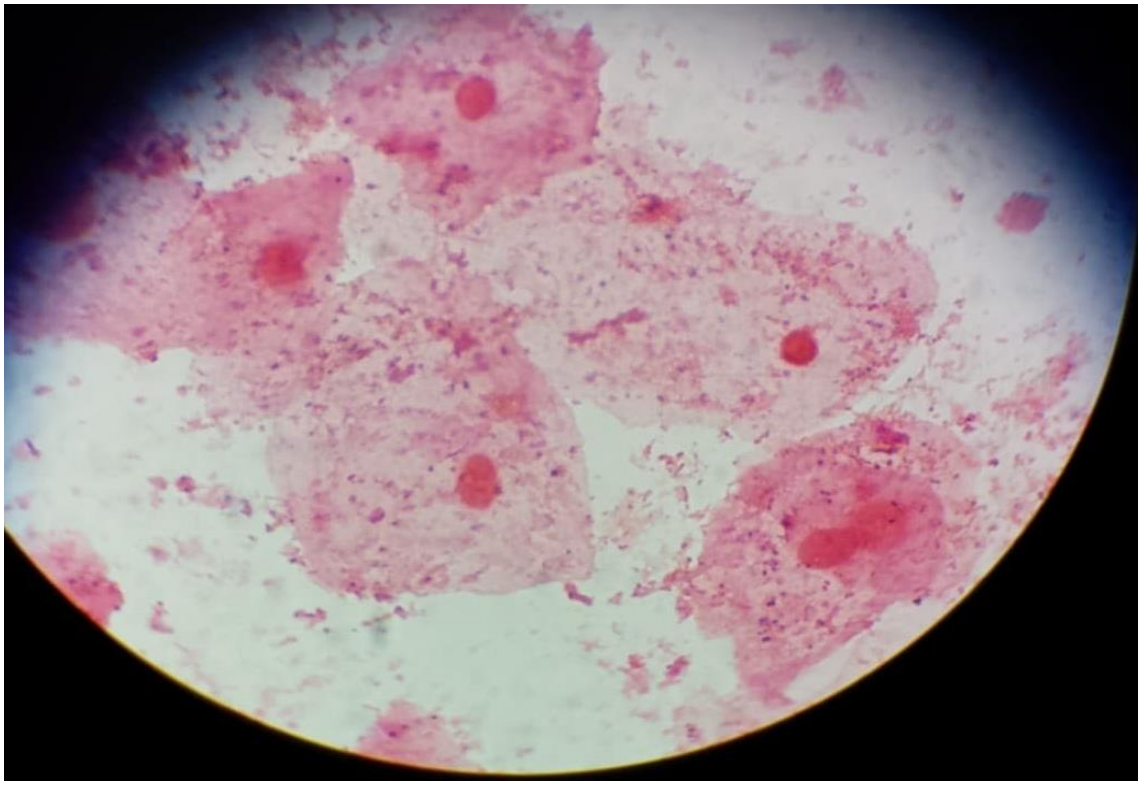


Figura 5. Clue cells (imagem obtida durante o estágio)

10. Exsudado uretral e estudo do esperma

Introdução

No homem os principais agentes de infeção são *Clamydia Trachomatis* (parasita intracelular obrigatório), *Neisseria gonorrhoeae* (homem é o único hospedeiro), Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp, na prostatite.

A *Neisseria gonorrhoeae* dá sintomas no homem de disúria e exsudado uretral purulento e como complicações são epididimite, prostatite e abcesso periuretral.

Colheita da amostra

No homem a colheita do **exsudado uretral** deve ser feita antes da primeira urina da manhã, inserir o cotonete no orifício uretral, e rodar 360 graus durante 5-10 segundos para colher algumas células epiteliais.

Para o estudo do esperma é pedir ao homem para ejacular para um frasco estéril de boca larga.

Procedimento laboratorial

Exame direto:

Coloração Gram com diplococos Gram-negativo no citoplasma de células inflamatórias.

Fazer das colónias quando o meio de transporte é líquido senão esperar 24h e fazer do meio Gelose de Chocolate + PolyViteX.

Interpretação de resultados

Quando colónias suspeitas fazer Gram e prova da oxidase.

Em casos de infeção gonocócica urogenital a prova da oxidase é positiva e os diplococos Gram negativo no Gram são geralmente suficientes para estabelecer um diagnóstico presuntivo.

11. Estudo Citobioquímico do Esperma (Espermocultura)

Introdução

Este tipo de exame é para avaliação multiparamétrica do Esperma.

A espermocultura é usado sobretudo na investigação da infertilidade e na eficácia da vasectomia.

Aplica-se a amostras biológicas de esperma nas quais se pretende determinar **V**olume, **C**or, **C**heiro, **L**iquefação aos 60 minuto, **V**iscosidade, **p**H, **M**obilidade aos 30`, **M**orfologia, **C**ontagem do número de Espermatozoides.

Colheita da amostra

A colheita e tratamento da amostra devem cumprir com rigor o descrito no **Manual de Colheitas**, isto é, recomenda-se que a colheita seja efetuada após um período de 3 dias de abstinência sexual, idealmente colhida no próprio laboratório, mas quando colhida no domicílio do paciente seja entregue de imediato e a amostra é incubada a 37ºC durante 30`.

Procedimento laboratorial

Para medir o **V**olume deve-se transferir por decantação a amostra para uma pipeta graduada e proceder à sua medição.

Deve-se observar a **V**iscosidade na decantação da amostra para a pipeta e também na pipeta de pasteur.

A **C**ontagem dos espermatozoides é na camâra de Newbeaur.

A coloração com eosina é para ver a Vitalidade,etc…

Bioquímica

Introdução

Neste departamento chega tubos de soro e frascos de urina para análise. Na triagem de produtos, os tubos são centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos e posteriormente distribuídos pelos vários sistemas automáticos para análise.

Aparelho utilizado

Sistema cobas c501 e e601

O **sistema cobas c501 e e601** (figura 6) é o aparelho utilizado para a realização da maioria das análises no departamento de bioquímica. Este aparelho utiliza como métodos a espetroscopia UV e visível, turbidimetria, potenciometria e imunoturbidimetria.

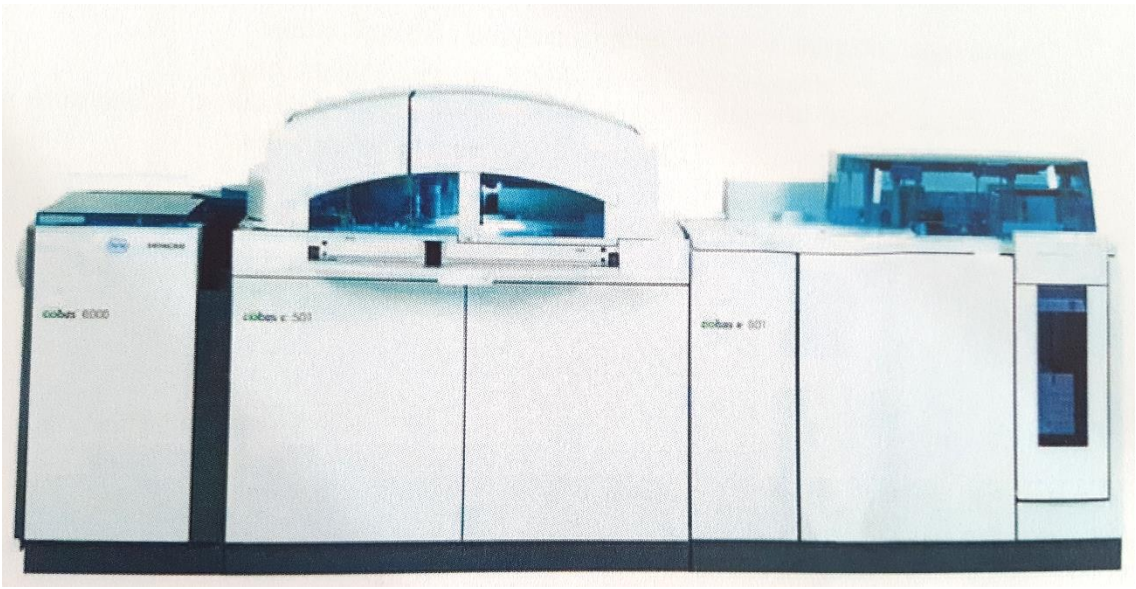


Figura 6. Cobas 6000

As amostras são processadas a partir de racks introduzidas, e são identificadas através de código de barras. Assim o aparelho distingue entre amostras de doentes (soro e urina), controlos, calibradores, e amostras para fazer os brancos dos reagentes.

Hidratos de carbono

- Glucose

Método

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

O doseamento da glucose é feito em jejum e pós-prandial, uma ou duas horas após a refeição, a fim de testar a elevação do valor da glucose no indivíduo e a sua estabilização respetivamente.

Também se faz a **P**rova de **T**olerância **O**ral à **G**lucose, por exemplo nas grávidas e diabéticos. Nesta prova o doente ingere 75g de glucose, sendo feita a colheita 2 horas após a toma ou, no caso das grávidas, é feita a colheita aos 60 e aos 120 minutos para despiste da Diabetes Gestacional.

Interpretação do resultado

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

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

Esta análise permite o despiste de várias patologias como a *Diabetes mellitus,* e a diabetes gestacional.

Lípidos

- Colesterol

Introdução

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

Método

É utilizado um método enzimático por espectrofotometria, para medir o colesterol no soro e plasma humanos.

Os ésteres de colesterol são clivados através da ação da colesterol esterase e produzem colesterol livre e ácidos gordos. Com a ajuda do colesterol oxidase, o colesterol é transformado em colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio produzido origina uma coloração vermelha através da reação com a 4-aminofenazona e o fenol, sob a ação catalítica da peroxidase. O colesterol é então medido espetrofotometricamente a 540/600 nm e como um aumento na absorvência é proporcional à concentração de colesterol no soro.

Interpretação de resultados

Os *valores de referência* estabelecidos são:

- Normal: < 200 mg/dl;

- Risco cardiovascular moderado: 200-239 mg/dl;

- Risco cardiovascular elevado: > 240 mg/dl.

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

- **Colesterol LDL e HDL**

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

Existem 6 categorias de lipoproteínas:

- ✓ **Quilomicrons**;

- ✓ **VLDL** – *Very Low Density Lipoproteins* – Lipoproteínas de densidade muito baixa;
- ✓ **IDL** – *Intermediate Density Lipoproteins* – Lipoproteínas de densidade intermédia;
- ✓ **LDL** – *Low Density Lipoproteins* – Lipoproteínas de densidade baixa;
- ✓ **HDL** – *High Density Lipoproteins* – Lipoproteínas de alta densidade
- ✓ **LP(a)** – Lipoproteína a

Colesterol HDL

Método

A determinação do colesterol **HDL** é feita por um ensaio enzimático do soro.

Interpretação de resultados

Um valor de colesterol **HDL** inferior a 45 mg/dl significa um risco mais elevado de arteriosclerose que está associada a um maior risco de doença cardíaca e de doença coronária. Enquanto um valor maior que 45 mg/dl é um fator favorável ao não desenvolvimento de arteriosclerose.

Colesterol LDL

Método

A sua determinação é feita segundo a fórmula de Fredwald:

Colesterol LDL= Colesterol Total – HDL- Triglicerídeos / 5

Esta fórmula, contudo, só é valida para um valor de triglicerídeos menor ou igual a 400 mg/dl.

Interpretação de resultados

Triglicerídeos elevados apresentam risco aterogénico. Assim, um valor de triglicerídeos maior que 200mg/dl, apresenta um risco de aterosclerose mais elevado, enquanto que um valor abaixo de 100 mg/dl apresenta um baixo risco.

Eletrólitos

Não há quase processos metabólicos que não dependam ou não sejam afetados por eletrólitos. Dentro dos eletrólitos principais temos: **Na+**, **K+**, **Cl-**, **HCO3-**, **Mg 2+**, **Ca2+**, **H2PO4-** e **SO4 2**-. A maioria circula sob a forma livre, enquanto alguns como o **Mg2+** e o **Ca2+** circulam ligados a proteínas, como a albumina.

- **Sódio, Potássio e Cloretos**

Método

A determinação destes eletrólitos é feita pelo módulo ISE do aparelho. Este módulo possui elétrodos específicos para cada ião. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a Equação de Nernst para cada ião específico. Quando comparado com uma referência interne, este potencial elétrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões da amostra.

- **Magnésio**

Método

É utilizado um método direto no qual os iões de magnésio formam um complexo colorido com azul de xilidil em ambiente básico. A cor produzida é medida a 520/800 nm, sendo proporcional à concentração de magnésio na amostra.

- **Sódio**

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Soro: 136 – 146 mmol/L;
- Urina: 40 – 220 mmol/ dia.

Quando o valor de sódio no soro se encontra abaixo do valor de referência, estamos perante uma **hiponatrémia.** A **hiponatrémia** pode ocorrer devido a perdas excessivas, por exemplo, pelo trato gastrointestinal, sem que haja uma reposição apropriada dos eletrólitos, cirrose, síndrome nefrótico, insuficiência cardíaca congénita, entre outros.

No caso de o valor de sódio se encontrar acima dos valores de referência estamos perante uma **hipernatrémia.** A principal causa da **hipernatrémia** é a desidratação.

- **Potássio**

  Interpretação de resultados

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

  Valores de referência:

  - Soro: 3,5 – 5,1 mmol/L;
  - Urina: 25 – 125 mmol/ dia.

Quando o valor de potássio se encontra inferior aos valores de referência, estamos perante uma **hipocalémia** comum em casos de alcalose metabólica.

Uma **hipercalémia**, isto é, um valor de potássio superior aos valores de referência, é comum em casos de acidoses metabólica ou em caso de desidratação.

- **Cloretos**

  Interpretação de resultados

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

  Valores de referência:

  - Soro: 98 – 106 mmol/ L;
  - Urina. 110 – 250 mmol/dia.

Um valor de cloretos menor de 98 mmol/L, significa que estamos perante uma **hipoclorémia,** comum em casos de acidose metabólica. Um valor de cloretos superior

ao valor de referência, uma **hiperclorémia**, é comum em casos de desidratação e acidose metabólica.

- **Magnésio**

Interpretação de resultados

O magnésio é o quarto catião mais abundante no organismo e o segundo a nível intracelular.

Este catião é um cofator de mais de trezentas enzimas no organismo.

Valores de referência:

- Soro – Homem: 1,8 – 2,6 mg/dl
  Mulher: 1,9 – 2,5 mg/dl
- Urina – 73 – 122 mg/dl

A **hipomagnesiémia** deve-se na maioria das vezes a perdas no trato GI, como em diarreias e a nível renal.

A **hipermagnesiémia** tem como causa principal a administração de fármacos, como ciclosporinas e diuréticos.

- **Cálcio**

Introdução

O cálcio existe em três estados fisiológicos no plasma: ionizado, ligado a proteínas plasmáticas e complexado com pequenos iões.

O cálcio livre é fração biologicamente ativa, sendo a sua concentração regulada pela **PTH** e a 1,25-dihidroxivitamina D.

Interpretação de resultados

Uma diminuição na concentração de cálcio, **hipocalémia,** está presente em casos de hipoalbuminémia, uma vez que a albumina liga-se ao cálcio, ou em casos de insuficiência rena crónica.

A **hipercalcémia** está presente principalmente no hiperparatiróidismo primário.

- **Fósforo**

Introdução

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

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

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Soro: 2,5 – 4,5 mg/dl
- Urina: 0,4 – 1,3 g/24h

A **hipofosfatémia** pode ser devido à mudança do fósforo do fluído extracelular para o fluído intracelular. Esta mudança pode ocorrer devido à estimulação da secreção de insulina induzida por hidratos de carbono, a qual estimula o transporte de glucose e fosfato para as células sensíveis à insulina, onde, por sua vez, o fosfato é incorporado em açucares e ATP.

A **hiperfosfatémia** poderá ser causada, maioritariamente, por insuficiência renal.

Função hepática

- **Bilirrubinas**

Introdução

Após o final do seu ciclo de circulação, os eritrócitos são decompostos no sistema reticulo endotelial (baço e medula óssea). Assim o ferro é removido, o grupo

heme presente nos eritrócitos é convertido em bilirrubina (não conjugada). Este processo corresponde aproximadamente a 80% da bilirrubina (não conjugada) produzida diariamente. As outras formas de bilirrubina incluem a decomposição da mioglobina e citocromos.

Uma vez produzida, a bilirrubina (não conjugada) é transportada, por ligação à albumina, até ao fígado. Esta fração de bilirrubina é hidrofóbica, não podendo, como tal, ser eliminada por via renal. Designa-se por bilirrubina não conjugada ou indireta (por não ser diretamente determinada por simples adição ao ácido sulfanílico diazotado).

A entrada da bilirrubina não conjugada no fígado é feita à custa de transportadores existente na membrana dos hepatócitos (bilitranslocase). Uma vez no fígado, a bilirrubina é duas vezes conjugada com ácido glucorónico, por intermédio da enzima bilirrubina-UDP-glucoronosil-transferase1. Forma-se, assim, a bilirrubina conjugada. Ao contrário da bilirrubina não conjugada, a bilirrubina conjugada é hidrofílica, podendo, como tal, ser eliminada por via renal. A bilirrubina conjugada é também designada por bilirrubina direta (por ser doseada diretamente por simples adição do ácido sulfanílico diazotado).

Método

A absorvência da bilirrubina total a 540nm é proporcional à concentração de bilirrubina no soro. Para a determinação da bilirrubina direta faz-se a leitura da absorvência a 570 nm.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Bilirrubina total: 0,3 – 1,0 mg/dl;
- Bilirrubina direta: < 0,5 mg/dl.

O doseamento da bilirrubina tem interesse para o estudo de doenças hepáticas onde pode ocorrer um aumento das bilirrubinas (icterícia) ou doença colestática.

- **Enzimas hepáticas:**

Aspartato amino-transferase sérica (AST) e Alanina amino-transferase sérica (ALT)

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

A **AST** é uma enzima encontrada em vários órgãos e tecidos, como fígado, coração e músculo esquelético.

A **ALT** é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, porém em quantidades moderadas no rim e pequenas quantidades no coração e musculatura esquelética. Em geral, a maior parte da elevação da **ALT** deve-se à presença de doença hepática.

Método

Para a determinação destas enzimas hepáticas, o método utilizado é cinética enzimática com desenvolvimento de cor, que é lida a 340 nm, sendo a cor desenvolvida proporcional à concentração das enzimas no soro.

Interpretação de resultados

	AST	**ALT**
Homem	< 35 U/L	< 45 U/L
Mulher	< 31 U/L	< 34 U/L

As patologias hepáticas são as principais responsáveis pelo aumento das transaminases no soro.

Nas hepatites virais e no caso de necrose hepática, os valores destas enzimas elevam-se antes do aparecimento dos sinais clínicos e dos sintomas. A atividade das enzimas nestes casos pode ser bastante elevada, chegando a alcançar valores 100 vezes maiores ou mais que o referido valor referência. A **ALT** é mais específica do fígado.

Gama-glutamil transferase ($_{\gamma}$ - GT)

A $_{\gamma}$ **- GT** pertence a um grupo de peptidases que catalisam a transferência de aminoácidos de um péptido para outro e atuando, assim, como transferases de a.a.

A $_{\gamma}$ **- GT** existe em todas as células do organismo, exceto nos músculos. A enzima existente no soro parece ter essencialmente origem no sistema hepatobiliar.

Método

A $_{\gamma}$ **- GT** catalisa a transferência do grupo gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido para a glicilglicina, produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. A alteração da absorvência a 410/480 nm deve-se à formação de 5-amino-2-benzoato, e é diretamente proporcional à atividade da $_{\gamma}$ **- GT** na amostra.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Homens: < 55 U/L;
- Mulheres: < 38 U/L.

O aumento de atividade desta enzima parece ser um marcador sensível de doença hepatobiliar. A $_{\gamma}$ **- GT** apresenta valores bastante elevados quando na presença de uma obstrução intra ou pós-hepática. O seu aumento aparece em doentes com hepatite infeciosa. Em doentes com cirrose alcoólica e na maioria dos doentes que consomem grandes quantidades de álcool, a $_{\gamma}$ **- GT** encontra-se também elevada, desempenhando um papel importante na deteção do alcoolismo e sua monitorização.

- **Fosfatase alcalina (ALP)**

A fosfatase alcalina é constituída por um grupo de enzimas estritamente relacionadas e com atividade máxima de pH 10.

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

Método

A fosfatase alcalina é medida segundo ensaio de cinética enzimática.

Interpretação de resultados

Valor de referência: 30 – 120 U/L

A determinação desta enzima tem particular interesse no despiste de duas patologias: doença hepatobiliar e doenças ósseas associadas ao aumento da atividade dos osteoclastos. Nestas duas patologias, podemos verificar um aumento sérico da fosfatase alcalina.

Durante a gravidez e fase de crescimento das crianças, poderá haver um ligeiro aumento dos valores séricos desta enzima.

- ## Enzimas musculares

Creatinina quinase (CK)

A **CK** é um dímero composto por subunidades M-musculo e/ou B-cérebro que se associam para formar as iso enzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB. Estes catalisam a fosforilação reversível da creatina por **ATP**. O magnésio é um ião ativador formando complexos com **ATP** e **ADP**.

A atividade da **CK** é maior nos músculos estriado e cardíaco.

Método

O método usado para a determinação desta enzima, é uma reação de cinética enzimática com produção de **NADPH** leva ao aumento da absorvência a 340/600 nm, que é diretamente proporcional à quantidade da enzima no soro.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Homens: ≤ 171 U/L
- Mulheres: ≥ 145 U/L

O valor da **CK** encontra-se muito elevado em todos os tipos de distrofia muscular, como por exemplo, na distrofia de Duchenne.

A atividade da **CK** aumenta após danos no miocárdio, com aumento significativo das frações MM e MB.

Lactato desidrogenase (LDH)

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

Método

A **LDH** catalisa a oxidação do lactato em piruvato, juntamente com a redução de NAD+ a NADH. O aumento do NADH é medido a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade enzimática da amostra.

Interpretação de resultados

Devido à sua distribuição alargada, a elevação da **LDH** pode ocorrer numa série de condições patológicas, como enfarte do miocárdio, hemólise, entre outras, sendo por isso a **LDH** de importância no diagnóstico de enfarte do miocárdio e anemia hemolítica.

• Enzimas pancreáticas

α – Amílase

Esta enzima encontra-se em maior concentração nas glândulas salivares (tipo-S), e no pâncreas (tipo-P).

Método

Esta enzima é determinada segundo o método da cinética enzimática.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Soro: 22 – 80 U/L

A concentração desta enzima aumenta exponencialmente em casos de pancreatite aguda e em doenças do trato biliar.

Função Renal

- **Creatinina**

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

Método

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

Interpretação de resultados

Valores de referência séricos:

- Homens < 50 anos: 0,84 – 1,25 mg/dl
- Homens > 50 anos: 0,81 – 1,44 mg/dl
- Mulheres: 0,66 – 1,09 mg/dl

Valores de referência urinários:

- Homens: 1100 – 2000 mg/24h
- Mulheres: 800 – 1300 mg/24h

A creatinina no soro varia em função da idade, peso corporal e sexo do indivíduo.

A creatinina está mais elevada em indivíduos que possuem uma massa muscular aumentada.

- **Clearance da creatinina**

A clearance da creatinina é o marcador mais preciso da **TGF**. Obtém-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Clearance da creatinina (ml/min)} = \frac{\text{creatinúria} \times \text{Volume (ml)}}{\text{Creatinémia} \times 1400 \text{ (segundos)}}$$

Esta prova tem os mesmos interferente no doseamento plasmático, mas os mesmos são reduzidos ou anulados, uma vez que a recolha é feita em Urina de 24h.

A depuração da creatinina tem sido considerada uma das provas mais sensíveis disponíveis para indicar a presença de insuficiência renal, devido à rápida queda dos seus valores. Valores abaixo de 10 ml/min indicam a necessidade de diálise.

- **Ureia**

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

Método

A determinação da ureia é feita por um método enzimático pela urease com desenvolvimento de cor que é proporcional à concentração de ureia no soro.

Interpretação de resultados

Valores aumentados de ureia normalmente são patognomónicos de patologia renal.

Os níveis de ureia podem estar diminuídos na gravidez e na doença hepática grave.

- **Ácido úrico**

O ácido úrico é o produto principal do catabolismo das purinas no ser humano, e é formado a partir da xantina sob a ação da xantina-oxidase. A maior parte da formação do ácido úrico ocorre no fígado e é eliminado através dos rins.

Método

Sob ação da uricase e posteriormente da peroxidase, há desenvolvimento de cor que vai ser proporcional à concentração de ácido úrico no soro.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Homem: 3,5 – 7,2 mg/dl
- Mulher: 2,6 – 6,0 mg/dl
- Urina: 250 – 750 mg/24h

A gota é a patologia causada pela **hiperuricemia**, podendo ser devido a vários fatores, como secreção renal, excesso de purinas na dieta, entre outros.

- **Microalbuminúria**

A microalbuminúria é agora considerada um importante fator indicador do declínio da função renal em sujeitos diabéticos.

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

Método

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

Interpretação de resultados

Valores de referência

- Normal: < 30 mg/24h;
- Microalbuminúria: < 30 – 300 mg/dl;
- Albuminúria: > 300 mg/24h.

A microalbuminúria é definida como um aumento da excreção urinária de albumina acima do valor de referência para sujeitos não diabéticos, mas não detetável noutros testes para a determinação de proteína urinária.

Função eritroide, metabolismo do ferro

O ferro usado para a formação da hemoglobina vem da dieta (1mg) e da reciclagem de ferro de eritrócitos senescentes. O ferro circula no sangue acoplado a uma beta-globulina, denominada *transferrina.* Os percursores eritroides na medula óssea utilizam parte do ferro disponível e, do restante, cerca de 60% é armazenado na medula óssea, fígado e baço sob a forma de *ferritina* e os outros 40% sob a forma de *hemossiderina.*

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

- **Ferro**

Método

O ferro forma um complexo de cor azul em meio tamponado. O aumento na absorvência é diretamente proporcional à quantidade de ferro.

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- Homem: 50 – 170 µg/dl;
- Mulher: 30 -160 µg/dl.

A deficiência em ferro é uma das causas de anemia mais prevalentes a nível mundial tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, embora em causas por causas diferentes.

A hemossiderose e a hemocromatose são patologias por excesso de ferro.

- **Capacidade total de fixação de ferro (CTFF)**

Método

A capacidade total de fixação de ferro é calculada segundo a seguinte fórmula:

CTFF = Fe sérico – Capacidade de fixação do ferro não saturado

Interpretação de resultados

Valores de referência: 240 – 450 µg/dl.

A determinação da **CTFF** é importante para o diagnóstico de anemia ferropénica e monitorização do metabolismo do ferro.

- **Transferrina**

Método

O método usado é semelhante ao da determinação do ferro. A amostra é misturada com tampão e solução antissoro, a transferrina humana reage especificamente com

anticorpos transferrina anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de transferrina na amostra.

Interpretação de resultados

Valores de referência: 200 – 400 mg/dl

A determinação da transferrina é importante principalmente para o diagnóstico de anemia ferropénica. Mas a determinação da concentração da transferrina tem o seu maior valor semiológico no diagnóstico diferencial das anemias e na monitorização da resposta ao tratamento das patologias secundárias às alterações do metabolismo do ferro, conjuntamente com a determinação da sideremia (determinação do ferro sérico), ferritina e taxa de saturação da transferrina.

- **Saturação da transferrina**

Método

A saturação da transferrina é calculada pela seguinte fórmula:

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

Interpretação de resultados

A saturação da transferrina é importante para o diagnóstico da anemia ferropénica, uma vez que o seu valor se encontra reduzido neste caso.

- **Ferritina**

Método

Esta determinação é efetuada no aparelho **Vidas blue,** fotoquimioluminescência (sandwich), utilizando dois anticorpos monoclonais anti ferritina de ratinho.

Interpretação de resultados

O nível de ferritina sérica é um indicador da quantidade de ferro no organismo.

A queda do nível de ferritina sérica pode ser um sinal de um défice de ferro, precedendo o aparecimento de uma anemia ferropénica. Clinicamente, provou-se ser útil um valor limite de 20 µg/L na deteção de uma deficiência de ferro pré-latente. Este valor constitui uma indicação fiável do esgotamento das reservas de ferro que podem ser mobilizadas para a síntese da hemoglobina. Segundo a definição, existe deficiência de ferro quando se regista uma queda para valores abaixo do limiar de 12 µg/L. Estes dois valores não requerem mais nenhuma elucidação laboratorial, nem mesmo quando o hemograma está morfologicamente normal. Se a diminuição do nível de ferritina for acompanhada de anemia hipocrómica microcítica, está-se perante uma manifesta deficiência de ferro.

A sobrecarga férrica (ferritina > 400 µg/L) é caraterística de transfusões e hemodiálise repetidas e de doenças como a hemocromatose, talassemia, anemia sideroblástica, carcinoma hepatocelular (citólise hepática; a determinação de ferritina é um indicador importante de metástases no fígado), carcinoma pulmonar, carcinoma do cólon, carcinoma da próstata, leucemia aguda e linfoma de Hodgkin. Nestes casos o doseamento da ferritina sérica ajuda no diagnóstico e vigilância dos doentes. Como se trata de uma proteína de fase aguda positiva, os níveis de ferritina também aumentam quando ocorre inflamação, o que provoca uma retenção de ferro nos macrófagos mononucleares da medula óssea, baço e fígado.

Assim o doseamento da ferritina permite distinguir anemias hipocrómicas por carência de ferro (diminuição da ferritina) das anemias inflamatórias (ferritina aumentada).

Valores de referência

- Homens: 30 - 400 µg/L (ng/mL)
- Mulheres: 13 – 150 µg/L (ng/mL)

- **Vitamina B12**

A vitamina B12, ou cianocobalamina, é obtida exclusivamente de fontes alimentares de origem animal, como carne, ovos e leite.

Método

Determinação efetuada no aparelho **Cobas e601,** eletroquimioluminescência (competição)

- **Ácido fólico ou folato**

O ácido fólico, ou folato, é obtido de fontes alimentares que incluem frutas, vegetais e carnes orgânicas. Ao contrário da vitamina B12, o ácido fólico é uma vitamina afetada pelo calor, suscetível a perda de ação, se os alimentos forem cozinhados tempo demais. É absorvido através do intestino delgado e armazenado no fígado.

Método

Também efetuada no **Cobas e601**

As determinações da **vitamina B12** ou do **ácido fólico** são importantes em termos de diagnóstico para o reconhecimento de deficiências nestes parâmetros, principalmente no quadro de diagnósticos diferenciais em casos de anemia macrocítica ou megaloblástica. Essas anemias caracterizam-se pela maturação anormal de percursores dos eritrócitos na medula óssea, pela presença de megaloblastos e pela diminuição do tempo de vida dos eritrócitos. Como tanto o défice de vitamina B12 como o de ácido fólico podem causar anemia megaloblástica, é aconselhável determinar a concentração dos dois parâmetros para diagnosticar devidamente a etiologia da anemia.

Proteínas

- **Proteínas totais**

O doseamento das proteínas totais tem interesse para o diagnóstico de diversas doenças renais, hepáticas e nutricionais.

Método

O doseamento das proteínas totais é feito em meio alcalino, onde os iões cúpricos formam complexos cor violeta com as proteínas. A absorvência desta solução é lida a 540nm, sendo diretamente proporcional à quantidade de proteínas totais presentes na amostra.

Interpretação de resultados

Valores de referência: 6,6 – 8,3 g/dl.

Depois deste doseamento, podemos aprofundar o estudo das proteínas no soro com outros métodos mais específicos, como eletroforese, entre outros.

- **Proteinúria**

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

Método

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

Interpretação de resultados

Valores de referência: 0,05 – 0,08 g/24h.

Pode, no entanto, este valor ser mais elevado, até 0,30 g/24h em praticantes de desporto.

A proteinúria ocorre em 4 situações específicas:

- Permeabilidade glomerular acrescida, maioritariamente albumina;
- Reabsorção tubular deficiente, em que as proteínas são de peso molecular baixo;
- Concentração acrescida de proteínas de baixo peso molecular, tais como as cadeias leves das imunoglobulinas,
- Secreção anormal de proteínas para trato urinário.

- **C3 e C4**

O sistema de complemento consiste em cerca de 20 proteínas do plasma, que desempenham um papel importante na inflamação ao facilitarem a fagocitose.

Método

As amostras são misturadas com tampão Tris e antissoro C3 ou C4 de cabra. Este antissoro vai reagir especificamente com o C3 ou C4 humano respetivamente, produzindo agregados insolúveis. A formação destes agregados vai ser proporcional à sua concentração no soro.

Interpretação de resultados

Os valores de C3 e C4 aumentados estão normalmente associados a uma resposta inflamatória de fase aguda, a necrose tecidular ou doença renal.

- **Imunoglobulinas – IgG, IgA e IgM**

Estas imunoglobulinas estão presentes no soro. A IgG é a que se encontra em maior quantidade no soro e a IgM a com menor concentração no soro.

Método

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

Interpretação de resultados

Valores de referência:

- IgG: 700 – 1600 mg/dl;
- IgA: 70 – 400 mg/dl;
- IgM: 40 – 230 mg/dl

- **Proteína C reativa (PCR)**

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

Método

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

Interpretação de resultados

Valores de referência: < 5,0 mg/L.

Os níveis de **PCR** no soro podem subir após um enfarte do miocárdio, lesão, infeção, inflamação, cirurgia ou proliferação neoplásica.

Eletroforese de Proteínas

A eletroforese das proteínas é o método mais comum para rastrear anomalias nas proteínas séricas. Pode ser muito útil na investigação de gamopatias monoclonais (ex. Mieloma Múltiplo), reações inflamatórias agudas e crónicas, cirrose hepática, síndrome nefrótico e outras situações.

A eletroforese de proteínas é feita no aparelho **Capillarys sebia 2** (figura 7)

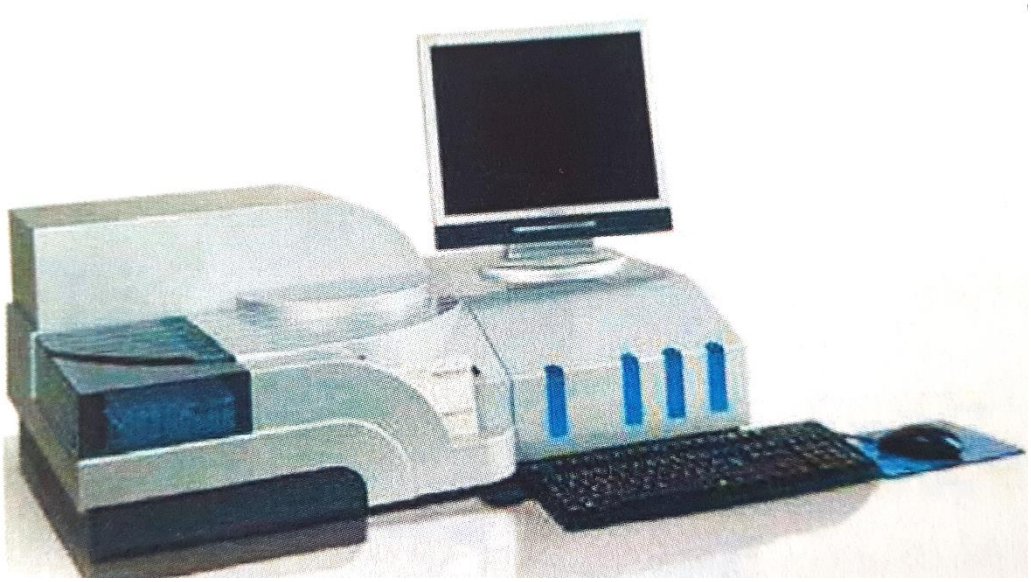


Figura 7. Capillarys sebia 2

Método

A eletroforese das proteínas é uma técnica para pesquisar modificações no perfil das proteínas das amostras. O sistema utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre. Com esta técnica, as moléculas carregadas são separadas pela sua mobilidade eletroforética, num tampão alcalino com um pH específico. A separação também ocorre em função do pH do eletrólito e do fluxo eletro-osmótico.

O sistema tem oito capilares a funcionar em paralelo, permitindo oito análises em simultâneo. É preparada uma diluição da amostra com tampão e injetada, por aspiração, na extremidade do ânodo do capilar. A separação é efetuada aplicando alta voltagem aos bornes de cada capilar. A deteção direta das proteínas é efetuada a 200 nm, na extremidade do cátodo do capilar.

Resultados

Valores de referência

Albumina 59 – 72.4%

α1 - globulinas 1.0 – 3.20%

α2 – globulinas 7.4 – 12.6%

β – globulinas 7.5 – 12.9%

γ - globulinas 8.0 – 15.8%

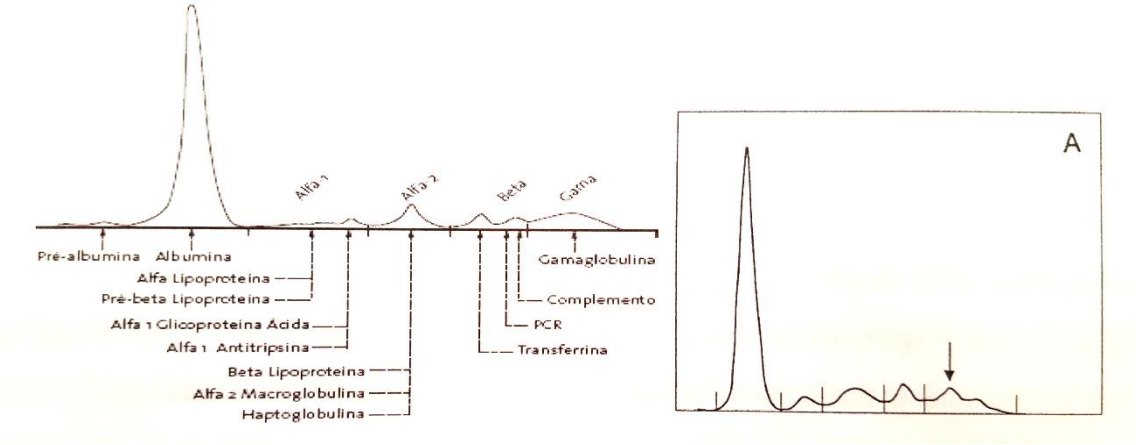


Figura 8. Perfil eletroforético e zonas de localização das proteínas. A figura da direita indica a posição que o fibrinogénio ocupa quando presente (seta).

Análise de Urinas

Análise de Urina TipoII

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

Método

Para a determinação semi-quantitativa de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue na urina, é utilizado o analisador URISYS 2400 (figura 9).

Este analisador utiliza tiras de teste com os parâmetros anteriormente assinalados e faz uma leitura colorimétrica.

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



Figura 9. Urisys 2400

Exame microscópio do sedimento

O exame microscópio permite identificar, caraterizar e semi-quantificar os elementos figurados, clinicamente significativos:

- Células epiteliais de descamação: tubulares renais e de transição do urotélio assim como pavimentosas, não tendo significado patológico. Normalmente têm origem na uretra feminina e masculina;
- Células hematopoiéticas: leucócitos e eritrócitos;
- Cilindros: estruturas proteicas, cuja a matriz original é constituída pela proteína de Tamm-Horsfall, moldadas nos túbulos contornados distais e nos tubos coletores. A sua presença está sempre associada a proteinúria;

- Cristais: resultam de precipitação de sais excretados pelos rins. A sua presença, na maior parte dos casos, designadamente os de fosfato, oxalato e urato, que aparecem frequentemente nas urinas normais, têm pouco significado clínico.

São considerados patológicos os cristais que estão relacionados com alterações metabólicas, designadamente os de *Tirosina* e de *Leucina* (doenças hepáticas graves), assim como os de Cistina (urinas com pH entre 6,0 e 7,4 – cristais hexagonais amarelo-acastanhados). A presença destes últimos carateriza a cistinúria, que é uma doença autossómica recessiva.

Interpretação de resultados

O exame da urina é sempre o primeiro passo no doente suspeito de ter deterioração da função renal. Verifica-se a aparência, a coloração pálida até à presença de pigmento. Esta indica a hemoglobina e a mioglobina que conferem uma coloração rosa-vermelha ou castanha, dependendo da concentração. A turvação na amostra fresca indica infeção ou pode ser devida a partículas de gordura no doente com síndrome nefrótico.

A gravidade específica indica a concentração de urina. A medição do pH pode ser útil em doentes com acidose tubular renal e formação de cálculos.

A proteinúria é um dos sinais mais comuns em doentes com doença renal. A tira reativa tem um limite de deteção de cerca de 150mg/ml; é evidente que são necessários métodos mais sensíveis para detetar a proteinúria incluindo a microalbuminúria.

A presença de esterase leucocitária é indicativa de piúria. A deteção de nitritos é indicativa da presença de bactérias que degradam o nitrato excretado na urina. A combinação destes dois testes é de valorizar em doentes com infeção do trato urinário.

A presença de hemoglobina livre ou eritrócitos na urina indica a presença de doença renal ou da bexiga. A hematúria pode estar presente em várias doenças renais, doença das células falciformes, vasculites e uma séria de infeções, doenças urológicas da bexiga, da próstata, dos ureteres, doença oncológica pélvica ou uretral e cálculos renais.

Pesquisa de drogas de abuso

Colheita da amostra:

Urina espontânea

Método:

Imunoensaio competitivo qualitativo

Cocaína

A cocaína, um derivado das folhas da planta de coca, é um potencial estimulante do sistema nervoso central e um anestésico local. A cocaína é excretada na urina primariamente como benzoilecgnonina, num curto período de tempo. A benzoilecgnonina pode ser detetada após 24 a 60 horas depois da exposição a esta droga.

THC Canabinóides

A marijuana é um agente alucinogénio derivado da porção florida da planta do cânhamo. Fumar é o método primário de utilização da marijuana/cannabis. Quando a marijuana é ingerida, a droga é metabolizada pelo fígado, e o metabolito urinário da marijuana é o ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocanabinol-9-hidroxilico e o seu glucuronido. Isto significa que a deteção de canabinóides incluindo o seu metabolito carboxil, indica o consumo de marijuana/cannabis. A eliminação dos metabolitos urinários ocorre dentro das 72 horas após a toma.

Opiáceos

Os opiáceos, tais como a heroína, morfina, e codeína, são derivados de uma resina de ópio da papoila. A heroína é rapidamente metabolizada em morfina. Por consequência, a presença na urina de morfina ou o seu metabolito glucoronido, indicam a utilização destes opiáceos.

Método

Este teste para as moléculas anteriormente mencionadas é um imunoensaio de um só passo no qual a droga quimicamente marcada (droga conjugada) compete com a droga que poderá estar presente na urina, para os mesmos sítios de ligação do anticorpo. O dispositivo teste consiste numa tira membrana com droga conjugada na banda teste, acondicionada num alojamento plástico. Um teste positivo apresenta somente uma banda corada (a banda controlo) enquanto um teste negativo apresenta duas bandas coradas.

Exame a fezes

Pesquisa de sangue oculto

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

Método

O teste usado é um teste rápido imunocromatrográfico qualitativo para a deteção de sangue oculto nas fezes, nos casos de suspeita de carcinoma coloretal. O método utiliza uma combinação única de corante monoclonal conjugado e uma fase sólida de anticorpos policlonais para identificarem seletivamente a hemoglobina humana.

Interpretação de resultados

A presença de sangue nas fezes pode se devida a várias causas além da hemorragia coloretal, tais como, hemorroidas, fissura anal e hematúria. O teste é positivo quando há presença de hemoglobina, o que não exclui a presença de uma dieta rica em carne, dando origem a falsos positivos. Este é um dos problemas principais do teste.

Hematologia

Introdução

No departamento de Hematologia estive os meses de março e abril e fiz um pouco de tudo o que neste departamento se faz com a orientação da chefe do departamento, Dra. Conceição e das técnicas de laboratório que lá trabalham.

A Hematologia é uma ciência que estuda os elementos figurados do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas; avalia o estado de normalidade destas células sanguíneas, dos órgãos hematopoiéticos e as doenças a eles relacionados.

A este departamento do laboratório chega vários tipos de tubos com amostras biológicas para proceder à sua análise. Dentro destes tubos temos, o tubo de EDTA para contagens hematológicas e o tubo de citrato para a hemóstase.

Hemograma, plaquetas e reticulócitos

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

Estas análises são realizadas em aparelhos automatizados:

- **Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos** - ***Sysmex XT-2000i***
- **V**elocidade de **S**edimentação – ***Alifax***

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

1. Contador hematológico Sismex XT 2000i

Princípio do aparelho

Neste aparelho, são executados os seguintes pedidos: **Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos.** Para isso, utilizam-se amostras de sangue total colhido em tubos de EDTA.

Para fazer **Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos,** a amostra é dividida em 5 partes dentro do aparelho a fim de executar 5 diluições diferentes, sendo depois encaminhada para os respetivos canais diferenciados:

- Canal **HGB** – diluição 1.375; **metodologia SLS-Hb** que permite fazer a determinação de Hemoglobina. A quantificação é feita pela leitura de absorvência do pico a 535 nm e do pico adjacente a 560 nm.
- Canal **RBC/PLT** – diluição 1:500; este aparelho conta e deteta o tamanho dos Eritrócitos e das Plaquetas usando o **método da focagem hidrodinâmica (HDF).**
- Canal **4DIFF** – diluição 1:52
- Canal **WBC/BASO** – diluição 1:50
- Canal **RET/PLT-O** – diluição 1:255

Estes 3 últimos canais utilizam a **metodologia por citrometria de fluxo por laser semicondutor**. Este laser semicondutor ilumina o espécime e separa as células de acordo com os seus sinais:

- *Forward scartter* – esta intensidade luminosa indica-nos o **V**olume celular;
- *Side scatter* – dá-nos a informação do **c**onteúdo **c**elular, como o núcleo e grânulos;
- *Side fluorescence* – indica a quantidade de **DNA** e **RNA celulares.**

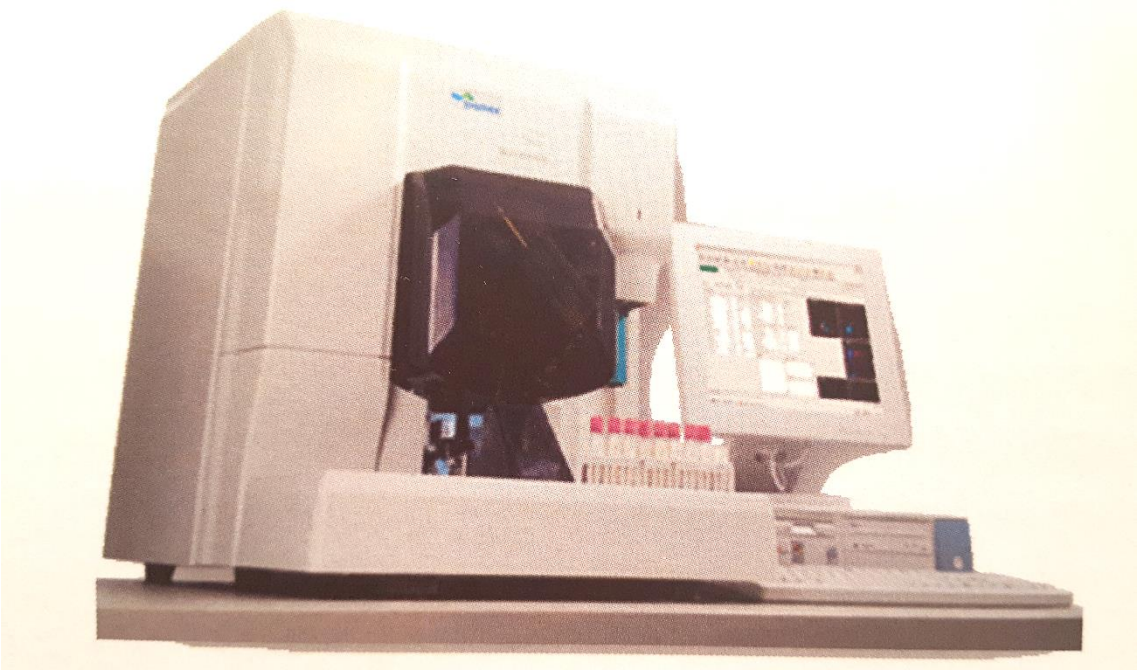


Figura 10. Sismex XT 2000i

Interpretação de histogramas

O resultado de um pedido de **Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos** é composto por:

- Eritrograma
- Leucograma
- Plaquetas
- Reticulócitos

Na linha inferior temos os alarmes (**flags**), os quais nos permitem chamar a atenção para os resultados fora dos valores de referência ou com alterações nos histogramas (figura 11) que evidencia possíveis alterações morfológicas. A continuação do estudo do hemograma é feita, geralmente, através da observação de esfregaço de sangue periférico e, por interação com resultados obtidos de outros departamentos (ex. Bioquímica).

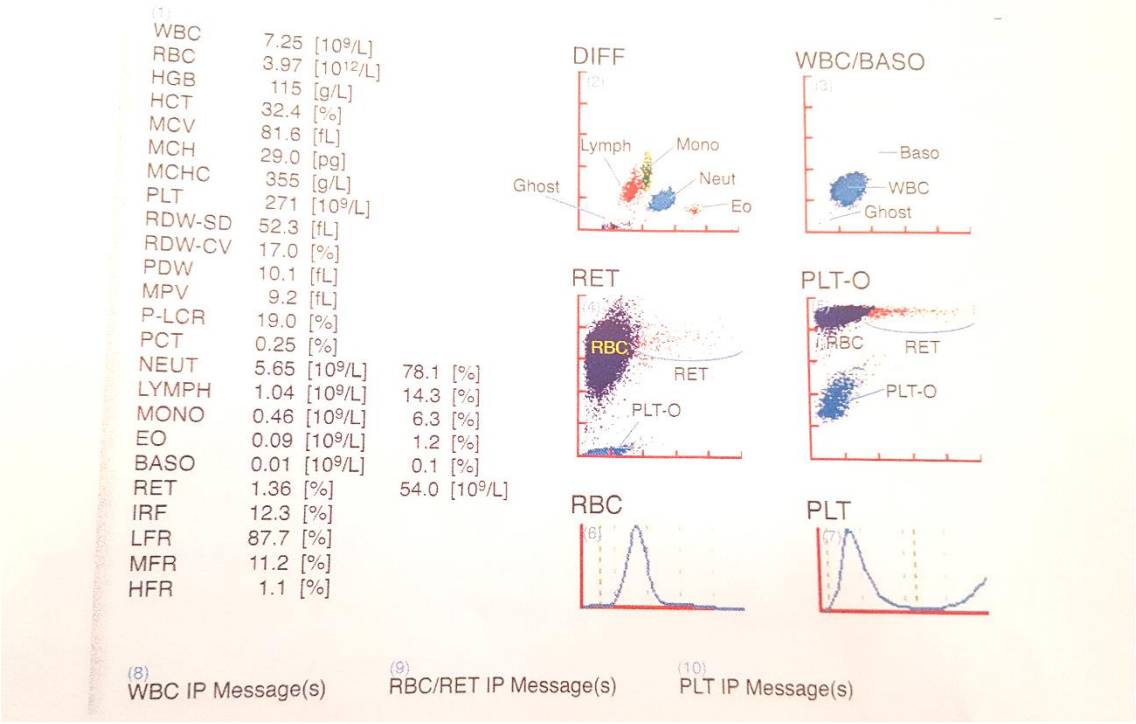


Figura 11. Histograma

Validação dos hemogramas

A validação dos hemogramas é um processo complexo e de grande importância e complexidade.

Se o hemograma estiver dentro dos valores de referência, o hemograma é validado;

Se o hemograma não estiver dentro dos valores de referência, mas houver histórico do doente e os valores anómalos corresponderem ao histórico do doente, o hemograma é igualmente validado. Se o hemograma não estiver dentro dos valores de referência e não houver histórico do doente ou os valores forem dispares do histórico, é então repetido o hemograma manualmente e de os valores persistirem é feito o esfregaço sanguíneo para confirmação dos valores do aparelho.

Citologia

Coloração de Wright

Introdução

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

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

Método

Os corantes hematológicos, em geral, baseiam-se na mistura de Romanowsky: azul de metileno (*corante básico*) + eosina (corante ácido), permitindo a coloração simultânea do núcleo e citoplasma das células. Enquanto o *corante básico* confere cor azul violácea dos neutrófilos, a *eosina* confere cor vermelha ou laranja à hemoglobina e aos grânulos eosinófilos.

Tradicionalmente, o citoplasma corado de azul e os grânulos de púrpuras são chamados basófilos, enquanto que os grânulos violeta ou púrpura-rosados são chamados de azurófilos. Por outro lado, células predominantemente rosas são chamadas acidófilas e componentes corados de laranja, eosinófilos.

A coloração pode ser dividida em duas fases:

- Fixação – feita pelo metanol, que é quando a solução de wright é aplicada na lâmina por 2 minutos;
- Coloração – obtém-se adicionando água destilada sobre o corante durante 2 minutos.

Velocidade de Sedimentação

Introdução

A **V**elocidade de **S**edimentação é considerada um teste não específico. No entanto, é um importante indicador indireto da resposta inflamatória aguda, aumentando na presença de infeções e processos inflamatórios crónicos e agudos.

No laboratório, usamos um método automatizado para a medição da velocidade de sedimentação: **Alifax Test 1** (figura 12).



Figura 12. Alifax Test 1

Método

O **Alifax Test 1** é um analisador automático fechado, que determina o valor de **V.S.** no tubo primário de EDTA tripotássico. Através de uma agulha de aspiração, o sangue é aspirado do tubo. Posteriormente passa para um capilar, o qual é centrifugado a 20G, a uma temperatura constante de 37ºC. A leitura é feita usando **fotometria de**

infravermelhos a um comprimento de onda de 950 nm. Os impulsos elétricos captados usando um detetor de fotodíodos, estão diretamente relacionados com a concentração de eritrócitos presentes no capilar. O número de impulsos medidos por metade do tempo é usado para delinear a curva de sedimentação para cada amostra. Estes valores são depois convertidos para valores comparados ao método de Westergreen.

Hemoglobina glicosilada

Introdução

Este doseamento é realizado como um parâmetro útil na monitorização a longo prazo de doentes diabéticos. Tal facto deve-se à não variação da **HbA1c** com a alteração do nível de glucose no sangue. De igual modo, devido ao mecanismo de formação, esta permite-nos obter uma retrospetiva a longo prazo dos níveis de glucose no sangue.

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

A hemoglobina glicosilada é formada por condensação da glucose com a porção N-terminal da valina de cada cadeia da hemoglobina A, resultando numa base de Schiff instável. Posteriormente, sofre um rearranjo de Amadori formando a **HbA1c.**

Método

O doseamento desta hemoglobina é feito por Cromatografia Líquida de Alta Pressão, que usa uma coluna composta por resina de troca iónica de caráter catiónico de fase reversa. A leitura das frações obtidas é realizada a 415 nm e 500 nm. Podem assim obter-se as seguintes frações: **HbA1c,** HbA1, HbF, HbA2 e hemoglobina variantes.

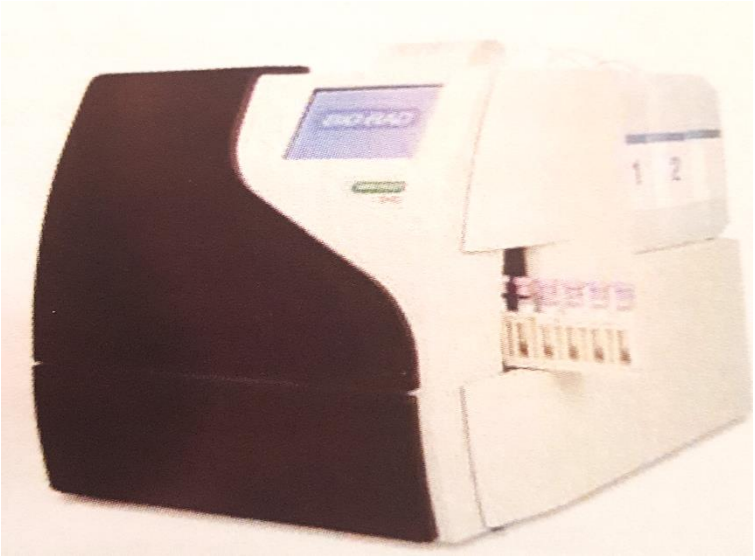


Figura 13. Biorad D10

Este aparelho (figura 13) é capaz de diluir, hemolisar e remover a base de Schiff (resultado da reação responsável pela formação da hemoglobina glicosilada) automaticamente. Esta remoção é feita com tetrapolifosfato (pH 6,0) durante 2 minutos a 48ºC. Após 4,2 minutos obtêm-se o cromotograma.

Interpretação de resultados

Os valores normais de hemoglobina glicolisada são entre 4% e 6%. Quando os valores estão acima de 7%, existe a associação a um risco maior de complicações crónicas, e indica também uma diabetes descontrolada.

Imuno-hematologia

Sistema ABO

Introdução

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

Existem 4 grupos sanguíneos: **A, B, AB e O**. Os epítopos antigénicos são determinados por hidratos de carbono ligados a polipéptidos ou lípidos, formando respetivamente glicoproteínas ou glicolípidos. A cada antigénio corresponde uma isoaglutinina (Anti-A ou Anti-B), a qual está ausente num soro de um sujeito com o respetivo antigénio sobre os eritrócitos.

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

Método

O método usado é a aglutinação direta com um reagente que indica a presença do antigénio correspondente.

Os reagentes usados para determinar os grupos sanguíneos são anticorpos monoclonais IgM; Anti-A, Anti-B e Anti-AB. Os clones usados neste método são:

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

Para a determinação do grupo de sangue, colocam-se três gotas da amostra de sangue numa placa, às quais se junta uma gota de Anti-A a uma, uma gota de Anti-B a outra e uma gota de Anti-AB na última gota da amostra. Mistura-se e observa-se a presença ou ausência de aglutinação. O resultado é positivo quando há aglutinação e negativo na sua ausência.

Interpretação de resultados

+ corresponde a aglutinação

- corresponde à ausência de aglutinação

Tabela 2: Interpretação dos grupos sanguíneos

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

Sistema Rh (Rhesus)

Introdução

Este sistema é muito complexo e, por essa razão, classificam-se os indivíduos como Rh Positivo e Rh Negativo, dependendo da presença ou ausência de *Antigénio D*. Quando um indivíduo não possui antigénios do sistema Rh, o sistema imunitário facilmente estimulado produz anticorpos quando na presença de glóbulos vermelhos e de antigénio positivo. Estas situações podem ocorrer na gravidez ou numa transfusão, podendo dar origem à *Doença Hemolítica do Recém-nascido* ou reações hemolíticas graves.

Existem ainda indivíduos que têm uma expressão mais fraca do que o habitual do antigénio D, o que pode ser problemático em transfusões sanguíneas. A expressão D-fraco indica indivíduos com um número reduzido de antigénio D, enquanto D-parcial indica indivíduos com falta de epítopos D ou em que estes estão alterados.

Método

O reagente Anti-D tem os seguintes anticorpos:

- anticorpo IgM (clone TH28)
- anticorpo IgG (clone MS 26)

A técnica usada é igual á do sistema ABO, ou seja, aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo, sendo que a aglutinação corresponde a Rh positivo e a ausência de aglutinação corresponde a Rh negativo.

Coombs Direto e Indireto

Introdução

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

Este teste é utilizado para a deteção de reações transfusionais: anemias hemolíticas autoimunes e anemias hemolíticas induzidas por fármacos.

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

O **Coombs Direto** tem como objetivo detetar os *anticorpos incompletos* fixos *in vivo* sobre as hemácias do sujeito. O **Coombs Indireto** tem como objetivo a pesquisa no soro de *anticorpos incompletos, incapazes de se ligarem sobre as hemácias* e assim ficarem suscetíveis de serem detetados pelo teste de Coombs Direto.

Método

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

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

A técnica baseia-se no princípio da hemaglutinação.

Interpretação de resultados

Quando **positivo**, isto é, quando há aglutinação pode significar:

Coombs direto

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

Coombs indireto

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

Estudo da Hemóstase

Coagulação

O sistema hemostático protege o sistema vascular e permite, em caso de lesão, que os tecidos sejam reparados e as suas funções sejam restabelecidas. A reconstrução depende de interações complexas entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise.

É um dos mecanismos de defesa mais básicos do organismo pois preserva a integridade da circulação e limita a perda de sangue.

O mecanismo de hemostasia encontra-se em equilíbrio dinâmico entre os fatores ativadores e inibidores da coagulação. Sempre que, por qualquer razão, haja um desequilíbrio, este pode vir a desencadear a ocorrência de fenómenos trombóticos ou hemorrágicos.

Os testes *in vitro* permitem distinguir 2 vias da cascata: via intrínseca e via extrínseca.

Atualmente considera-se que *in vivo* ambas as vias são ativadas e, portanto, a cascata deve ser considerada como um todo.

Estudo da ativação da coagulação

- **Tempo de Protrombina**

Amostra: Plasma citratado; o anticoagulante presente no tubo, citrato trissódico, é indicado para o estudo da coagulação, uma vez que preserva os fatores lábeis da coagulação (V e VIII).

Introdução

A medição do **Tempo de Protrombina (T.P.)** serve como um teste de triagem rápido e sensível para detetar transtornos de coagulação na via extrínseca e a via comum. Assim sendo, com este método é possível avaliar os Fatores II, V, VII, X e fibrinogénio.

O **T.P.** é adequado para:

- regulação e controlo da terapia anticoagulante oral;
- diagnóstico de deficiência congénitas e adquiridas de fatores de coagulação;
- controlo da atividade de síntese hepática no fígado.

O **T.P.** é mais utilizado na monitorização dos anticoagulantes orais. A terapêutica anticoagulante tem como objetivo prevenir fenómenos tromboembólicos. Os utentes sob terapêutica anticoagulante que realizam o controlo de sangue no laboratório têm como principais diagnósticos a fibrilação auricular, prótese mecânica valvular, embolia pulmonar, trombose venosa profunda, enfarte agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Os anticoagulantes orais mais utilizados são os cumarínicos como a varfarina (Varfine) e os derivados cumarínicos.

Método

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

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

$$Taxa\ de\ protrombin = \frac{Tempo\ de\ reação\ da\ amostra}{Tempo\ de\ reação\ do\ plasma\ normal}$$

Para a obtenção do valor de **INR** aplica-se a seguinte fórmula:

$$INR = \left(\frac{Tempo\ de\ reação\ da\ amostra}{Tempo\ de\ reação\ do\ plasma\ normal} \right)^{ISI}$$

O **Índex de Sensibilidade Internacional (ISI)** é dado pelo fabricante, podendo diferir de lote para lote.

Interpretação de resultados

Para um paciente Normal deveremos ter:

- tempo entre os 12s a 15s, mas depende do aparelho e do lote do reagente
- taxa de 100%
- **INR** de 1,0

No entanto, para um paciente com controlo da terapia de anticoagulante, temos valores diferentes. No caso de um doente com trombose venosa profunda, embolia pulmonar e doenças arteriais, com enfarte do miocárdio, deveremos ter um **INR** entre 2,0 e 3,0. Em pacientes com válvulas cardíacas não biológicas, e embolias sistémicas deveremos ter um **INR** entre 2,5 e 3,5.

Em termos gerais, e excluindo a terapia de anticoagulantes, o seu aumento poderá ser devido a:

- Anomalia congénita – raro
- Deficiência em fatores: VII, V, X, II ou fibrinogénio;
- Desfibrinogenémia congénita,
- Anomalia adquirida – Frequente;
- Hepatopatia;
- Avitaminose K;
- Diminuição grave de fibrinogénio (exemplo: por diminuição da síntese hepática, coagulação, intravascular disseminada, destruição por plasmina);
- Desfibrinogenémia adquirida, como na cirrose.

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

- **Tempo de Tromboplastina Ativada (APTT)**

Amostra: Plasma citratado

Introdução

O **T**empo de **T**rombo**p**lastina **A**tivada explora a via intrínseca da coagulação. Este método consiste no tempo de coagulação de um plasma sem plaquetas recalcificado em presença de fosfolípidos e de um ativador do sistema de contato da coagulação.

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

Método

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

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

Interpretação de resultados

Patologias associadas ao aumento da **APTT**

*Com tempo de **APTT** normal:*

- Fator VIII: Hemofilia A, Doença de Von Willebrand;
- Fator IX: Hemofilia B:
- Fator XI: Doença de Rosenthal;
- Fator XII: Pré-calicreína e Quininogénio de Alto Peso Molecular.

*Associado a um tempo de **APTT** alongado:*

- Deficits congénitos em Fatores X, V, II e fibrinogénio;
- Hepatopatia;
- Coagulação intravascular disseminada;
- Anticoagulantes circulantes

- **Fibrinogénio**

Amostra: Plasma Citratado

Introdução

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

Método

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

Interpretação de resultados

Podemos encontrar níveis baixos de fibrinogénio nos casos de hipofibrinogenémia ou afibrinogenémia adquiridas ou congénitas. As primeiras podem ser devidas a: coagulação intravascular disseminada, hepatopatias, perda de volume vascular, ou aumento de catabolismo.

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

Imunologia

Introdução

No departamento de Imunologia estive também os meses de março e abril e fiz um pouco de tudo o que neste departamento se faz com a orientação da chefe do departamento, Dra. Conceição e das técnicas de laboratório que lá trabalham.

Neste departamento de imunologia chega todo o tipo de amostras biológicas para proceder à respetiva análise. Dentro destas amostras temos os tubos de gel de soro (tampa amarela) e, alguns casos, urinas. Na triagem de produtos, os tubos de gel destinados às provas de imunologia são centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos e posteriormente distribuídos pelos vários sistemas automáticos para análise.

Os parâmetros doseados estão distribuídos pelos seguintes aparelhos: **Cobas** e6000 secção de imunologia **e 601**, e **Cobas e411**.

O **Cobas e601 e Cobase411** são analisadores de múltiplos canais, automatizados, de acesso aleatório, para análises imunológicas. Foram concebidos para efetuar determinações quantitativas e qualitativas *in vitro* de uma ampla variedade de substâncias analisadas através do recurso à tecnologia de eletroquimioluminescência. A tecnologia de eletroquimioluminescência utilizada no **Cobas**, recorre a duas espécies reativas, a Tripropilamina como iniciador das reações redox e o Ruténio como marcador quimioluminescente.

Áreas de estudo

Tabela 3: Análises imunológicas realizadas no Cobas e601 e e411

Sistema	Análise	Aparelho
Tiroideia	TSH	**Cobas e601**
	T3	
	T4	
	T3 livre	
	T4 livre	
	Anti-Tg (Ac. Anti-tiroglobulina)	
	Anti-TPO (Ac. Anti-tiroperoxidase)	
	FSH	

Hormonas de Fertilidade	LH	**Cobas e601**
	Progesterona	
	β – HCG	**Cobas e411**
	Prolactina	
Diagnóstico pré-natal	β – HCG	**Cobas e411**
	α – fetoproteína	
	β – HCG livre	
Hormonas da função Suprarrenal	ACTH	**Cobas e411**
	Cortisol	
	D.H.E.A.-S, Sulfato de DiHidroEpiAndrosterona	
Hormona gastrointestinal	Insulina	**Cobas e411**

Interpretação de resultados

Os resultados são avaliados em conjunto dentro de cada função endocrinológica.

Assim sendo, cada sistema é analisado como um todo e não cada parâmetro isoladamente.

Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas encontradas no sangue, tecidos ou urina que podem ser produzidas ou induzidas por células neoplásicas, refletindo o seu crescimento ou atividade. São utilizadas, por isso, para o rastreio de grupos de alto risco, avaliação do volume tumoral, avaliação da resposta à terapêutica, deteção de recidiva e avaliação de prognóstico.

Estas substâncias permitem conjuntamente com outros parâmetros ou exames, ajudar a diagnosticar e monitorizar determinados tipos de tumores.

Método

Por eletroquimioluminescência, os marcadores tumorais são doseados no aparelho automático **Cobas e411** e o Antigénio carcinoma-embrionário (**CEA**) é no **Cobas e6000.**

Interpretação de resultados

Os resultados são analisados tendo em conta o histórico do doente e a totalidade dos resultados obtidos noutros departamentos. Os resultados alterados são verificados e repetidos caso se torne necessário. Deve-se ter também em conta que os marcadores tumorais conhecidos e utilizados são também produzidos por células normais e os seus níveis são influenciados por um grande número de parâmetros.

Tabela 4: Interpretação de resultados dos marcadores tumorais

Marcador Tumoral	Aplicação
α – fetoproteína	Hepatocarcinoma e ovário
Antigénio carcinoma-embrionário (CEA)	Mama, pulmão, **cólon/reto**
CA 15.3	Mama
CA 19.9	Ovário, endométrio, tubo digestivo
CA 125	Ovário, endométrio
Antigénio prostático específico (PSA)	Próstata
β – HCG	Placenta, testículo

Serologia infeciosa

Método

A serologia infeciosa é feita maioritariamente no aparelho **VIDAS blue**, e no **Cobas e411**



Figura 14. Aparelho VIDAS blue

O **VIDAS blue** é um sistema multiparamétrico de imunoensaio que permite a realização de diversos testes em simultâneo. São determinados assim, vários parâmetros ao mesmo tempo.

O aparelho **VIDAS blue** utiliza cones que constituem a fase sólida da reação e estão sensibilizados com antigénios ou anticorpos, e barretes que contêm os reagentes necessários à reação.

O princípio de doseamento associa o método imune enzimático sandwich **ELISA** (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) em duas etapas com uma deteção final em fluorescência **ELFA** (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Este método assegura uma excelente sensibilidade e especificidade.

A amostra inicialmente é incubada com um anticorpo ou antigénio marcado com a enzima fosfatase alcalina. De seguida, ocorrem etapas de lavagem de forma a remover os componentes e o anticorpo/antigénio em excesso. Na etapa final de revelação, a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferilfosfato em 4-metil-umbeliferona, do qual resulta emissão de fluorescência a 450 nm após excitação a 370 nm. A emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de antigénio ou anticorpo presente na amostra.

A tabela que se segue resume os parâmetros determinados neste equipamento.

Tabela 5: Parâmetros determinados no Vidas blue

Parâmetro	Método
β2 – microglobulina	**Fotoquimioluminescência (sandwich)** **ELFA**
Citomegalovirus, IgG	
Citomegalovirus, IgM	
Estradiol (E2)	
Ferritina	
HAV, anticorpo, IgM	
HAV, anticorpo Total	
HIV1 e HIV2	
HBc, anticorpo IgM	
Rubéola, IgM	
Rubéola, IgG	
Testosterona Total	
Toxoplasmose, IgG	
Toxoplasmose, IgM	

Citomegalovírus (CMV)

O citomegalovírus (**CMV**) pertencente à família *herpesviridae*, vírus de genoma DNA, é comum em todas as populações humanas, provocando infeções que ficam latentes durante toda a vida do hospedeiro, com reativações ocasionais e com infeções recorrentes. A seroprevalência de anticorpos em adultos está compreendida entre os 40 e os 100%, apresentando uma correlação inversa com o estatuto socioeconómico. A maioria dos indivíduos adquire a infeção primária logo durante a infância, no convívio com outras crianças no infantário.

A transmissão da infeção ocorre por via vertical, requer o contato íntimo com excreções infetadas, como a saliva, urina, excreções do colo uterino (transmissão *in utero*) e da vagina, sémen, leite materno e sangue e ainda em consequência de transfusões ou transplantes de órgãos, em indivíduos imunodeprimidos. O vírus tem um período de incubação de 4 a 12 semanas.

A infeção pelo **CMV** na maioria dos casos conduz a uma infeção assintomática, contudo, o grupo de maior risco são as grávidas uma vez que há um grande risco para o feto se a primoinfeção acontecer durante a gravidez podendo haver morte do feto. A infeção sendo o principal agente de infeção congénita. O **CMV** também pode conduzir a infeções severas nos imunodeprimidos.

Depois de uma infeção primária (IgG positiva, IgM já negativa), o indivíduo pode ser reinfectado por um vírus de **CMV** exógeno ou por reativação do vírus latente. A reativação do vírus latente poderá dever-se a stress, doença grave, gravidez, etc…

Interpretação de resultados

O primeiro passo para diagnosticar a infeção por **CMV** é normalmente dado através da deteção dos anticorpos anti-CMV IgM e IgG.

A determinação dos anticorpos anti-CMV IgG é geralmente utilizada para avaliar inicialmente o estado serológico de um indivíduo. As amostras reativas para estas IgG indicam uma infeção primária, recente ou passada. Contudo a anti-CMV IgG apresenta algumas limitações:

- Indivíduos com infeção CMV aguda podem não exibir IgG detetável na fase precoce da infeção;
- As amostras que contêm anticorpos antinucleares (ANAs) ou outros anticorpos podem dar resultados falsos positivos;
- Um aumento de anti-CMV IgG pode ocorrer em pacientes com outras patologias, devido à reatividade cruzada antigénica dentro da família de herpesvírus (sarampo, varicela, herpes simples);
- Pacientes com infeção pelo vírus **Epstein-Barr** podem mostrar maior reatividade a **CMV**.

As amostras reativas para os anticorpos anti-CMV IgM indicam uma infeção aguda, recente ou reativa, estando estes anticorpos presentes em 70% das primoinfeções. As anti-CMV IgM persistem, em geral, 16 a 20 semanas após a infeção e podem aparecer, de forma inconstante, durante reativações.

No caso dos transplantados e imunodeprimidos a determinação serológica das IgG ou IgM não tem utilidade, pois muitas vezes os doentes morrem antes das Igs positivarem. Assim, deverá recorrer-se a outros testes quando existe uma suspeita de infeção por **CMV** (encefalite, cegueira, colite), como a pesquisa de DNA viral por PCR ou cultura viral.

Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infeção comum provocada pelo parasita protozoário *Toxoplasma gondii,* parasita oportunista em grávidas e em imunodeprimidos.

Cerca de 1/3 da população mundial está infetada. As principais formas de transmissão são através da ingestão de carne crua ou malcozinhada contendo quistos, ou por contacto com fezes de gatos infetados (hospedeiros definitivos).

Em pessoas imunocompetentes as infeções são normalmente assintomáticas, sendo que o maior risco ocorre em mulheres grávidas. Se a infeção ocorrer no primeiro

trimestre da gravidez pode-se gerar um quadro agudo que termina com a morte do feto ou num atraso físico e mental profundo do recém-nascido.

Interpretação de resultados

O diagnóstico da toxoplasmose é baseado principalmente na deteção de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

Se a IgG e IgM derem negativo significa que não houve contato com o parasita.

Se apenas a IgG der positiva significa que houve infeção, porém esta não é recente pois os níveis máximos são alcançados entre a 6ª e a 8ª semana, em seguida decrescendo gradualmente ao longo de meses ou anos.

A deteção de anticorpos IgM pode indicar uma infeção aguda, recente ou reativa e IgG negativa. Os indivíduos infetados exibem, tipicamente, níveis detetáveis de IgM imediatamente após a ocorrência dos sintomas.

Se tanto a IgG e IgM derem negativas significa que houve uma infeção recente ou reativação, sendo aconselhada a determinação da avidez da IgG para determinar quando se deu esta infeção.

Rubéola

A rubéola é causada por um vírus de genoma RNA pertencente à família *Togaviridae*.

O período de incubação do vírus é de 2 a 3 semanas e a transmissão ocorre através de gotículas de saliva ou pelas secreções nasofaríngeas. O indivíduo infetado é contagiosos 8 dias antes a 8 dias após o início dos sinais clínicos.

A doença carateriza-se por linfo adenopatias, erupções maculopapulosas, febre moderada, artralgias e mal-estar geral. Contudo, a importância desta doença está relacionada com a sua capacidade de provocar malformações graves no feto cuja a mãe foi infetada durante a gravidez, mais particularmente quando a primoinfeção ocorre durante o primeiro trimestre. A partir da 20ª semana as sequelas no feto são raras. O vírus pode ser transmitido através da placenta e pode ter como resultado a morte do feto ou causar malformações graves fetais, vulgarmente designadas por Síndrome da Rubéola Congénita (**SRC**). A SRC é uma causa importante de cegueira, surdez, doença cardíaca congénita, microcefalia e atraso mental. Algumas destas sequelas aparecem 2 a 4 anos após o nascimento.

Atualmente o programa de vacinação de crianças e a vacinação de mulheres em idade fértil que não estejam imunes à infeção pelo vírus da rubéola, reduziram consideravelmente a incidência de infeção aguda pelo vírus da rubéola, bem como a incidência de SRC. A vacinação não pode ser feita a grávidas e recomenda-se que, após vacinação, a mulher não engravide durante 3 meses.

Interpretação de resultados

É feita a pesquisa de anticorpos IgM e IgG para a rubéola. A deteção dos anticorpos IgG é importante na avaliação do estado imunológico e no diagnóstico de infeção por rubéola. A presença de anticorpos IgG normalmente indica a presença de imunidade que pode ter sido induzida por uma infeção passada ou vacinação. Na presença de imunidade de um resultado positivo é necessário realizar uma segunda colheita espaçada de mais ou menos de 2 semanas da primeira. Nesta segunda colheita, se os títulos de anticorpos forem estáveis, estamos perante uma infeção antiga, caso haja um aumento dos títulos de anticorpos poderá significar uma primoinfeção. Contudo, para confirmar uma primoinfeção é necessário proceder à determinação da avidez das IgG. A presença de anticorpos IgM pode indicar, na maioria dos casos uma infeção aguda (primoinfeção recente) e, mais raramente pode estar relacionada com situações de reinfeção ou casos em que as IgM persistem durante mais tempo que o normal. A sua duração na circulação sanguínea é de 3 a 6 semanas após os sintomas, após o qual tendem a desaparecer.

A pesquisa de IgM é de grande utilidade no diagnóstico de infeção em recém-nascidos, pois a sua presença indica infeção congénita, já que esta classe de anticorpos não atravessa a placenta.

Hepatite A (HAV)

A hepatite A é causada por um vírus de genoma RNA, da família dos picornavírus que entra no organismo através do aparelho digestivo e multiplica-se no fígado, causando neste órgão a inflamação denominada de hepatite A.

O modo de transmissão é devido às más condições de higiene e sobrelotação, ocorrendo por via fecal-oral, através da água, alimentos ou talheres contaminados com dejetos contendo o vírus; ou mais raramente, por contato direto (contatos anais, saliva, sangue). Trata-se da hepatite mais contagiosa. Durante o período de incubação (20 a 40 dias), a doença não se manifesta.

Inicialmente assemelha-se a uma gripe com febre, mialgias e mal-estar, depois aparece a icterícia, a falta de apetite e os vómitos.

Interpretação de resultados

O teste para a deteção dos anticorpos anti-HAV totais mede os anticorpos IgG e IgM. Assim, o teste anti-HAV total é positivo mesmo no início da doença, devido às IgM=infeção recente, apesar dos anti-HAV IgG só se tornarem positivos cerca de 2 semanas após o início da doença (figura 15). Um elevado título anti-HAV total pode persistir por toda a vida devido à positividade das IgG, o que proporciona proteção contra a doença em caso de reinfeção. Após a vacinação, também é possível a deteção de anticorpos IgG anti-HAV durante anos. A verdadeira indicação do teste é, portanto, a demonstração da imunidade à hepatite A após infeção ou imunização passiva (vacinação). Um teste anti-HAV total negativo exclui uma hepatite A recente ou passada, ou vacinação prévia. Não existe um valor definido para considerar que o indivíduo é

imune à hepatite A; no entanto, um título anti-HAV total > 10-20 UI/mL é visto geralmente com evidência de imunidade.

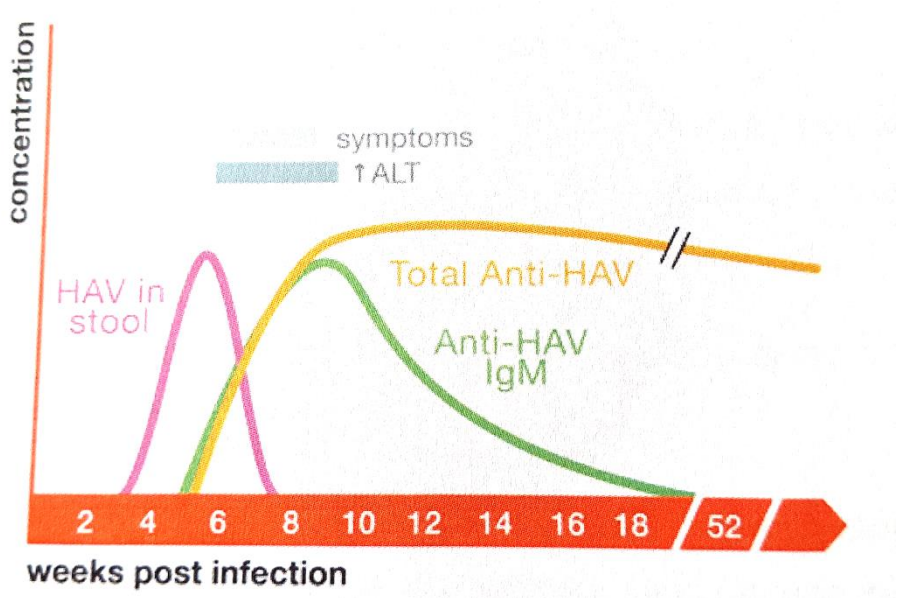


Figura 15. Marcadores clínicos da hepatite A

Hepatite B (HBV)

A hepatite B é causada por um vírus de genoma DNA de cadeia dupla, pertencendo à família *Hepadnaviridae.*

A hepatite B é considerada a hepatite mais perigosa. O vírus pode ser transmitido por via parental, sexual (principal via de transmissão na Europa) ou vertical (principal via de transmissão na Ásia). Encontra-se em elevada concentração no sangue de indivíduos infetados, sendo dez vezes mais transmissível por via sanguínea que o vírus da hepatite C e 100 vezes mais transmissível que o vírus **HIV**, bastando uma simples picada para que haja o contágio e sendo capaz de sobreviver no sangue seco mais de uma semana. Apresenta um período de incubação de 30 a 180 dias (média 10 semanas), findo os quais se inicia a proliferação a nível dos hepatócitos, para os quais apresenta tropismo. De acordo com a idade e a resposta biológica do hospedeiro, poderá então instalar-se uma hepatite aguda.

O diagnóstico laboratorial da infeção pelo **HBV** baseia-se na deteção serológica de antigénios virais e dos respetivos anticorpos, bem como do DNA viral.

Interpretação de resultados

A infeção por este vírus pode apresentar-se clinicamente de duas formas: infeção aguda (com ou sem sintomatologia) e infeção crónica (com ou sem sintomatologia). Uma infeção aguda pode ou não evoluir para uma infeção crónica, dependendo do tipo de vírus, principalmente da resposta imunológica do hospedeiro. O

diagnóstico e monitorização da evolução da infeção, isto é, se evolui para a cronicidade ou não, é feita pela quantificação dos vários anticorpos e antigénios (figura 16)

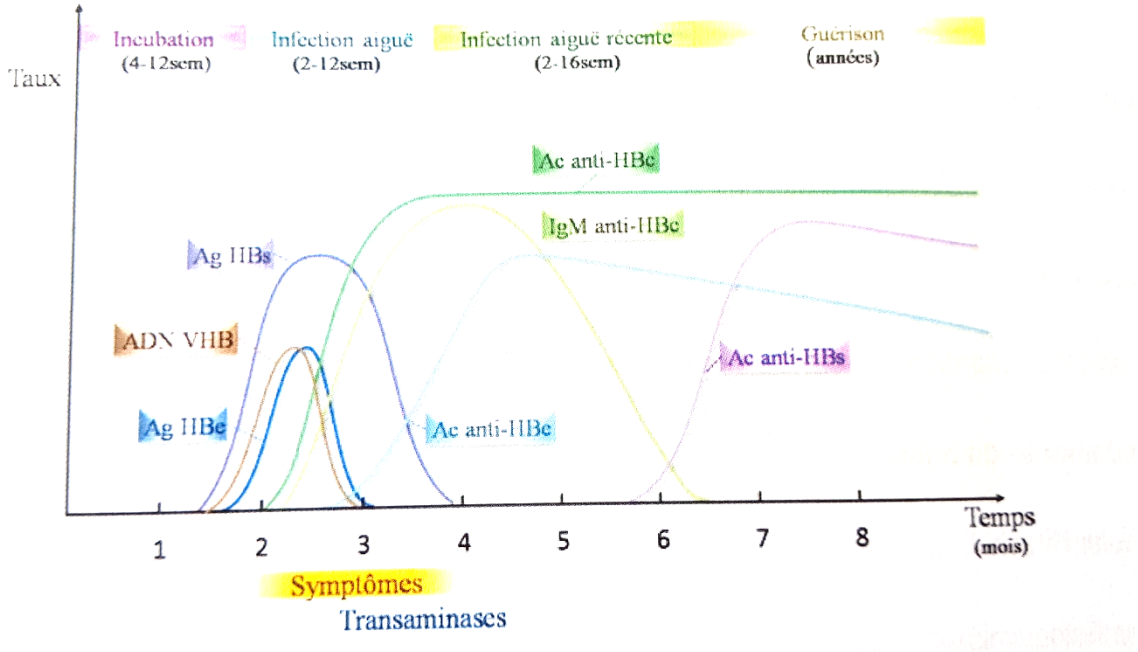


Figura 16. Marcadores bioquímicos presentes nas várias fases de uma infeção por hepatite B

É um vírus com um invólucro externo e um núcleo interno de genoma DNA de cadeia dupla, mas replica-se através de um intermediário de RNA. O invólucro viral contém 3 proteínas que se correlacionam com o **Ag HBs** (de superfície). A camada interna correlaciona-se com o **Ag HBc** (de *core*) presente na nucleocápside; contém o DNA em camada dupla e a enzima DNA polimerase, que se relaciona com o **Ag HBe** (de *early*). O **Ag HBc** nunca é detetado no sangue, apenas detetando-o nos hepatócitos. O organismo reage produzindo anticorpos contra os três antigénios: **anti- HBs**, **anti-HBe** e **anti-HBc**.

- **Ag HBs (de superfície) -** é o primeiro a surgir no sangue, após o período de incubação. Na hepatite crónica este antigénio está sempre presente (por definição, trata-se de hepatite crónica se **Ag HBs** positivo por mais de 6 meses após o período de incubação), enquanto que o **Ag HBe** só está presente em 80% dos casos. A cronicidade sem **Ag HBe** presente é geralmente mais grave.

- **Ag HBe (de early) -** o paciente torna-se infecioso, portanto é considerado um marcador de replicação e infecciosidade do **HBV**. É detetado em fases de replicação viral, indicando que se trata de uma hepatite aguda ativa. Desaparece de circulação pouco depois do aparecimento dos sintomas e depois do **Ag HBs**, dando-se a seroconversão para **anti-HBe** na fase de recuperação. Mas pode estar presente numa infeção crónica indicando uma replicação ativa. A deteção de **Ag Hbe** é, pois, útil, em associação com o **teste Ac anti-HBe**, para monitorizar a evolução da infeção por **HBV**.

- **Ac Anti-HBs -** A presença destes anticorpos em circulação induz normalmente imunidade para o vírus da hepatite B ou exposição anterior ao vírus. É usado normalmente para verificar a eficácia da vacinação contra o vírus da hepatite B. Surgem 1 a 2 semanas após a infeção ou na fase de recuperação da infeção aguda, após o desaparecimento do **AgHBs** indicando a evolução da doença para a cura.

- **Ac anti-HBe -** a fase de recuperação da infeção aguda da hepatite B, o **Ag HBe** é o primeiro marcador serológico a ficar negativo, sendo substituído pelos **Ac anti- HBe**. Este anticorpo corresponde ao declínio da infecciosidade.

- **Ac anti-HBc total –** Os anticorpos anti-HBc são os primeiros a serem detetados e podem estar presentes numa infeção aguda, crónica ou infeção antiga. Quando aparecem em conjunto com o **Ac anti-HBs** significa infeção passada, com imunidade.

Resumindo:

São marcadores de infeção aguda ativa, o **Ag HBs**, **Ag HBe** (marcador de replicação viral e nas fases mais avançadas, **Ac anti-HBc** (total ou IgM).

São marcadores de cura **Ag HBs negativo**, **Ag HBe negativo, Ac anti-HBe positivo, Ac anti-HBc e muito mais tarde o Ac anti-HBs positivo.**

É marcador de infeção crónica **Ag HBs positivo** por mais de 6 meses.

É marcador de vacinação **Ac anti-HBs positivo**.

(Hepatite C)

O vírus da hepatite C é um vírus RNA de cadeia simples, com invólucro, pertencendo à família *Flaviviridae.*

A sua transmissão é principalmente através do sangue (partilha de seringas em toxicodependentes e transfusões) e de produtos derivados de sangue (transplante de órgãos) contaminados com o vírus e, em menos grau através das secreções do corpo humano (contato sexual) ou por via vertical.

A infeção pelo **HCV** evolui para uma hepatite crónica em cerca de 80% dos casos e nestes casos pode conduzir a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular.

Interpretação de resultados

Atenção a determinação de anticorpos anti-HCV é efetuado no **Cobas 6000**. Estes anticorpos surgem entre 15 dias e 6 meses após a infeção e são indicativos de uma infeção recente ou passada.

HIV

O vírus da imunodeficiência humana (**HIV**) é um vírus de genoma RNA pertencente à família dos retrovírus. Até á data foram identificados dois tipos, HIV1 e HIV2, ambos agentes causais pelo Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (**SIDA**).

A sua transmissão é principalmente por via sexual, por contato com sangue contaminado, perinatal e transplacentário. A infeção por este vírus é uma infeção crónica uma vez que o hospedeiro é incapaz de eliminar o vírus.

Interpretação de resultados

Deteção de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e antigénio p24; é, portanto, um método indireto de diagnóstico.

Quando a transmissão do HIV ocorre o sistema imunitário desenvolve anticorpos contra o vírus, que podem ser detetados por testes de rastreio cerca de 2 a 8 semanas após a exposição ao vírus. Contudo, se a exposição ao vírus é mais recente, o nível de anticorpos pode ser demasiado baixo e terá de se repetir a pesquisa de anticorpos. Assim o modo a ultrapassar este problema, surgiram os testes de rastreio de 4ª geração que permitem a determinação simultânea do antigénio p24, e dos anticorpos para o HIV1 e HIV2.

Os níveis de antigénio p24 são tipicamente elevados no início da infeção (período entre a contaminação e o aparecimento de anticorpos) e assim, a combinação da deteção do antigénio e dos anticorpos aumenta a probabilidade de deteção da infeção pelo HIV, diminuindo o intervalo entre a contaminação e o diagnóstico.

Caso o resultado do teste seja positivo, reativo=>0,25, é necessário primeiro a repetição do teste do imunoensaio. Após repetição, o resultado deve ser confirmado com o **teste Western-blot**; que eu por acaso não fiz no meu laboratório. Neste teste ocorre igualmente uma reação imune enzimática em fase sólida, mas é possível descriminar para que antigénios virais existem anticorpos na amostra em estudo, uma vez que os antigénios virais são previamente separados entre si através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, antes de serem transferidos para o suporte sólido (membrana de nitrocelulose). Consoante o perfil de anticorpos presente na amostra, assim a amostra é classificada como positiva, indeterminada ou negativa.

Testes serológicos de imunologia

Diagnóstico imunológico de gravidez

A **Gonodotrofina Coriónica Humana (HCG)** é uma hormona produzida pela placenta na mulher grávida. Os níveis séricos são detetados a partir do 13ºdia após a nidação do embrião no útero. Esta hormona só é excretada na urina durante a gravidez e só é detetada na urina a partir da 5º semana usando uma reação de aglutinação direta.

Método

O método usado é uma reação de *aglutinação direta* com partículas de látex revestidas de anticorpos monoclonais **anti-HCG**. Estas partículas interagem com a **HCG** presente na urina provocando uma aglutinação visual macroscópica.

Reação de Waaler-Rose

Os **fatores reumatoides** são um grupo de anticorpos dirigidos à porção Fc da molécula de IgG. Apesar de se encontrarem numa série de doenças reumáticas, tais como o Lúpus Eritematoso Sistémico (**SLE**) e Síndrome de Sj¨ogren, e também nalgumas doenças não reumáticas, o seu papel é essencial no **diagnóstico da artrite reumatoide**. Estima-se que 80% dos doentes com artrite reumatoide tenham o fator reumatoide positivo.

Método

A reação de Waaler-Rose é um método de hemaglutinação para a determinação semi-quantitativa do fator reumatoide no soro humano.

São utilizados eritrócitos de carneiro sensibilizados com IgG de coelho e que aglutinam na presença do fator reumatoide na amostra.

Antigénios febris

Os testes de antigénios febris são suspensões normalizadas de bactérias utilizadas para identificar e quantificar anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infeções febris, tais como a Brucelose, Salmonelose e certas Rickettsioses. Estes testes são aplicações serológicas para as reações clássicas da *Reação de Widal* para o diagnóstico da febre tifoíde e a *Reação de Weil-Felix* em que os antigénios preparados a partir de *Proteus* são usados para detetar anticorpos anti Rickettsias.

Método

Os testes de **antigénios febris** utilizam como método uma reação de aglutinação direta entre uma suspensão de bactérias inativadas e tingidas, e o soro do paciente. O antigénio da suspensão aglutina na presença do correspondente anticorpo homólogo nas amostras ensaiadas.

Reação de Widal

Diagnóstico da febre tifoide.

Antigénios usados:

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

Os títulos superiores a 1/80 para os antigénios da *Salmonella* são indicativos de doença recente.

As reações com o Antigénio O (somático) ocorrem mais precocemente, em geral, após a primeira semana de infeção; as reações com antigénio H (flagelares) são mais tardias e persistem durante algum tempo. Esta reação consiste num ensaio de aglutinação entre os antigénios O e antigénio H comerciais e a amostra de soro.

Reação de Paul-Bunnel

Este teste é usado para detetar a **infeção pelo vírus Epstein-Barr**, o qual causa a **mononucleose infeciosa.** Esta reação deteta a presença de anticorpos heterófilos.

Método

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

Reações de deteção de *Treponema pallidum*

A **Sífilis** é causada pela espiroqueta *Treponema pallidum*, bactéria gram-negativa.

1) Teste Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)

Trata-se de um método não-treponémico. Permite a deteção de anticorpos IgM e IgG contra o antigénio cardilipina-lecitina-colesterol. Este teste possui a função de rastreio ou de monitorização terapêutica; portanto é um teste sensível, mas pouco específico.

Método

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

As amostras positivas por este método devem ser analisadas por provas treponémicas, como o **TPHA** antes de confirmar a infeção. Podem surgir falsos-positivos nalgumas situações, tais como: toxicodependência, outras doenças venéreas ex. mononucleose infeciosa, gravidez e doenças autoimunes ex.: lúpus eritematoso sistémico.

2) TPHA

O teste **TPHA** é um teste treponémico e utiliza o treponema como antigénio, detetando anticorpos contra o mesmo. Este teste é um teste confirmatório de alta especificidade.

Método

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

Referências Bibliográficas

ATB™ HAEMO Antibiogramme pour les Haemophilus et Branhamella. In: BioMérieux, editor. Marcy-l'Etoile 2003

BioMérieux. Meios de cultura, Lyon.: BioMérieux SA; 2010

Bradwell A. R., Stokes R. P., Johnson G. D., *Atlas of Autoantibody Patterns on tissues*, 2nd edition: The Binding Site, 2004

Burtis A, Ashwood R, Bruns E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th ed: Saunders; 2001. p. Charpter 18-Aminoacids and Proteins.

Folheto Informativo da determinação da carga viral da Hepatite C: COBAS® Taqman® 48 HCV Test for use with the high puré system. Doc Rev 5.0; Roche Molecular Systems, 2010

Gilberto Angel M./ Maurício Agel R., *Interpretación Clínica del Laboratorio*. 5ª edición Editorial Médica, Panamericana, 2010

Hagemann P., kimling H., Zawta B., *Fundamental of Laboratory Testing – Urine*: Roche diagnostics, 2012

Lewis M, Bain J, Bates I. Hematologia Prática de Dacie e Lewis. 11th ed: Artmed; 2011

McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis ans Management by Laboratory merhods. 22th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011

Murray P. Manual of clinical microbiology 8th ed. Washington: ASM Press; 2003

Sistema Cobas. Disponível em https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas_-6000-analyzer-series.html (acedido em 09/07/2018)

Sistema Vidas blue. Disponível em https://www.biomerieux.pt/produto/solucao-vidasr (acedido em 01/07/2018)