

**FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE
COIMBRA**

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

TESE DE MESTRADO

Aluno Estagiário: Alexandra Cristina Barranha Rego Canha da Costa Rodrigues

Laboratório de Estágio: Laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Coimbra.

Orientador de Estágio: Dr.^a Isabel Albuquerque

Áreas Abrangidas pelo Estágio: Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Biologia Molecular.

Áreas Selecionadas: Bioquímica e Biologia Molecular.

Período de Estágio: Ano Lectivo 2010 / 2011

Coimbra, 2013

AGRADECIMENTOS:

Ao chegar ao fim desta Odisseia, quero agradecer: ao José Luís, à Mafalda e ao José Joaquim pela presença, compreensão, motivação, encorajamento e paciência; aos meus pais e irmãos pelo carinho.

Às minhas colegas Dina e Ana Cristina pela força e ânimo dados.

Agradeço também à Responsável pelo Serviço, Dr.^a Isabel Albuquerque e orientadora deste trabalho pela revisão e aconselhamento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. CARACTERIZAÇÃO DOS LABORATÓRIOS DE ESTÁGIO.....	10
2.1. Identificação dos Laboratórios.....	10
2.2. O Serviço de Patologia Clínica.....	10
2.3. Caracterização dos Laboratórios de Bioquímica.....	11
2.4. O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Pediátrico:.....	12
3. CONTROLO DE QUALIDADE.....	13
4. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	14
4.1. O Laboratório de Bioquímica do HP.....	14
4.2. Análises realizadas.....	16
4.3. Principal equipamento existente no LB.....	16
4.4. Analitos.....	17
4.4.1. Hidratos de Carbono (HC) e seus metabolitos:.....	17
a) Glicose.....	17
b) Lactato.....	17
c) Outras determinações realizadas:.....	17
4.4.2. Proteínas.....	18
a) Proteína C Reactiva (PCR).....	18
b) Outras determinações realizadas:.....	18
4.4.3. Enzimas.....	18
a) Creatina Cinase (CK).....	18
b) Isoenzima MB da creatina cinase (CK-MB).....	19
c) Colinestarase (CHE).....	19
d) Outras determinações realizadas:.....	19
4.4.4. Compostos Nitrogenados não Proteicos.....	20
a) Amónia.....	20
b) Outras determinações realizadas:.....	20
4.4.5. Lípidos e Lipoproteínas.....	20
a) Colesterol LDL.....	20
b) Outras determinações realizadas:.....	21
4.4.6. Electrólitos e Gases no Sangue.....	21
a) Teste de Suor - Cloreto (Cl ⁻).....	21
b) Osmolalidade.....	22
c) Gasimetria.....	22

4.4.7.	Iões Inorgânicos	24
a)	Cálcio	25
b)	Outras determinações realizadas:	25
4.4.8.	Hormonas.....	25
a)	Procalcitonina (PCT)	25
4.4.9.	Bilirrubinas.....	26
a)	Bilirrubina conjugada (Bc) e da Bilirrubina não conjugada (Bu).....	27
4.4.10.	Fármacos.....	28
a)	Antiepilépticos	29
b)	Lítio, Acetoaminofeno, Teofilina e Digoxina	29
c)	Antibióticos	30
d)	Antineoplásico.....	30
e)	Imunossupressores	30
4.4.11.	Tóxicos.....	32
a)	Etanol (ALC).....	32
4.4.12.	Biomarcadores Cardíacos.....	32
a)	Mioglobina.....	32
b)	Troponina	33
c)	Fracção N Terminal do Pro-Péptido Natriurético Cerebral (NT-proBNP).....	33
d)	Proteína C Reactiva de alta sensibilidade (hsPCR)	33
4.5.	Estudo da Urina.....	34
4.5.1.	Análise Sumária de Urina ou Urina Tipoll	34
4.5.2.	Ácido Vanilmandélico (AVM).....	35
4.5.3.	Outras determinações Bioquímicas.....	35
4.5.4.	Testes Metabólicos Simples.....	35
a)	Teste DNPH (dinitro-fenil-hidrazina).....	36
b)	Teste do Nitroprussiato (Reacção de Brandt).....	37
c)	Pesquisa de Sulfitos.....	37
d)	Pesquisa de Substâncias Redutoras totais (açúcares):	37
4.5.5.	Beta Clear HCG da CORE Diagnostics	38
4.5.6.	DRUG-Clip Test 10 da A.MENARINI diagnostics	39
4.5.7.	Exame Microbiológico	40
a)	Uriline da Biomérieux.....	40
b)	Slidex [®] meningite Strepto B da Biomérieux.....	40
4.6.	Líquidos Biológicos	40
4.6.1.	Líquido Céfalo- Raquidiano (LCR).....	41
a)	PASTOREX [™] MENINGITIS da BIO-RAD	43
4.6.2.	Líquido Amniótico (LA).....	43

4.7.	Fezes.....	43
4.7.1.	FOB da Ultimed.....	43
4.7.2.	VIKIA® Rota-Adeno da Biomérieux.....	44
4.7.3.	Esteatócrito ácido.....	45
4.8.	Outras determinações.....	45
4.8.1.	Testes Imunocromatográficos.....	45
	a) Exact Strep A Cassette da Clearview.....	45
	b) Determine HIV-1/2 da Inverness Medical.....	46
4.8.2.	Serodiagnósticos - Febrile Antigens da Linear Chemicals.....	46
	a) Rosa de Bengala.....	47
	b) Teste de Wright.....	47
	c) Teste de Weil-Felix.....	47
	d) Reacção de Widal.....	47
5.	ESTUDO – “Infecções respiratórias na criança – Novos caminhos”.....	48
5.1.	Infecções Respiratórias Virais.....	48
5.1.1.	Vírus Respiratórios.....	48
	a) Vírus Influenza.....	48
	b) Vírus Sincicial Respiratório - RSV.....	53
	c) Diagnóstico Laboratorial.....	53
5.2.	Validação da aplicabilidade do Sistema Verigene® RV+ aos vírus respiratórios.....	54
5.2.1.	Importância da Tecnologia Verigene® RV+ da Nanosphere.....	54
5.2.2.	O Sistema Verigene®.....	55
5.2.3.	Metodologia.....	55
	População de amostragem:.....	56
	Colheita, manuseamento e armazenamento de amostras:.....	56
	Preparação da amostra para a análise:.....	56
	Processamento da amostra:.....	56
	RT-PCR:.....	56
	Resultados.....	57
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	Anexo I – Equipamentos.....	65
	Anexo II – Valores de Referência.....	69
	Anexo III – Tecnologia VITROS e Metodologia Aplicada.....	76
	Anexo IV – Manual de Colheitas para Doseamento de Fármacos.....	84
	Anexo V – Urina.....	87
	Anexo VI – Cadeias de referência de vírus respiratórios usados para comparação de sequências.....	90

ABREVIATURAS

Ac – Anticorpo
ADA – Adenosina Desaminase
ADN ou DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ARN ou RNA – Ácido Ribonucleico
ADP – Adenosina Difosfato
Ag – Antigénio
an – Ácido Nucleico
ATP – Adenosina Trifosfato
BM – Biologia Molecular
BQ – Bioquímica
CHC – Centro Hospitalar de Coimbra E.P.E.
CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra E.P.E.
CV – Coeficiente de Variação
DCV – Doença Cardio-Vascular
DM – Doença Metabólica
DMH – Doenças Metabólicas Hereditárias
DMLA – Departamento de Medicina Laboratorial
EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio
EDTA – Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
EIM – Erros Inatos do Metabolismo
GABA – Ácido Gama-Aminobutírico
Gram (-) – Coloração de Gram negativa
Gram (+) – Coloração de Gram positiva
HA – Hemaglutinina
Hb – Hemoglobina
HC – Hidratos de Carbono
HG – Hospital Geral
HP – Hospital Pediátrico Prof. Carmona da Mota
IC – Insuficiência Cardíaca
Lab – Laboratório
LB – Laboratório de Bioquímica
LBHP – Laboratório de Bioquímica do Hospital Pediátrico Prof Carmona da Mota
LCR – Líquido Céfalo-Raquidiano

MBB – Maternidade de Bissaya Barreto

NA – Neuraminidase

PC – Patologista Clínico

PCR – Polymerase Chain Reaction

RT-PCR – Transcriptase Reversa seguida de Polymerase Chain reaction

PTGO – Prova de Tolerância a uma dose de Glicose Oral

PTH – Hormona da Paratiróide ou Paratormona

SNC – Sistema Nervoso Central

SPC – Serviço de Patologia Clínica

ssRNA – RNA de cadeia simples

(-)ssRNA – RNA de cadeia simples e polaridade negativa

RSV – Vírus Respiratório Sincicial

TDT – Técnico de Diagnóstico e Terapêutica

TSS – Técnico Superior de Saúde

λ – Comprimento de onda

°C – grau Celsius

RESUMO

A presente tese tem como objectivo descrever a minha experiência profissional e caracterizar a organização e o funcionamento do Laboratório de Bioquímica do Hospital Pediátrico de Coimbra. São apresentadas as diversas tecnologias e metodologias analíticas aplicadas, bem como os fundamentos subjacentes à interpretação e validação dos resultados laboratoriais obtidos.

Na segunda parte, expõe-se o estudo realizado em colaboração com o Serviço de Urgência do HP intitulado “ Infecções Respiratórias na criança – Novos caminhos”.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is to describe my professional experience and to characterize the organization and functioning of the Biochemistry Laboratory of Coimbra's Pediatric Hospital (HP). The various technologies and analytical methodologies applied are presented, as well as the rational underlying the interpretation and validation of results obtained in the laboratory.

In the second part, I present the study conducted in collaboration with the Emergency Service of the HP, entitled "Respiratory Tract Infections in Children - New Paths".

I. INTRODUÇÃO

É propósito deste relatório de estágio descrever a experiência quotidiana (**o que e como** se faz) do Estagiário como Técnico Superior de Saúde, no Laboratório de Bioquímica do Hospital Pediátrico de Coimbra. Destaca-se o que é relevante para a população que serve: a Pediátrica.

A Medicina Laboratorial é uma Ciência viva e em constante evolução de modo a responder aos desafios, obrigando todos os intervenientes a uma atualização permanente.

As novas patologias, as novas tecnologias e a automatização requerem uma atitude crítica profunda baseada no conhecimento adquirido pela experiência e pela teoria, uma vez que não há verdades absolutas nem técnicas infalíveis.

A confiança no laboratório constrói-se ao longo do tempo. É um processo contínuo e delicado que faz com que o Laboratório, parceiro hoje imprescindível no auxílio e confirmação do diagnóstico, prognóstico e terapêutica, possua uma postura assente na Qualidade Analítica e Humana, necessitando portanto de recorrer a procedimentos e metodologias que garantam a fiabilidade dos resultados emitidos. Isto implica uma organização baseada no fluxo da amostra, na celeridade, no rigor, na precisão e exatidão do resultado, bem como no respeito pelo utente.

A organização deste trabalho começa pela caracterização do Laboratório e da população que serve, passando pelos principais equipamentos e metodologias existentes, apresentando as suas particularidades e terminando com um dos estudos efectuados em colaboração com outros Serviços o que demonstra a preocupação na evolução e melhoria constante da Medicina Laboratorial e do Serviço de Patologia Clínica, ao qual pertencem. Este estudo, intitulado “Infecções Respiratórias na criança – Novos caminhos” decorreu de Dezembro de 2010 a Março de 2011 e foi realizado em colaboração com o Serviço de Urgência deste Hospital contribuindo para a validação da técnica e sua aplicabilidade na rotina num futuro próximo.

2. CARACTERIZAÇÃO DOS LABORATÓRIOS DE ESTÁGIO

2.1. Identificação dos Laboratórios

O Estágio decorreu, maioritariamente, no Laboratório de Bioquímica do Hospital Pediátrico Prof. Carmona da Mota (LBHP), pertencente ao Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Departamento de Medicina Laboratorial (DMLA) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. (CHUC), sob a Direcção da Dr.^a Henriqueta Pereira, Patologista Clínica.

O Centro Hospitalar de Coimbra, EPE (CHC), criado pelo Decreto-Lei n.º 50-A/2007, de 28 de Fevereiro, integra três estabelecimentos hospitalares: o Hospital Geral (HG) - também conhecido por Hospital dos Covões, o Hospital Pediátrico (HP) e a Maternidade de Bissaya Barreto (MBB).

Área de influência e população servida: Sem prejuízo do princípio da liberdade de escolha no acesso à rede nacional de prestação de cuidados de saúde, consagrado na Lei de Bases da Saúde, as áreas de influência dos hospitais que integram o CHC são as seguintes:

- A do Hospital Geral abrange a zona da Unidade de Saúde de Coimbra Sul e, enquanto hospital central, constitui referência para os doentes enviados pelos Hospitais da Figueira da Foz, de Leiria e de Pombal.
- A da Maternidade de Bissaya Barreto abrange vinte e um centros de saúde da sub-região de saúde de Coimbra e, como hospital de apoio pré-natal diferenciado, constitui referência para os hospitais de Castelo Branco, Figueira da Foz e Leiria.
- A do Hospital Pediátrico abrange toda a região centro do país, assumindo-se como hospital de referência para os Hospitais Distritais da Região Centro e para os Centros de Saúde do Concelho de Coimbra. Constitui-se ainda, como referência nacional para patologias específicas - Hepatologia (Transplantes), Genética, Doenças Metabólicas e Centro de Desenvolvimento/Neurologia - em crianças dos 0 aos 18 anos.

2.2. O Serviço de Patologia Clínica

Dispõe das valências de Bioquímica (BQ), Imunoquímica, Imunologia, Microbiologia, Parasitologia, Virologia e Biologia Molecular (BM), encontrando-se os respectivos laboratórios distribuídos pelo HG e HP.

Tem implementado um programa informático de gestão laboratorial – Clinidata XXI da empresa Maxdata – que permite:

- A integração dos sistemas informáticos hospitalares existentes (*Alert*- Serviço de Urgência do HG, *SONHO* - Sistema Integrado para Informação Hospitalar, *SAM* – Sistema de Apoio ao Médico e *SAPE* – Sistema de Apoio à Enfermagem);
- A integração dos mais variados equipamentos auto-analisadores, possibilitando o acesso em rede e em qualquer dos três Hospitais, a todos os resultados analíticos e do Controlo de Qualidade Interno, gerados por qualquer um dos laboratórios;
- Ao Clínico e aos demais intervenientes neste processo, através de permissões selectivas, dar e obter as informações mais diversas, sejam de carácter analítico, estatístico ou sobre facturação.

A aplicação deste programa informático permite uma maior eficiência nas três fases do processo analítico, com consequente optimização dos recursos, o que se traduz em segurança, redução de custos e qualidade.

2.3. Caracterização dos Laboratórios de Bioquímica

O Sector da BQ possui dois Laboratórios, localizados no HP e no HG, que se complementam e apoiam, quer em mobilidade de Recursos Humanos, quer na execução de análises. São laboratórios que prestam serviço de Urgência, laborando 24 horas por dia e 365 dias por ano, daí a existência de escalas de urgência conjuntas e rotativas, tanto para os Patologistas Clínicos (PC) como para os Técnicos Superiores de Saúde (TSS).

Os Laboratórios de Bioquímica (LB) servem uma população muito heterogénea, quer em termos de idade, de proveniência e de patologias.

O movimento médio diário destes Laboratórios é de 120 doentes / 2850 análises no HG, e de 70 doentes / 850 análises no HP.

Os resultados analíticos são expressos, na generalidade, nas Unidades do Sistema Internacional (SI).

Os LB dispõem dos seguintes equipamentos (**Anexo I**):

- *Vitros®5600 Integrated System*, *Vitros®5*, *IFS Chemistry System* e *Vitros®350 Chemistry System* - Autoanalisadores de Química Seca da Ortho Clinical Diagnostics;
- *Dimension RXL® Chemistry Analyzer* da Siemens – Autoanalisador de Química Líquida;

- *GEM® Premier 3000* da Instrumentation Laboratory – Analisador de Gases no Sangue;
- *AutionMAX, SediMAX e AutionJET* da A. MENARINI Diagnostics – Sistemas de Urinálise;
- *Automated Glycohemoglobin Analyser HLC-723G8* da TOSOH – Hemoglobinas glicosiladas;
- *VAPRO® 5520*, Vapor Pressure Osmometer da Wescor – Osmómetro;
- *3100 Sweat Check* da Wescor – Analisador de Condutividade do Suor;
- *UV – 1800UV-VIS Spectrophotometer com TMSPC8* da Shimadzu® Scientific Instruments – Espectrofotómetro com temperatura controlada;
- *Ultrospec 3000 UV / Visible Spectrophotometer* da Pharmacia Biotech;
- *Mini VIDAS®* da BioMérieux;
- 2 Microscópios Carl Zeiss;
- *ESCO Classe II, Type B2* da Labculture - Câmara de Fluxo Laminar Vertical;
- Centrífugas (inclusivé I refrigerada) da Thermo Scientific, Centrífuga para tubos micro-hematócritos, *pH-meter Basic20+* da Crison - Medidor de pH, Balanças de precisão e analítica, Banho-Maria da Memmert, Agitador de rolos, Vórtex, Placa de aquecimento, Agitador magnético, Densitómetro óptico, Frigoríficos e Arcas congeladoras (-20°C e -80°C).

2.4. O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Pediátrico:

Está organizado em duas áreas:

- A entrada, comum a todos os laboratórios e de livre acesso, onde se encontra a zona de recepção e atendimento, a sala de espera, a sala de colheitas, as instalações sanitárias e os vestiários;
- A área laboratorial, de acesso restrito, é constituída por áreas individualizadas (Laboratórios de Bioquímica, de Imunoquímica, de Citogenética, de Biologia Molecular e de RIA-Radioimunoensaio), e zonas comuns (sala de triagem, sala de reagentes voláteis, sala de frio, sala de lavagem, sala de esterilização / autoclavagem, sala de limpos, sala de sujos, armazém, arquivo de documentação, sala de reuniões, gabinetes e sala de pausa).

Recepciona todo o tipo de amostras (sangue, urina, fezes, líquidos biológicos, biópsias) com as mais variadas solicitações (análise, estudos, reservas), de todos os Serviços do HP, da MBB e do HG, para processar internamente ou no exterior. Os produtos a enviar ao exterior, para Laboratórios de Apoio ou de Referência, Nacionais e Estrangeiros, são manipulados na Sala de Triagem. Em resposta à sua enorme diversidade encontra-se em curso a elaboração dos procedimentos de colheita, transporte e conservação, bem como a correspondente requisição “*online*” (Laboratório de Exteriores).

Responde ao pedido de análises que se inicia com a requisição electrónica, na qual consta a identificação do médico e do Serviço requisitante, os dados demográficos e clínicos do doente, a identificação da amostra e do Laboratório que a executa, além das instruções de colheita relevantes (amostra, conservação e transporte). Esta requisição é impressa e segue para o flebotomista. Este realiza as colheitas e envia-as, acompanhadas pela requisição, para o Laboratório. Na recepção, verifica-se a correspondência entre o(s) produto(s) biológico(s) e o pedido - variáveis pré-analíticas. Se em conformidade e mediante leitura óptica do pedido, são impressas etiquetas com código de barras que identificam as amostras, permitindo a sua rastreabilidade. As amostras etiquetadas são encaminhadas para os respectivos laboratórios onde, com excepção das técnicas manuais, são processadas nos autoanalisadores que, como sistemas integrados, identificam as amostras, realizam as análises solicitadas e disponibilizam os resultados para validação técnica. Após validação biopatológica, sob a responsabilidade dos PC e dos TSS, os resultados analíticos ficam de imediato disponíveis para visualização pelos clínicos.

3. CONTROLO DE QUALIDADE

A Qualidade é inquestionável. O controlo de qualidade é uma garantia do desempenho do qual dependem crianças, grávidas, idosos e demais utentes.

O LB com o propósito de alcançar a Qualidade total:

Cumpre os requisitos presentes no Manual de Boas Práticas Laboratoriais, no Manual de Segurança e Saúde no Trabalho, no Manual para Manuseamento de Produtos Químicos em Meio Hospitalar e na legislação de Gestão de Resíduos Hospitalares, e tem

implementado um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) segundo a NP EN ISO 9001:2008;

Tem definido todos os procedimentos da fase analítica. Diariamente são efectuadas as manutenções, as calibrações e são processados e analisados os dois níveis (normal e patológico) dos Controlos de Qualidade Internos maioritariamente fornecidos pelas respectivas casas comerciais. Caso necessário, são implementadas as acções correctivas;

Envia periodicamente para o HG e Hospital da Universidade de Coimbra (HUC) amostras para processar utilizando os mesmos métodos e equipamentos, com o objectivo de avaliar o seu desempenho analítico (controlo interlaboratorial);

Como Laboratório de Urgência um resultado em tempo útil é importante mas um resultado fiável e exacto é mais. Um resultado constrói-se com o empenho das pessoas na aplicação contínua de processos de melhoria.

Os LB participam nos seguintes Programas de Avaliação Externa da Qualidade:

- *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)*

Química Clínica, Fármacos e Urina Humana, com periodicidade quinzenal e Urinalysis (Sumária de Urina) realizado de 2 em 2 meses;

- *Sociedade Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)*;

Soro e urina com periodicidade mensal;

- *DigitalPT Accutest, Blood Gas / Electrolytes*

Gasimetria, três vezes por ano.

4. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

4.1. O Laboratório de Bioquímica do HP

A Equipa, da qual faz parte, é constituída por 1 Patologista Clínico, 3 Técnicos Superiores de Saúde (TSS), 6 Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDT), 1 Funcionário Administrativo e 1 Auxiliar de Acção Médica.

Aos TSS e TDT, compete a verificação da correspondência entre o pedido solicitado e a amostra recepcionada (identificação do doente, tipo de colheita, sua integridade e qualidade), a separação, análise e conservação de todos os produtos.

Está organizado em várias áreas de trabalho. À entrada, a zona da recepção, onde todos os produtos biológicos confluem e se procede a uma segunda triagem, para

detectar erros da pré-analítica. Daí, as amostras são encaminhadas para as diferentes áreas de trabalho nomeadamente, centrifugação e conservação ou análise (gasimetria, serologia, autoanalísadores, microscopia, sala de urinas, e técnicas manuais).

Possui algumas particularidades inerentes à população que serve:

- A amostra de plasma é a amostra de eleição em Pediatria porque permite o doseamento da maioria dos analitos, obter após centrifugação maior volume de amostra ($\pm 20\%$), menor ocorrência de hemólise, e como é eliminado o tempo de formação de coágulo, permite a centrifugação da amostra de imediato o que aumenta a rapidez de resposta. Neste caso, o aditivo utilizado é a Heparina-Lítio (o anticoagulante específico heparina activa as antitrombinas, bloqueando a cascata de coagulação);
- A amostra de soro, colhida em tubo sem anticoagulante e com gel separador, é utilizada por rotina na MBB, com excepção das Provas de Tolerância a uma dose de glicose oral (PTGO) onde se usa o plasma. Neste caso o aditivo utilizado, é o Fluoreto de sódio/Oxalato de potássio por ser inibidor da glicólise;
- A colheita de sangue é realizada em tubos específicos pediátricos (1 a 2 mL), pelo que o volume de amostra é, na sua globalidade, muito reduzido; em frequentes situações, inferior à quantidade ideal. Por vezes, os laboratórios vêm-se obrigados a partilhar o tubo de colheita;
- A amostra de urina é muito valorizada pelo facto de ser uma colheita não invasiva. A maioria dos doseamentos urinários é realizada numa amostra aleatória;
- Evita-se, sempre que possível, a devolução da amostra e a solicitação de uma nova colheita.

Segue as recomendações do fornecedor de tubos de colheita (20) relativas à colheita, transporte, centrifugação e conservação dos mesmos.

À chegada ao laboratório os tubos de sangue são de imediato centrifugados até duas horas após a colheita. No caso dos tubos de soro só depois da formação do coágulo (no mínimo, 30min após a colheita). A força relativa de centrifugação (RCF) é de 2000-3000g durante 15 min para o plasma, e de 1800g durante 10 min no caso do soro. As amostras são processadas de imediato e armazenadas, ao longo do dia de trabalho, a 4°C, durante 5 dias.

4.2. Análises realizadas

A Química Clínica é um Mundo de Análises em constante evolução.

O LB não foge a esta realidade. Executa um vasto número de parâmetros analíticos em tempo útil para dar resposta aos pedidos solicitados. De entre todas as análises realizadas e apresentadas no **Anexo II**, referirei apenas algumas, escolhidas pelas suas características e especificidade.

O LB tem vários equipamentos instalados, que descreverei ao longo do relatório consoante a sua aplicação.

4.3. Principal equipamento existente no LB

Vitros[®]5, IFS e *Vitros[®]350* - Autoanalisadores de Química Seca.

No LB o *Vitros[®]350* serve de redundância e *Backup* para o *Vitros[®]5, IFS*.

O Sistema Vitros (16), denominado comumente como “Química Seca”, utiliza as tecnologias MicroSlide, MicroTip, Intelicheck[®] MicroSensor e MicroWell (**Anexo III**).

As vantagens da tecnologia Vitros[®] são:

- Rapidez de processamento (2 a 7 minutos em média) e a elevada precisão do método (CV entre 1 e 2 %);
- Utilização de um volume de amostra muito reduzido (cerca de 10 µL);
- Detecção de amostra insuficiente, coágulos e bolhas o que oferece maior confiança e evita o gasto não produtivo da amostra;
- Redução da interferência da hemólise, turbidez e icterícia, nos processos analíticos, o que se traduz na redução da necessidade de repetições e de pedido de novas colheitas;
- Utilização de pontas descartáveis (das pipetas) e de reagentes em slide, o que elimina o risco de contaminação cruzada;
- Execução de diluições automáticas, ou sob pedido, de urina e plasma;
- Os reagentes encontram-se aptos a usar e possuem grande estabilidade;
- O equipamento não requer água desionizada, tubos ou esgotos. Os resíduos químicos e biológicos são mínimos;
- O equipamento requer uma manutenção simples.

4.4. Analitos

4.4.1. Hidratos de Carbono (HC) e seus metabolitos:

a) Glicose

A **Glicose** é a principal fonte de energia celular. A concentração de glicose no plasma é regulada pela acção conjunta de duas hormonas segregadas pelos ilhéus de Langerhans do pâncreas: a insulina (pelas células β) e o glucagon (pelas células α). A determinação da glicémia é usada no diagnóstico e monitorização da diabetes, da diabetes gestacional (PTGO), de erros inatos do metabolismo (EIM), e ainda em casos de desidratação, coma, insulinoma, hipoglicémia, acidose e cetoacidose.

Recentemente, a Direcção-Geral de Saúde publicou as Normas a aplicar no diagnóstico da Diabetes *Mellitus* e da Diabetes Gestacional (15).

Amostra: Sangue (plasma ou soro), Urina, LCR e outros Líquidos Biológicos.

Colheita: Processar de imediato ou utilizar os tubos com fluoreto de sódio (a glicólise diminui o valor da glicose sérica em 5% a 7%, no espaço de 1 hora à temperatura ambiente).

b) Lactato

O **Lactato** é o produto final do metabolismo anaeróbio da glicose. A concentração de lactato no sangue depende do ritmo de produção, nas células musculares e nos eritrócitos, e da taxa de metabolização, no fígado e no rim. A acidose láctica resulta normalmente de uma sobreprodução ou de uma subutilização do lactato. Níveis elevados de lactato podem ocorrer como resultado de uma hipóxia nos tecidos, na diabetes *Mellitus*, nas malignidades, na doença metabólica (de armazenamento de glicogénio); na ingestão de etanol, metanol ou de salicilato, e na acidose metabólica.

A determinação do Lactato no LCR é um dado analítico fiável, específico e sensível no diagnóstico precoce da meningite bacteriana.

Amostra: Plasma de Heparina-Lítio e LCR.

Colheita: Repouso, jejum, não utilizar garrote. Transportar refrigerado e separar imediatamente.

c) Outras determinações realizadas:

PTGO, Hemoglobina glicada, Piruvato, xilose e galactose.

4.4.2. Proteínas

a) Proteína C Reactiva (PCR)

A **proteína C reactiva** (PCR) é sintetizada pelo fígado e pertence ao grupo das proteínas de fase aguda. Todas partilham a propriedade de, na resposta de fase aguda, exibirem concentrações plasmáticas elevadas.

O doseamento da PCR é útil na detecção e avaliação de processos inflamatórios, sobretudo na resposta a infecções, lesão tecidual, neoplasias e em doenças auto-imunes, além de servir para monitorizar a resposta à terapêutica farmacológica instituída.

Amostra: Plasma de Heparina-Lítio, Soro.

b) Outras determinações realizadas:

Albumina, Proteínas Totais (séricas, urinárias, no LCR e noutros Líquidos Biológicos).

4.4.3. Enzimas

a) Creatina Cinase (CK)

A **Creatina Cinase** (CK), também conhecida como creatina fosfocinase, é uma enzima celular amplamente distribuída nos tecidos, encontrando-se principalmente nos músculos esquelético e cardíaco.

Fisiologicamente, quando o músculo contrai, o ATP é desfosforilado em ADP. A CK catalisa a refosforilação do ADP em ATP, estando portanto associada à produção de ATP nos sistemas contrácteis e de transporte.

A CK é uma enzima dimérica composta por duas subunidades (B e M). Como a forma activa da enzima é um dímero, existem três pares diferentes de subunidades: BB, MB e MM, cuja distribuição nos tecidos, por não ser uniforme, é utilizada como marcador da lesão. A actividade da isoenzima CK-MM é maior no músculo-esquelético (não específica), a da CK-MB é superior no coração e a da CK-BB apenas se encontra presente no cérebro.

A CK sérica aumenta, quase sempre, após um enfarte agudo do miocárdio ou de lesão do músculo-esquelético. A enzima apresenta-se habitualmente elevada em casos de miocardite de causa desconhecida, rabdomiólise, esforço físico agudo e nos casos de distrofia muscular. Um nível de CK baixo pode reflectir uma redução ou perda da massa muscular. Os valores de referência para a CK deverão ter em consideração a idade, o sexo e a actividade física do indivíduo.

b) Isoenzima MB da creatina cinase (CK-MB)

A **Isoenzima MB da creatina cinase (CK-MB)** encontra-se principalmente no músculo cardíaco; existem, no entanto, pequenas quantidades desta isoenzima no músculo-esquelético. A actividade sérica da CK-MB encontra-se aumentada em casos de enfarte agudo do miocárdio. Nestes casos o seu doseamento é útil porque, normalmente, esta isoenzima atinge um valor de pico 12 a 24 horas após um enfarte do miocárdio e volta aos valores normais no espaço de 48 a 72 horas. A CK-MB também está aumentada em casos de miocardite, rabdomiólise e noutras patologias do miocárdio e miopáticas.

c) Colinesterase (CHE)

Existem dois tipos de colinesterase: a **Acetilcolinesterase (E.C.3.1.1.7)**, que está presente nos glóbulos vermelhos e nos tecidos nervosos e a **Acetilcolina acil-hidrolase (CHE) (E.C.3.1.1.8)**, que está presente no plasma, fígado, coração e outros tecidos.

O doseamento da actividade da CHE no soro é útil para diagnosticar:

Envenenamento por pesticidas: os pesticidas organofosfatos e carbonatos inibem as duas colinesterases;

Doenças hepáticas: Sabe-se que a cirrose, a hepatite e o carcinoma com metástases hepáticas reduzem a actividade da colinesterase. Como os níveis séricos da actividade da CHE são normalmente elevados, qualquer diminuição na sua actividade reflecte a redução da capacidade de síntese do fígado, sendo portanto um indicador sensível da função hepática;

Sensibilidade à administração de succinilcolina: A succinilcolina é um relaxante muscular administrado durante intervenções cirúrgicas que é hidrolisado pela colinesterase sérica. Os indivíduos que apresentam actividade enzimática diminuída ou aqueles que apresentam uma variante fracamente activa, podem não conseguir metabolizar rapidamente o fármaco e cursar para um estado de apneia, que obriga a ventilação mecânica até que os efeitos do fármaco desapareçam.

As actividades de CHE baixas podem ser um factor crónico ou transitório por exposição a pesticidas, doenças hepáticas, gravidez ou uso de contraceptivos orais.

d) Outras determinações realizadas:

Alanina Aminotransferase (ALT), Amilase, Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (ALP), Gama-Glutamil transferase GGT), Lactato Desidrogenase

(LDH), e Lipase. No HG, por técnica semi automática, doseia-se a 5'-Nucleotidase, a Adenosina Desaminase (ADA) e a Enzima Conversora da Angiotensina (ECA).

4.4.4. Compostos Nitrogenados não Proteicos

a) Amónia

A **Amónia** é um produto residual do catabolismo proteico; é potencialmente tóxica para o sistema nervoso central. O aumento dos níveis plasmáticos de amónia pode ser indicativo de encefalopatia hepática, coma hepático nos estados terminais de cirrose hepática, insuficiência hepática, necrose hepática aguda e subaguda, e doença metabólica.

Amostra: Plasma de Heparina-Lítio ou de EDTA.

Colheita: Manter em gelo até ao momento da análise. Transportar refrigerado, separar e processar de imediato.

b) Outras determinações realizadas:

Ácido Úrico, Creatinina e Ureia.

4.4.5. Lípidos e Lipoproteínas

As **Lipoproteínas** plasmáticas são partículas esféricas que contêm quantidades variadas de colesterol, triglicerídeos, fosfolípidos e proteínas. Os fosfolípidos, o colesterol livre e as proteínas constituem a superfície exterior da partícula de lipoproteína, enquanto o núcleo interior contém sobretudo colesterol esterificado e triglicerídeos. Estas partículas têm por objectivo a solubilização e transporte do colesterol e dos triglicerídeos na corrente sanguínea.

As proporções relativas de proteínas e lípidos determinam a densidade destas lipoproteínas e servem como base para a sua classificação em quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os efeitos das diferentes classes de lipoproteínas são distintos e variados no risco das doenças coronárias. Enquanto o colesterol HDL tem um efeito cardioprotector, os níveis de colesterol LDL estão directamente relacionados com desenvolvimento de doença coronária, devido às suas propriedades aterogénicas (formação de placas de ateroma).

a) Colesterol LDL

As **LDL** transportam colesterol aos tecidos periféricos para a biossíntese da membrana celular, ao fígado e a outros tecidos para a síntese de hormonas esteróides, bem como aos hepatócitos para a síntese dos ácidos biliares.

Amostra: Soro, Plasma de Heparina-Lítio.

b) Outras determinações realizadas:

Colesterol HDL, Colesterol Total e Triglicerídeos.

4.4.6. Electrólitos e Gases no Sangue

Pelo facto de estarem interrelacionados fisiológica e clinicamente, os electrólitos, a osmolalidade, o estado ácido-base e a oxigenação sanguínea são abordados aqui.

a) Teste de Suor - Cloreto (Cl)

A Fibrose Quística é uma doença autossómica recessiva da proteína reguladora da condutância transmembranar (CFTR), uma proteína que regula normalmente o transporte de electrólitos através das membranas epiteliais. Afecta as glândulas exócrinas de todo o corpo, incluindo as glândulas sudoríparas, pequenos ductos exócrinos no pâncreas e glândulas brônquicas. Conduz a obstrução glandular ou excesso de secreção de determinadas substâncias, incluindo secreções mucosas espessas nos pulmões que levam a doença pulmonar crónica, e bloqueio da libertação da enzima pancreática que leva a má absorção. Afecta aproximadamente 1:2000 lactentes caucasianos (4).

Embora a análise genética esteja disponível, o teste quantitativo de cloreto no suor (Teste de Suor) continua a ser o teste de diagnóstico de rastreio.

Princípio do Método: O teste de suor compreende 3 fases:

- Fase 1 - Estimulação da sudorese através de iontoforese por pilocarpina,
- Fase 2 - Recolha de suor,
- Fase 3 - Análise quantitativa do cloreto de sódio, por medição da condutividade do suor.

O doente deve estar completamente hidratado, fisiológica e nutricionalmente estável e livre de doença aguda. A pele deve apresentar-se íntegra (sem cortes ou eczemas).

O LB possui o sistema *Wescor Macroduct Sweat Check* que utiliza um gel com pilocarpina. A corrente eléctrica utilizada serve para forçar este fármaco a penetrar na pele e induzir a sudação localizada. Os eléctrodos e a fonte de corrente são integrados. Após estimulação, o suor é recolhido num colector em espiral onde se encontra um tubo capilar descartável. Depois da colheita, o suor é transferido para o analisador *Sweat Chek* que contém uma célula de condutividade. Permite medições precisas com um volume de amostra de 6µl a 10 µl.

A correspondência entre a condutividade do NaCl medida e a concentração de cloreto no suor é apresentada na **Tabela I**.

Condutividade (Com Sweat Chek)		
Normal	Limite	Patológico
0 – 60 mmol/L	60 – 80 mmol/L	> 80 mmol/L
Cloreto:		
Normal	Limite	Patológico
0 – 40 mmol/L	40 – 60 mmol/L	> 60 mmol/L

Tabela I: Leituras em *Sweat-Check* classificadas e comparadas com a análise de cloretos.

b) Osmolalidade

A determinação da **Osmolalidade** do plasma e da urina é utilizada para avaliar alterações do equilíbrio ácido-base e na concentração dos electrólitos. A comparação entre a osmolalidade plasmática e urinária é importante na avaliação da regulação da água pelos rins, na detecção de alterações graves na concentração dos electrólitos, no diagnóstico da Diabetes *Insipidus* e da Síndrome de Secreção Inapropriada da Hormona Antidiurética (SIADH).

O Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , são os electrólitos que mais contribuem para a osmolalidade sérica, porque estão presentes em concentrações relativamente elevadas. A glicose e a ureia, não electrólitos, contribuem menos por se encontrarem em menor quantidade.

Princípio do Método: O equipamento utilizado no LB para medir a osmolalidade é o VAPRO[®] 5520, osmómetro de pressão de vapor.

A diminuição da pressão de vapor e o aumento do ponto de congelação são propriedades coligativas de uma solução. Estas dependem da concentração de partículas de soluto dissolvidas na solução. Comparando com o solvente puro, a alteração destas propriedades é proporcional ao número de partículas de soluto dissolvidas por kg de solvente (água no caso de soluções biológicas). Portanto, a medição destas propriedades é um meio indirecto de determinar a osmolalidade da solução.

Amostra: soro, urina e leite.

c) Gasimetria

Os LB estão equipados com o GEM[®] Premier 3000, (9) analisador de Gases no Sangue, que fornece resultados e cálculos para gasimetria, hematócrito e electrólitos.

Este equipamento é considerado de urgência (*near patient*), porque permite uma primeira e rápida avaliação do estado geral do doente, através da análise de amostras de sangue total.

A determinação:

- Do pH, da $p\text{CO}_2$ e da $p\text{O}_2$ é útil no diagnóstico e monitorização dos desequilíbrios ácido-base, sejam respiratórios ou metabólicos,
- Da SO_2 é útil na avaliação da função pulmonar e dos estados de cianose,
- Do Hematócrito (Hct) indica a capacidade do organismo no transporte de CO_2 e de O_2 ,
- Da Hemoglobina (Hb) traduz os estados de hipóxia em situações de anemia aguda e crónica.

Na **Tabela 2** são apresentados os analitos medidos e calculados (parâmetros derivados) que constam no resultado.

Analito medido	Significado	Intervalo notificável
pH	Avaliação do estado ácido-base do sangue	6.80 a 7.80
$p\text{CO}_2$	Pressão parcial de Dióxido de Carbono	5 a 115 mmHg
$p\text{O}_2$	Pressão parcial de Oxigénio	0 a 760 mmHg
Na^+	Principal catião do fluido extracelular	100 a 200 mmol/l
K^+	Principal catião intracelular	0.1 a 20.0 mmol/l
Ca^{2+}	Cálcio livre	0.10 a 5.00 mmol/l
Hct	Hematócrito (% ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue e serve para os quantificar)	15 a 65%
Parâmetros derivados		
Ca^{2+} (7.4)	Correcção realizada para pH= 7.4 (o aumento do valor de pH leva a um aumento do Ca^{2+} ligado a proteína e à redução do Ca^{2+} livre)	0.10 a 5.00 mmol/l
HCO_3^-	É o segundo (depois do Cl^-) anião plasmático, forma com o H_2CO_3^- o sistema tampão fisiológico mais importante. É calculado a partir da medição do CO_2 .	3.0 a 60.0 mmol/l
HCO_3^- padrão		
TCO_2	Concentração total de CO_2 (livre e ligado)	3.0 a 60.0 mmol/l

BEecf	Excesso de base <i>in vitro</i> . Reflecte o componente metabólico, não respiratório, das alterações de pH.	-30.0 a +30.0 mmol/l
BE(B)		
SO ₂ c	Saturação de oxigénio (razão entre o volume de oxigénio transportado e o volume máximo que podia ser transportado). É útil para prever a quantidade de O ₂ disponível para perfusão nos tecidos	0 a 100 %
THbc	Hemoglobina Total (a concentração total de O ₂ presente na amostra de sangue é a soma das concentrações de O ₂ ligado à Hb e do O ₂ dissolvido)	2.0 a 22.0 g/dl

Tabela 2: Analitos medidos e calculados (parâmetros derivados) que constam no resultado.

Princípio do Método: As metodologias aplicadas nas medições são a Amperometria (pO₂, Glicose), a Potenciometria - Eléctrodos de Iões Selectivos (EIS) - (pH, pCO₂, Na⁺, K⁺, Ca²⁺) e a Condutivimetria (Hct).

O equipamento é completamente automático e possui um cartucho descartável onde tudo ocorre. O componente central do cartucho é um “cartão sensor” que tem uma câmara onde a amostra, depois de aspirada, é posta em contacto com os sensores electroquímicos de pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Hct. Na câmara também está presente o eléctrodo de referência (solução de nitrato de prata) e é a responsável, após instalação do cartucho, pela activação do controlo de temperatura interno que mantém a amostra à temperatura de 37±0,3°C.

Amostra: Colheita de sangue arterial ou venoso em seringa heparinizada e em condições de anaerobiose. A amostra deve ser bem homogeneizada (para prevenir a formação de coágulos) e não deve apresentar bolhas de ar. Por vezes, são processadas amostras de urina para determinação do bicarbonato.

4.4.7. Iões Inorgânicos

O osso contém quase todo o Cálcio (99%) do organismo, a maior parte do ião fosfato (85%) e uma concentração elevada de Magnésio (55%). As concentrações séricas destes iões dependem do balanço entre a deposição e reabsorção minerais ósseas, da

absorção intestinal e da excreção renal, processos regulados principalmente pelas hormonas PTH e 1,25-diidrovitamina D.

a) **Cálcio**

O **Cálcio** é o principal componente mineral do osso. O restante, presente no sangue, encontra-se 50% no seu estado livre (ionizado), 40% ligado a proteínas plasmáticas (principalmente a albumina) e 10% complexado, sendo a fracção livre a forma biologicamente activa.

O Cálcio tem um papel fundamental em várias funções fisiológicas incluindo a contracção muscular, a secreção hormonal, a mineralização óssea e a coagulação sanguínea. A hipocalcémia pode resultar do hipoparatiroidismo, hipoalbuminémia, insuficiência renal, défice de vitamina D e pancreatite aguda, e apresenta-se geralmente com sinais e sintomas de hiperexcitabilidade neuromuscular como tetania e convulsões. A hipercalcémia pode resultar do hiperparatiroidismo, hipervitaminose D e neoplasias.

Princípio do Método: Colorimétrico.

A quantificação do cálcio total é realizada por espectrofotometria. O corante Arsenazo III reage o cálcio, numa solução moderadamente ácida, para formar um complexo azul-lilás. A densidade do reflexo do complexo é medida a 680 nm e é proporcional à concentração de cálcio na amostra.

Amostra: Soro, Plasma de Heparina-Lítio e urina.

b) **Outras determinações realizadas:**

Fósforo, Magnésio.

4.4.8. **Hormonas**

a) **Procalcitonina (PCT)**

A **Procalcitonina** (PCT) é a pro-hormona da calcitonina. Enquanto a calcitonina é apenas secretada pelas células parafoliculares da tiróide, a PCT pode ser produzida por vários tipos de células e órgãos após estímulo pro-inflamatório, principalmente de natureza bacteriana.

A concentração plasmática da PCT em indivíduos saudáveis é inferior a 0,05 ng/ml, mas pode aumentar até 1000 ng/ml em doentes com sépsis severa ou choque séptico (5). Níveis elevados de PCT são indicativos de infecção bacteriana acompanhada de reacção inflamatória sistémica, uma vez que infecções localizadas geralmente, não provocam aumento na PCT circulante. O aumento da PCT acompanha e reflecte o

progresso contínuo da infecção, existindo proporcionalidade entre o seu valor e a gravidade da infecção bacteriana sistémica, o que faz com que o seu doseamento seja muito importante nos doentes com sépsis, onde é crucial o diagnóstico e terapêutica precoce, de modo a melhorar o seu prognóstico.

A determinação da PCT apresenta as seguintes vantagens:

- Aumentar rapidamente (3 a 6 horas) na resposta a infecções bacterianas sistémicas e sépsis;
- Ser muito específica (capacidade de diferenciação entre doentes com sépsis e doentes com reacções inflamatórias sistémicas não infecciosas). Os níveis de PCT são geralmente baixos em infecções virais, doenças inflamatórias crónicas e em processos autoimunes;
- Reflectir com exactidão a progressão da doença. Utiliza-se para monitorizar a evolução e avaliar a eficácia da terapêutica. Valores muito elevados de PCT são indicadores de mau prognóstico;
- Reduzir a administração de antibióticos.

Princípio do Método: A determinação realiza-se no HG, no Mini VIDAS® pela Técnica ELFA - Enzyme-linked Fluorescent Assay.

Amostra: Sangue (Soro ou Plasma).

4.4.9. Bilirrubinas

A **Bilirrubina Total** no soro e plasma consiste na soma das fracções da **Bilirrubina Não Conjugada ou Indirecta (Bu)**, da **Bilirrubina Conjugada** com o ácido glucorónico (mono e diglucoronidos) ou **Directa (Bc)**, e da **Bilirrubina Delta (BDEL)**, uma fracção da bilirrubina ligada à albumina.

Quimicamente a bilirrubina é um pigmento tetrapirrólico (amarelo-alaranjado) que é insolúvel em solventes polares (água). A molécula apresenta tanto isómeros *trans* quanto *cis*. Na presença de luz, a bilirrubina na configuração *trans* é convertida na configuração *cis* que é mais hidrossolúvel (razão da aplicação de fototerapia aos neonatos que apresentam icterícia significativa causada pela Bu).

Aproximadamente 85% da totalidade da bilirrubina produzida deriva do grupo heme da hemoglobina libertada pelos eritrócitos senescentes, destruídos nas células reticuloendoteliais do fígado, do baço e da medula óssea. Os 15% restantes têm origem no catabolismo de outras proteínas que contêm heme, tais como mioglobina, citocromos e peroxidases.

Uma vez produzida, a bilirrubina (insolúvel) liga-se à albumina e é transportada para o fígado (Bu). No interior dos hepatócitos a bilirrubina, já dissociada da albumina, é rapidamente conjugada com o ácido glucorónico para produzir mono e diglucoronidos de bilirrubina (Bc) que são excretados, através do sistema biliar, para o intestino onde são metabolizados principalmente pelas bactérias comensais. Os três produtos finais, designados colectivamente por urobilinogénios, são quase completamente excretados nas fezes, aparecendo na urina uma pequena parte que escapou pela circulação enteroportal.

A bilirrubina total no soro encontra-se invariavelmente elevada em casos de icterícia. As causas da icterícia são pré-hepáticas (decorrentes de várias doenças hemolíticas), hepáticas (decorrentes de lesão ou obstrução hepatocelular) e pós-hepáticas (decorrentes de obstrução no sistema biliar).

A icterícia neonatal é classificada em hiperbilirrubinémia não conjugada e hiperbilirrubinémia conjugada. A hiperbilirrubinémia não conjugada representa um risco para o desenvolvimento de *kernicterus* (síndrome neurológica resultante da deposição da Bu no gânglio basal dos núcleos do tronco cerebral), especialmente em lactentes prematuros e de baixo peso à nascença. As causas são a icterícia fisiológica do recém-nascido e a doença hemolítica que resulta da incompatibilidade sanguínea materno fetal. A icterícia fisiológica do recém-nascido ocorre poucos dias depois do nascimento (3 a 5 dias) e deve-se ao défice na conjugação da bilirrubina (falta relativa da enzima conjugadora nos primeiros dias de vida) e a um aumento da bilirrubina libertada pelos eritrócitos (têm um tempo de vida menor). O tratamento é a fototerapia. A hiperbilirrubinémia conjugada é causada por hepatite neonatal idiopática ou por atresia biliar.

a) Bilirrubina conjugada (Bc) e da Bilirrubina não conjugada (Bu)

Princípio do Método: Colorimétrico de ponto final (duplo comprimento de onda).

A amostra é aplicada e com o auxílio da cafeína e do benzoato de sódio na camada de difusão, ocorre a dissociação da Bu da albumina que migra com a Bc para a camada de reagente. As proteínas (hemoglobina e BDEL ligada à albumina) e os lípidos são retidos na camada de difusão. Na camada de reagente, a Bu e a Bc ligam-se a um mordente catiónico que permite, pelo facto de apresentarem espectros idênticos, a quantificação dos mono e diglucoronidos de bilirrubina em conjunto como Bc. A um comprimento de onda de 400 a 420 nm, a Bu e a Bc têm absorvâncias semelhantes, mas a 460 nm a Bu

tem uma absorvância superior à da Bc. É devido a estas características espectrais únicas que as densidades do reflexo, a 400 e 460 nm, são usadas para determinar as concentrações da Bu e da Bc.

Amostra: Soro, Plasma de Heparina-Lítio.

Colheita: Proteger da luz.

4.4.10. Fármacos

Existe uma estreita relação entre a farmacodinâmica e a farmacocinética. A primeira está relacionada com a concentração do fármaco no local de acção para se observar a magnitude do efeito, a segunda está relacionada com a concentração do fármaco no sangue e define o regime terapêutico (dose e intervalo de administração).

A utilidade da monitorização da concentração do fármaco baseia-se, no princípio de que há correlação entre a resposta farmacológica e a concentração do fármaco no local de acção, e na observação de forte correlação entre o efeito farmacológico observado e a concentração sérica do fármaco. O intervalo terapêutico representa a relação entre a Concentração Mínima Eficaz (CME) e a Concentração Máxima Tolerada (CMT). Num ciclo de dosagem óptimo, a concentração sanguínea no vale (concentração mínima atingida antes da próxima dose) não deve ser inferior à CME, e no pico não deve exceder a CMT (risco de toxicidade).

Os efeitos farmacológicos estão directamente relacionados com a biodisponibilidade do fármaco. Um dos factores que tem grande influência na distribuição do fármaco é a sua ligação às proteínas plasmáticas. Este factor é determinante para o equilíbrio existente entre a forma ligada e a sua forma livre, acreditando-se que apenas a sua fracção livre está disponível para distribuição e eliminação. São muitos os factores que influenciam a distribuição do fármaco no organismo. Entre eles estão a idade, o peso, o sexo e o estado fisiopatológico do doente, a terapêutica associada, a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção do fármaco.

A monitorização dos fármacos tem muitas vantagens incluindo o ajuste na dose em casos de mudança fisiológica contínua, na individualização posológica, na correlação entre a concentração do fármaco e os efeitos farmacológicos, no diagnóstico de uma possível sobredosagem ou da não-adesão à terapêutica.

Os fármacos monitorizados por rotina no LB são agrupados pela sua utilização terapêutica.

a) Antiepilépticos

Pertencem a este grupo a Carbamazepina, o Fenobarbital, a Fenitoína e o Ácido Valpróico, todos anti-convulsivantes.

A **Carbamazepina** tem sido também utilizada no tratamento de doentes bipolares, como alternativa à terapêutica com lítio.

O **Fenobarbital** é usado no tratamento de quase todos os tipos de convulsões, mesmo nas de origem febril. Reduz a transmissão sináptica, o que leva a uma diminuição da excitabilidade de toda a célula nervosa e à indução de sedação. Como tem um tempo de semi-vida longo (demora a ser eliminado) as suas concentrações séricas são estáveis e representativas, se colhidas no vale.

A **Fenitoína** também é usada no tratamento do *status epilepticus*. Actua nos canais sinápticos de sódio prolongando a sua inactivação, reduzindo assim a resposta do neurónio. O efeito fisiológico traduz-se na redução da transmissão sináptica e no controlo da excitabilidade neuronal anormal. Liga-se fortemente às proteínas (90% a 95%), pelo que é indispensável realizar a quantificação das proteínas plasmáticas durante a sua monitorização.

O **Ácido Valpróico** é usado para o tratamento de convulsões do tipo ausência. Tal como a fenitoína tem uma elevada taxa de ligação a proteína (93%) e age, de forma idêntica, nos canais sinápticos de sódio. Actua também como inibidor da enzima GABA-transaminase, provocando o aumento da concentração de GABA (neurotransmissor inibitório) no SNC. Em concentrações elevadas pode levar a depressão do SNC, tremor e trombocitopenia e, em concentrações muito elevadas, o doente corre o risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade fatal, letargia, coma ou edema cerebral.

b) Lítio, Acetaminofeno, Teofilina e Digoxina

Lítio- É usado no tratamento da doença bipolar (maníaco-depressiva).

Acetaminofeno- Fármaco frequentemente utilizado com propriedades analgésicas e antipiréticas. A sua quantificação é útil no diagnóstico e tratamento da sobredosagem aguda, que pode provocar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade graves.

Teofilina- Um broncodilatador utilizado no tratamento da asma. Os efeitos tóxicos incluem náuseas, vômitos, diarreia, dor de cabeça, taquicardia, arritmia e convulsões.

Digoxina- Fármaco prescrito para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e arritmias supraventriculares.

c) Antibióticos

Amicacina- Pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, fármacos usados para tratamento de infecções por estirpes de bactérias Gram (-).

Gentamicina- É utilizada no tratamento de infecções graves por estirpes susceptíveis de bactérias Gram (-) e algumas Gram (+). Tem uma curta janela terapêutica.

Vancomicina- É utilizada no tratamento de infecções graves causadas por microrganismos Gram (+) resistentes às penicilinas, cefalosporinas ou outros agentes antimicrobianos.

NOTA: A monitorização das concentrações séricas destes fármacos constitui o meio mais eficaz de garantir a terapêutica adequada e evitar o risco de ototoxicidade e nefrotoxicidade, no caso de exposição a doses elevadas e por um longo período de tempo.

d) Antineoplásico

Metotrexato- É um antimetabólito usado no tratamento de doenças neoplásicas e que actua por interrupção do ciclo celular; inibe a síntese de ADN diminuindo a disponibilidade de nucleotídeos pirimidínicos. O Metotrexato é útil no tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças, em alguns carcinomas, na manutenção da remissão da leucemia e ainda no tratamento da artrite reumatóide e da psoríase grave.

O Metotrexato é uma citotoxina inespecífica, e ao serem mantidas as concentrações sanguíneas apropriadas para destruir as células tumorais, podem surgir efeitos tóxicos indesejáveis. Deste modo, as concentrações sanguíneas de Metotrexato deverão ser monitorizadas às 24, 48 ou 72 horas após administração de doses muito elevadas.

e) Imunossupressores

Os imunossupressores são fármacos capazes de suprimir a resposta imunológica. São usados para tratar doenças autoimunes, alergias e no transplante de órgãos.

Ciclosporina- É um peptídeo cíclico de origem fúngica, composto por 11 aminoácidos. Tem capacidade para suprimir, de forma efectiva, a rejeição aguda em receptores de órgãos de outros indivíduos. É usada em transplantes renal, cardíaco, hepático, pancreático e de medula óssea. A Ciclosporina actua por inibição da síntese de certas citocinas (em particular da interleucina – 2) que controla a proliferação dos linfócitos T. A activação e proliferação dos linfócitos T são consideradas a base da resposta imune celular que, por consequência, conduz à rejeição dos tecidos transplantados na ausência de uma imunossupressão eficaz.

Os níveis tóxicos de Ciclosporina são responsáveis por vários efeitos secundários entre os quais se incluem nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.

Tacrolimus- O Tacrolimus (FK 506) é um imunossupressor macrólido produzido por um actinomiceto. O mecanismo de acção do Tacrolimus é idêntico ao descrito para a Ciclosporina; o complexo entre Tacrolimus e o FKBP12 nos linfócitos suspende a síntese de citocinas. *In vitro* é 50 a 100 vezes mais potente como inibidor da activação dos linfócitos do que a Ciclosporina. (8)

O Tacrolimus tem um intervalo estreito de terapêutica segura e eficaz podendo uma subdosagem resultar na rejeição do transplante. Os níveis tóxicos de Tacrolimus estão associados a efeitos secundários graves (nefrotoxicidade, neurotoxicidade, diabetes pós transplante e distúrbios gastrointestinais).

Princípio do Método: Nos pedidos de monitorização terapêutica, para permitir a adequada interpretação dos resultados, algumas informações específicas devem ser obtidas no momento da colheita, nomeadamente o horário e a dosagem da última toma bem como a via de administração do fármaco. Estas informações relativas à fase pré-analítica são cruciais para o LB pois racionalizam e optimizam os doseamentos, evitando-se repetições confirmatórias e pedidos de novas colheitas. O LB elaborou o Manual de Colheitas apresentado no **Anexo IV**.

Nos doseamentos destes fármacos, o sistema Vitros[®] utiliza as Técnicas de Microslide e de Microtip.

O sistema *Dimension RXL*[®] (18) aplica duas Técnicas:

- Técnica Semi-automática (em canal aberto) no doseamento da Amicacina e do Metotrexato (amostra: soro ou plasma). O ensaio, um imunoensaio enzimático competitivo, baseia-se na competição, para os locais de ligação dos Anticorpos, entre o fármaco presente na amostra e o fármaco marcado com a enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A diminuição da actividade enzimática, medida espectrofotometricamente, é proporcional à concentração do fármaco presente na amostra.
- Técnica Automática no doseamento da Ciclosporina e do Tacrolimus (amostra: sangue total em EDTA) utiliza um método de imunoensaio na qual conjugados de anticorpo-enzima, livres e ligados ao fármaco, são separados utilizando partículas magnéticas.

4.4.11. Tóxicos

a) Etanol (ALC)

O **Etanol** é uma substância química frequentemente doseada pelo seu uso abusivo. Os efeitos do etanol no SNC variam, dependendo da sua concentração sérica, desde estados de euforia, perda de controlo muscular voluntário (movimentos irregulares) até coma e morte. A medição do etanol é utilizada no diagnóstico e tratamento de intoxicação. O consumo crónico de etanol está associado a doenças hepáticas, hipertensão arterial e doenças cardíacas.

Amostra: Soro, Plasma de Heparina-Lítio.

Colheita: Manter a amostra fechada até utilização (para evitar a evaporação).

4.4.12. Biomarcadores Cardíacos

As duas doenças cardiovasculares mais comuns são o Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) e a Insuficiência Cardíaca (IC). Os marcadores cardíacos são usados para detectar alterações cardíacas e sua monitorização, na resposta à terapêutica instituída ou no risco do seu aparecimento. Um bom marcador deve ser libertado rapidamente do coração para a circulação e aí persistir por vários dias, ser sensível e específico e a sua concentração sérica ser proporcional à extensão da lesão.

No HG realizam-se as determinações no Sistema Vitros de **Mioglobina, Troponina, Fracção N Terminal do Pro-Péptido Natriurético Cerebral** usando a Técnica de Microwell (Imunodiagnóstico) e de **Proteína C Reactiva de Alta Sensibilidade** pela Técnica de MicroTip.

a) Mioglobina

A **Mioglobina** é uma proteína que liga o oxigénio presente no citoplasma das células dos músculos cardíaco e esquelético, pelo que é um marcador pouco específico. Aparece na circulação imediatamente após a lesão muscular. Valores séricos elevados ocorrem após trauma nos músculos esquelético e cardíaco como nos casos de esmagamento e EAM.

É um marcador precoce e muito sensível da necrose do miocárdio sendo libertada na corrente sanguínea com um padrão temporal. Possui o valor preditivo mais elevado de todos os marcadores cardíacos nos pontos temporais iniciais (níveis detectáveis de mioglobina logo na 1ª hora seguinte ao início dos sintomas e níveis máximos no espaço de 4 a 5 horas), mas este valor cai rapidamente ao fim de, aproximadamente 6 horas, o

que se deve à rápida depuração da mioglobina do sangue após a necrose do miocárdio. É frequentemente utilizada como marcador negativo para o enfarte agudo do miocárdio (EAM).

b) Troponina

Três subunidades de troponinas (troponina C- que liga o Ca^{2+} ; troponina I- inibidor e troponina T- que liga a tropomiosina) formam um complexo que regula a interação de actina e miosina e conseqüentemente regula a contracção do músculo cardíaco (miocárdio). As subunidades I e T da **Troponina cardíaca** (cTn) são distintas das troponinas encontradas nos outros músculos. É um marcador específico e sensível. Estudos clínicos demonstraram que a cTnI é detectável na corrente sanguínea 4 a 6 horas após um EAM e permanece elevada nos dias seguintes.

c) Fração N Terminal do Pro-Péptido Natriurético Cerebral (NT-proBNP)

O Péptido Natriurético Cerebral (BNP) é uma hormona libertada principalmente nos ventrículos cardíacos em resposta à distensão cardíaca (mudanças no volume sanguíneo). As principais formas circulantes são a **fracção N-Terminal do proBNP** (NT-proBNP), proBNP e BNP (a hormona fisiologicamente activa que é a parte C-terminal do proBNP). As concentrações de BNP e de NT-proBNP na circulação encontram-se elevadas na insuficiência cardíaca crónica e estão correlacionadas com a sua gravidade.

A concentração sérica de NT-proBNP é utilizada no diagnóstico e prognóstico da disfunção ventricular esquerda que pode ocorrer como parte de doença cardíaca onde a possibilidade de mortalidade é elevada no caso de permanecer sem tratamento e for progressiva. Fornece ainda informações de prognóstico relativamente à estratificação de risco a curto e longo prazo de doentes com angina instável ou enfarte do miocárdio.

d) Proteína C Reactiva de alta sensibilidade (hsPCR)

Este ensaio só deve ser utilizado como recurso auxiliar na identificação de indivíduos com doença cardio-vascular (DCV) e sua classificação em grupos de risco (baixo, moderado e alto). Estudos epidemiológicos demonstram que o risco de DCV aumenta quando os valores da hsPCR sérica excedem os 3 mg/L.

Amostra: Soro, Plasma de Heparina-Lítio.

4.5. Estudo da Urina

A determinação dos parâmetros analíticos urinários é útil não só para avaliar a função renal e doença sistémica, como também no diagnóstico e monitorização de numerosas patologias tais como doenças metabólicas e doenças oncológicas.

Nefropatias ou outra patologia renal, diabetes ou hipertensão estão na origem da proteinúria, cetonúria e glicosúria.

Afecções hepáticas originam urobilinogénio urinário e bilirrubinúria.

Infecções por microorganismos na presença de nitritos e de leucocitúria.

A presença de sangue (Hb ou eritrócitos) aparece em situações de patologia renal e extra-renal.

4.5.1. Análise Sumária de Urina ou Urina Tipoll

A urianálise, apresentada em detalhe no **AnexoV**, compreende o exame macroscópico (cor, turvação e cheiro), químico (analitos físico-químicos) e microscópico (sedimento) da urina (7, 11, 12, 14).

Aution MAX, *SediMAX* e *Aution JET* da A. MENARINI Diagnostics – Sistemas de Urianálise. O *Aution MAX* é o analisador automático que realiza a análise bioquímica dos constituintes urinários e que utiliza as seguintes metodologias:

- Cor (23 tonalidades): Reflectância (analisa a reflexão da luz em 4 λ);
- Turvação (límpida, turva e muito turva): Nefelometria (dispersão da luz);
- Densidade (S.G) (intervalo 1,000 a 1,050 g/cm³): Refractometria por reflexão;
- Tiras de reagente: Reflectância Bicromática ou por duplo λ (excepto para o sangue que é monocromático).

As tiras de reagente (fitas de plástico com várias almofadas de celulose impregnadas de reagentes, cada reagente analisa uma substância), permitem a determinação de glicose, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, pH, sangue (actividade da pseudoperoxidase da Hb), corpos cetónicos, nitritos e leucócitos (actividade da esterase). Calculam ainda a razão proteína / creatinina.

O *SediMax*, presente apenas no HG, encontra-se acoplado ao *Aution Max* e é um analisador automático do sedimento urinário, que utiliza o método de microscopia digital de campo magnético. O microscópio incorporado e o *software* de processamento de imagem, permitem-lhe identificar, classificar e quantificar uma grande variedade de partículas (eritrócitos, leucócitos, células epiteliais de escamação e de transição e/ou

tubulares renais, cilindros hialinos e patológicos, muco, bactérias, leveduras, espermatozoides e cristais) e fornecer uma interpretação dos resultados. As imagens visíveis no *ecran* são idênticas às observadas por microscopia tradicional, sendo possível ampliá-las. Esta nova tecnologia designa-se por Automated Inteligente Microscopy (AIM).

Amostra: Urina fresca em frasco limpo e seco.

4.5.2. Ácido Vanilmandélico (AVM)

O **AVM** é o principal catabolito urinário das catecolaminas (epinefrina/adrenalina e norepinefrina/noradrenalina). O seu doseamento é utilizado em doentes com Hipertensão Arterial (HTA), e auxilia na deteção e monitorização de tumores secretores de Catecolaminas (Feocromocitomas, Neuroblastomas - neoplasia quase exclusivamente pediátrica).

Princípio do Método: Técnica Manual (separação por cromatografia de troca aniónica e leitura por espectrofotometria, após oxidação com a vanilina).

Amostra: urina de micção aleatória ou, preferencialmente urina de 24 horas acidificada com ácido clorídrico (a recolha requer preparação prévia devido à presença de muitos interferentes).

4.5.3. Outras determinações Bioquímicas

- Os doseamentos urinários de Ácido Úrico, Amilase, Creatinina, Glicose, Proteínas, Ureia e Iões (Sódio, Potássio, Cloreto, Cálcio, Magnésio e Fósforo) são realizados no Sistema Vitros.
- A osmolalidade é realizada no Osmómetro.
- Metanefrinas (urinárias e plasmáticas), Cobre, Cálculos Urinários e Paraquat.

4.5.4. Testes Metabólicos Simples

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) são causadas por erros inatos do metabolismo (EIM). O termo EIM aplica-se a um grupo de doenças geneticamente determinadas, decorrentes da deficiência numa das vias metabólicas que estão envolvidas na síntese (anabolismo), transporte ou na degradação (catabolismo) de uma substância (22). As conseqüências podem ser a acumulação de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso de produtos de vias metabólicas acessórias. Estes estão divididos em 3 grupos, segundo Saudubray & Charpentier (1995) (17) que utiliza o fenótipo clínico:

- Grupo I – Distúrbio de síntese ou catabolismo de moléculas complexas (Lisosossomas/Peroxissomas) – Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de eventos interrecorrentes (como infecções) e não estão relacionados com a ingestão de alimentos;
- Grupo II – Alteração do metabolismo intermediário (aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, ciclo da ureia e intolerância a açúcares) – Conduzem a intoxicação aguda e recorrente ou a crónica e progressiva, devido à acumulação de tóxicos resultantes do bloqueio enzimático;
- Grupo III – Défice de produção/utilização de energia no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro (Glicogenoses, Acidémias lácticas, defeitos na oxidação dos ácidos gordos e doenças mitocondriais) – O espectro clínico é vasto: hipoglicémia, hipotonia, miopatia, má progressão ponderal, cardiomiopatia, colapso, etc.

Os EIM, que ao todo afectam 1:1000 recém-nascidos, apresentam-se normalmente como crises agudas com risco de vida, e requerem uma intervenção específica e imediata (emergência médica). O grande número de alterações genéticas nas várias vias metabólicas e a inespecificidade dos sinais clínicos (“tipo intoxicação”) torna difícil o diagnóstico. Em todas as crianças com quadro agudo e suspeita de Doença Metabólica (D.M.) são realizados testes laboratoriais essenciais (Glicose, Amónia, Lactato, Gasimetria, Cetonúria, entre outros).

No LB realizam-se alguns testes metabólicos simples na urina: a detecção de Leucinoase (acidúria orgânica) nas aminoacidopatias, a Homocisteinúria e a Sulfito-oxidase/Co-factor Molibdénio nas doenças do metabolismo dos aminoácidos sulfurados e a pesquisa de açúcares redutores na intolerância aos Hidratos de Carbono.

a) Teste DNPH (dinitro-fenil-hidrazina)

A leucinoase (MSUD) é uma doença hereditária (de transmissão autossómica recessiva) do metabolismo dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (AACR), leucina (LEU), isoleucina (ISOL) e valina (VAL). Resulta do défice da actividade do complexo enzimático, existente na mitocôndria de todas as células do organismo, que é responsável pela descarboxilação oxidativa dos AACR (reacções de transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação). O bloqueio enzimático resulta na acumulação dos AACR, bem como dos respectivos ácidos-cetónicos de cadeia ramificada (A-CCR).

Amostra: Urina recente.

b) Teste do Nitroprussiato (Reacção de Brandt)

A Metionina e a Homocisteína têm um papel central na metilação citoplasmática necessária a muitas funções, incluindo a síntese de creatina, colina e adrenalina, assim como na metilação do DNA. Alterações na transferência citoplasmática do grupo metilo causam doenças neurológicas normalmente graves.

Este teste é usado no reconhecimento da Homocistinúria clássica. Detecta níveis elevados de Homocisteína ou de cisteína, mais precisamente homocistina e cistina, forma (dissulfetos) presente no espaço extracelular.

Amostra: Urina recente sem ser fortemente turva ou corada.

c) Pesquisa de Sulfitos

Teste usado na suspeita de déficit da sulfito oxidase (SO) ou do seu co-factor (molibdénio), uma das causas de encefalopatia epiléptica devido a D.M., particularmente em recém-nascidos. A deficiência da SO ou do seu co-factor é uma doença autossómica recessiva que afecta o metabolismo dos aminoácidos sulfurados, nomeadamente a reacção final de degradação oxidativa destes aminoácidos. A cisteína é catabolizada a sulfito sendo este oxidado a sulfato pela SO e excretado na urina. O seu déficit resulta na produção de sulfocisteinúria.

Princípio do Método: Utiliza-se o teste **Sulfitest** da MercK. Este consiste no uso de tiras de teste para a detecção e determinação semi-quantitativa de iões sulfito. A reacção ocorre na tira (impregnada com nitroprussiato de sódio, hexacianoferrato II de potássio e sulfato de zinco) que, na presença de sulfitos, cora de rosa sendo a intensidade de cor proporcional à concentração destes na amostra de urina.

Amostra: Urina recente (Falsos negativos).

d) Pesquisa de Substâncias Redutoras totais (açúcares):

A deficiência enzimática nas vias metabólicas dos Hidratos de Carbono (HC) resulta no aumento de um monossacarídeo, o que se repercute no sangue e na urina. Nos EIM de HC encontram-se as doenças de armazenamento do glicogénio, a deficiência da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a ausência da galactose-1-fosfato uridil transferase (Galactosémia clássica: incapacidade de metabolizar a galactose em glicose).

Princípio do Método: *Clinitest*[®] comprimido reagente.

Este teste, na forma de comprimido, é usado na determinação quantitativa de açúcares redutores na urina e baseia-se na reacção clássica de Benedict's de redução do cobre. O comprimido (reagente) contém iões cúpricos (sulfato) em meio alcalino

(hidróxido de sódio) que, na presença de substâncias redutoras, passam a iões cuprosos (óxido). É uma reacção que requer aquecimento (fornecido pela reacção entre o NaOH e a H₂O) e que deve ocorrer na ausência de O₂ (libertação de CO₂ na reacção entre o ácido nítrico e o NaHCO₃). A alteração da cor, resultante da reacção, varia com a quantidade de substâncias redutoras presentes e passa de azul, a verde até ao laranja. Os resultados, expressos em percentagem ou g/dl, são obtidos por comparação directa com a tabela de cores fornecida com o reagente. No caso de a pesquisa ser positiva procede-se à identificação do açúcar (glicose, lactose e galactose).

Amostra: Urina recente (os açúcares são consumidos pelas bactérias originando resultados falsos negativos).

Interferentes: Na presença de grande concentração de açúcares na urina (> 2g/dl) é necessário proceder à diluição da amostra.

4.5.5. Beta Clear HCG da CORE Diagnostics

Detecção da **gonadotrofina coriónica humana** (β HCG) ou **gonadotrofina coriónica** (CG), comumente designado por Teste Imunológico de Gravidez (TIG).

A **CG** é uma hormona glicoproteica sintetizada na placenta durante a gravidez. A hormona é composta por duas subunidades de glicoproteína, a alfa (α) e a beta (β), não idênticas e ligadas não covalentemente. No soro materno apresenta-se em muitas formas (CG dimérica nativa, α CG livre, β CG livre, ...), na urina está presente predominantemente, a β CG. Níveis elevados estão frequentemente associados a neoplasias trofoblásticas e não trofoblásticas. Quantidades ínfimas também são produzidas na hipófise de homens e de mulheres não grávidas.

Princípio do Método: Imunocromatografia (Imunoensaio em sanduíche de dois locais).

Quando a amostra flui através da membrana, o Ac anti CG, marcado com fluorocromo e presente no dispositivo de teste, liga-se à CG da amostra, com formação de um complexo. Este move-se através da membrana para a região teste, onde é imobilizado pelo anti-CG aprisionado na membrana, originando a formação de uma banda vermelha que indica um resultado positivo. O teste possui uma zona de controlo que serve para o validar.

Amostra: primeira urina da manhã preferencialmente.

Sensibilidade: 10 mIU/ml.

4.5.6. DRUG-Clip Test 10 da A.MENARINI diagnostics

Este teste permite a detecção qualitativa na urina, de drogas de abuso e seus metabolitos nas concentrações indicadas na **Tabela 3**.

Teste	Uso	Nível de Cut-Off (ng/ml)
Anfetamina (AMP)	Estimulantes do SNC e periférico	1000
Metanfetamina (MET)		
Metilenedioximetanfetamina (MDMA) ou <i>ecstasy</i> (anfetamina sintética)	Estimulante do SNC com propriedades alucinogénias	500
Barbitúricos (BAR)	Suprimem a actividade neuronal do SNC, apresentando propriedades Sedativas e hipnóticas	300
Benzodiazepinas (BZO)	Depressor do SNC (tratamento da ansiedade e da depressão)	300
Cocaína (COC)	Potente estimulante do SNC (aumento do estado de vigília e de euforia)	300
Canabinoide/Marijuana (THC)	Efeitos psicoactivos (euforia, sensação de relaxamento e bem-estar)	50
Morfina (MOP)	Propriedades analgésicas e euforizantes	300
Metadona (MTD)	Alívio da dor e tratamento da síndrome de abstinência de opióides.	300
Antidepressivos Tricíclicos (TCA)	Droga antipsicótica (cuidados psiquiátricos)	1000

Tabela 3: Nível de *cut-off*.

Princípio do Método: Teste imunocromatográfico baseado no princípio das ligações competitivas.

As drogas ou os seus metabolitos presentes na urina competem com os conjugados das respectivas drogas por um número limitado de locais de ligação do Ac. A amostra migra por acção capilar. Qualquer droga presente na amostra numa concentração inferior ao seu nível de *cut-off*, não provoca a saturação dos pontos de ligação das partículas revestidas com Ac e, neste caso, as partículas (Ac) são capturadas pelo

conjugado imobilizado (específico da droga), surgindo uma banda colorida na zona do teste – resultado negativo. A ausência de banda surge quando a concentração da droga está acima do nível de *cut-off*, uma vez que ocorre a saturação de todas as ligações dos Ac.

Amostra: Urina.

4.5.7. Exame Microbiológico

a) Uriline da Biomérieux

A maioria das uroculturas do HP são realizadas pela técnica de DipSlide (lâmina gelosada com duas faces revestidas com meios de cultura diferentes, nomeadamente gelose CLED e gelose MacConkey), porque permite a detecção, contagem e identificação presuntiva dos patogénicos urinários mais comuns. A sementeira no acto de colheita da urina, a incubação a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a leitura após 16 a 24 horas, conduzem a uma resposta célere (exclusão de negativos), factor determinante da sua utilização.

O LB diariamente observa o crescimento bacteriano, estima a sua concentração e envia as culturas positivas para o Lab de Microbiologia, para identificação e realização de antibiograma.

Amostra: Urina obtida por colheita asséptica, seja por jacto médio, saco colector, cateterismo ou punção supra-púbica.

b) Slidex[®] meningite Strepto B da Biomérieux

O **Streptococcus do grupo B** (Strep B) e a *Escherichia coli* KI são as bactérias que se encontram mais frequentemente em patologia infecciosa neonatal, particularmente, nas meningites e nas septicémias que requerem um diagnóstico de urgência.

Os Strep B deixam difundir nos líquidos biológicos uma quantidade significativa de antigénio de natureza poliosídica, específica do grupo, que é eliminada na urina.

Este teste de aglutinação em latex é utilizado na detecção dos Ag de Strep B.

Amostra: Urina.

4.6. Líquidos Biológicos

São vários os líquidos biológicos que chegam ao LB para análise: Líquido Céfalo Raquideano, Líquido Amniótico, Líquido Sinovial, Líquidos Pleural, Pericárdico e Ascítico ou Peritoneal.

4.6.1. Líquido Céfaló-Raquidiano (LCR)

O **Líquido Céfaló-Raquidiano (LCR)** ou Líquor é um líquido nobre, estéril, incolor e límpido. É secretado pelos plexos coróides e ocupa o espaço subaracnóide (espaço situado entre o crânio e o córtex cerebral, mais precisamente entre as membranas aracnóide e pia-máter das meninges). A sua função, além de agir como amortecedor para o córtex cerebral e para a medula espinal, é fornecer os nutrientes e remover metabolitos do tecido nervoso (trocas bidirecionais entre o sangue, o LCR e o cérebro).

Como o LCR é, principalmente, um ultrafiltrado do plasma, a avaliação da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (um conceito e não uma estrutura anatómica) é efectuada pelo doseamento das proteínas plasmáticas neste líquido. Esta quantificação também é útil na avaliação da síntese intratecal de imunoglobulinas. A permeabilidade da barreira hemato-encefálica para as proteínas plasmáticas aumenta por pressão intracraniana elevada, resultante de tumor cerebral, hemorragia intracerebral, lesão traumática e inflamação associada a meningite bacteriana ou viral, encefalite ou poliomielite. Os aumentos mais notórios na concentração de proteína total são observados na meningite bacteriana.

Para uma avaliação correcta dos doseamentos realizados no LCR estes devem ser comparados com os valores séricos sendo realizada, em simultâneo, uma colheita de sangue.

A concentração normal da glicose no LCR corresponde a cerca de 2/3 da glicémia, sendo portanto dependente dos níveis sanguíneos e da taxa de metabolismo do SNC. Valores de glicose baixos no LCR ocorrem geralmente em situações de hipoglicémia, meningites e neoplasias, enquanto valores altos ocorrem sempre por elevação plasmática.

Os níveis de Lactato no LCR dependem da produção intratecal e é utilizado principalmente no diagnóstico diferencial entre meningites bacterianas e virais, e tem valor prognóstico (valores elevados de Lactato são indicativos de baixo êxito da terapêutica).

Associados às meningites tuberculosas observam-se concentrações, baixas de Cloreto e muito elevadas de ADA, no LCR.

Princípio do Método: A análise do LCR engloba o exame citoquímico, o exame microbiológico e a pesquisa de antigénios. O exame citoquímico compreende a determinação das proteínas e da glicose (por vezes é solicitada a determinação de

cloreto, lactato e ADA), a contagem e diferenciação morfológica das células além da avaliação macroscópica (côr e turbidez).

Amostra: LCR (que se obtém por punção lombar ou suboccipital realizada em meio hospitalar por médicos especializados).

Processamento: A análise clínica do LCR inicia-se logo no acto de colheita (modo como o fluído corre – sob pressão ou gotejamento). À chegada ao Lab observa-se a côr (incolor, leitoso, xantocrômico, hemorrágico) e aparência (límpido ou turvo). Em ambiente estéril retiram-se 1ml para citologia (contagem das células em câmara de Fuchs-Rosental) e 1 mL para a realização das determinações químicas e cultura (após centrifugação da amostra a 1500g durante 15 minutos, retiram-se 0,5 mL do sobrenadante para análise química e ressuspende-se o sedimento no restante volume para proceder à cultura em gelose de sangue e gelose de chocolate com Polivitex (PVX)). A restante amostra é utilizada na detecção dos Ag.

A interpretação dos resultados baseia-se nos valores constantes da **Tabela 4:**

Informação Clínica	Leucócitos (mm³)	Predomínio de células	Proteína	Glicose*¹
Normal	0 – 5	Sem predomínio	150 – 500 mg/L	2,5 – 5,5 mmol/L
Infecção viral	2 – 2000	Mononuclear* ²	Ligeiramente elevada (500– 1000 mg/L) ou normal	Normal
Infecção bacteriana (purulenta)	5 – 20000	Polimorfonucleares (PMN)	Elevada (> 1000 mg/L)	Diminuída (<2,5 mmol/L)* ³
Tuberculose e fungos	5 – 2000	Mononuclear	Elevada (> 500 mg/L)	Normal ou ligeiramente diminuída

*¹ = Os níveis de glicose no LCR devem ser avaliados tendo em consideração o nível de glicose no sangue, estes são cerca de 60% do valor encontrado no plasma.
*² = Entre 20 a 75% dos casos pode apresentar leucocitose PMN no início da infecção.
*³ = Pode apresentar valores normais no início da infecção.

Tabela 4: Valores usados no LB para interpretação dos resultados

a) **PASTOREX™ MENINGITIS** da BIO-RAD

A meningite bacteriana é uma situação muito grave, que requer um rápido diagnóstico e tratamento adequado.

Este teste presuntivo, de aglutinação em látex, é utilizado na detecção dos antígenos solúveis (polissacarídeos capsulares específicos de certos serogrupos ou serotipos), produzidos pela maioria dos agentes etiológicos das meningites:

Neisseriae meningitidis grupo A e Y, *Neisseriae meningitidis* grupo C e W135, *Neisseriae meningitidis* grupo B e *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus* grupo B.

Amostra: LCR

4.6.2. Líquido Amniótico (LA)

Durante a vida intra-uterina, o feto vive dentro de um compartimento cheio de fluido - o **líquido amniótico** - que o protege e contribui para manter a temperatura constante.

O LA é um meio fluido complexo em constante renovação (3 horas) que apresenta importantes variações na sua composição em função do estado de gravidez / tempo de gestação. Com o decorrer da gestação, a composição deste vai-se alterando, designadamente a concentração de sódio, de ureia, creatinina, diminuição da osmolalidade e aumento do ácido úrico.

Após colheita, por amniocentese realizada na MBB Consulta de Diagnóstico Pré-Natal (DPN) os líquidos são enviados ao LB. Os parâmetros solicitados são: Glicose, Creatinina, Ureia, AST, ALT, GGT e ALP. A informação clínica que acompanha o pedido analítico refere como motivo: gravidez gemelar (bicoriónica, biamniótica) com idade gestacional entre as 16 e as 18 semanas.

Amostra: Líquido amniótico.

Processamento: Após centrifugação a 400g, durante 2 minutos são realizadas, no sobrenadante, as determinações químicas.

4.7. Fezes

4.7.1. FOB da Ultimed

Pesquisa de sangue oculto nas fezes pela detecção de Hemoglobina humana (Hb).

A presença de sangue oculto nas fezes está associada a distúrbios gastrointestinais tais como úlceras gástricas e duodenais, gastrite, ulcerações medicamentosas e neoplasias

gástricas ou do cólon. Este teste auxilia no despiste do diagnóstico precoce do cancro do cólon ou do recto, o que contribui para a redução significativa da sua mortalidade (quase 50% decorrente da neoplasia). Também se utiliza no diagnóstico e monitorização de hemorragias gastrointestinais.

Princípio do Método: Imunocromatografia (Imunoensaio em sanduíche de dois locais).

Esta técnica imunológica utiliza dois Ac na identificação selectiva da Hb.

A amostra é primeiro colocada numa solução de extracção. Adicionam-se algumas gotas desta solução ao poço de amostra do dispositivo de reacção. A Hb presente na amostra liga-se ao Ac conjugado marcado com fluorocromo formando um complexo Ag-AC. Este flui pela área absorvente da cassete, indo ligar-se ao AC anti-Hb humana na linha de reacção positiva. Esta ligação provoca o aparecimento de uma banda vermelha indicativa de um resultado positivo. O teste possui uma linha de controlo que serve para o validar.

Amostra: fezes.

Sensibilidade: 40 ng/ml de Hb humana.

4.7.2. VIKIA® Rota-Adeno da Biomérieux

Detecção de Rotavírus e Adenovírus.

Os Rotavirus e os Adenovirus são, respectivamente, os primeiros e os segundos agentes responsáveis por gastroenterites agudas, principalmente, nas crianças mais novas. As diarreias virais são frequentemente sazonais tornando-se por vezes epidémicas. No estado agudo da doença são excretadas grandes quantidades de vírus, responsáveis pela propagação da epidemia. O diagnóstico rápido e preciso do agente etiológico permite evitar a antibioterapia e isolar o doente infectado.

Este teste permite a dupla detecção qualitativa dos Rotavirus e dos Adenovirus num extracto único de fezes.

Princípio do Método: Imunocromatografia (Imunoensaio em sanduíche de dois locais).

Associação de Ac monoclonais específicos de Rotavírus e de Adenovírus.

Na membrana de cromatografia estão fixados, em duas zonas de teste distintas, um Ac anti-Rotavirus e um Ac anti-Adenovirus.

O conjugado, presente no dispositivo de teste, é constituído por uma mistura de um Ac anti Rotavírus ligado a um corante azul e de um Ac anti Adenovírus ligado a um corante vermelho. A amostra é primeiro colocada numa solução de extracção. Adicionam-se algumas gotas desta solução ao poço de amostra do dispositivo de

reacção, que se desloca por capilaridade ao longo da membrana para a região teste. Se estiverem presentes na amostra Rotavírus e/ou Adenovírus, o conjugado liga-se ao Ag Rotavírus da amostra, com formação de complexos Ag-Ac anti Rotavírus e/ou liga-se ao Ag Adenovírus com formação de complexos Ag-Ac anti Adenovírus. Os complexos Ag-Ac fixam-se aos Acs anti-Rotavírus e/ou aos Acs anti-Adenovirus formando complexos visualizados por uma linha azul e/ou vermelha na zona de teste respectiva. A ausência desta linha sugere um resultado negativo.

O teste possui uma linha de controlo que serve para o validar.

Amostra: Fezes em frasco limpo e seco, colhidas logo após o aparecimento dos sintomas. Uma excreção máxima aparece 3/5 dias para rotavírus e 3/13 dias para adenovírus, em doentes com gastroenterite.

Sensibilidade: 96%.

4.7.3. Esteatócrito ácido

A presença de um excesso de gordura nas fezes, esteatorreia (gordura neutra e ácidos gordos), pode ser devida a um dos seguintes mecanismos: trânsito aumentado, défice enzimático na digestão, défice de absorção ou hipersecreção endógena (fibrose quística).

O doseamento da gordura presente nas fezes é realizado em meio ácido utilizando tubos de micro-hematócrito. Após centrifugação, a gordura ocupa a zona superior do tubo enquanto o sedimento desceu para a zona inferior. Depois de efectuadas as medições, o resultado é calculado e expresso em percentagem.

4.8. Outras determinações

4.8.1. Testes Imunocromatográficos

Testes rápidos, qualitativos, altamente específicos para epítomos singulares de cada ensaio.

a) Exact Strep A Cassette da Clearview

Detecção de *Streptococcus* grupo A (Strep A).

Os *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A são os principais responsáveis pelas infecções do tracto respiratório superior como amigdalite, faringite e escarlatina. O diagnóstico e tratamento precoce da infecção bacteriana por Strep A reduzem a prescrição empírica de antibiótico, a severidade dos sintomas e das complicações subsequentes tais como febre reumática e glomerulonefrite.

Princípio do Método: Imunocromatografia (Imunoensaio em sanduíche de dois locais).

Esta técnica imunológica detecta o antígeno de Strep A, a partir de uma solução de extracção obtida da zaragatoa da orofaringe.

Quando a solução extraída flui através da membrana, o conjugado Ac anti Strep A, marcado com corante e presente no dispositivo de teste, liga-se ao Ag Strep A da amostra, com formação de complexos Ag-Ac de Strep A. A mistura corada flui através da membrana para a região teste onde está imobilizado o Ac anti- Strep A. Caso o Ag do Strep A esteja presente, forma-se uma ligação (sanduíche) de Ac-Ag- conjugado Ac, originando a formação de uma banda vermelha que indica um resultado positivo. O teste possui uma banda de controlo que serve para o validar.

Amostra: zaragatoa orofaríngea.

Sensibilidade: 5×10^4 microorganismos/teste.

b) Determine HIV-1/2 da Inverness Medical

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é caracterizada por alterações nas populações de linfócitos T. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) reduz o número de linfócitos T auxiliares no indivíduo infectado, tornando-o mais susceptível às infecções oportunistas e a algumas neoplasias.

Existem dois tipos de vírus responsáveis pela SIDA, denominados HIV-1 e HIV-2. A presença do vírus da SIDA provoca a produção de Ac específicos contra o HIV-1 e o HIV-2.

Princípio do Método: Imunoensaio qualitativo para a detecção de Ac contra o HIV-1 e HIV-2. Não detecta Ag virais.

As limitações deste teste são muitas, podendo ocorrer resultados falsos positivos (ocorrência de reacções não específicas) ou falsos negativos (níveis baixos de Ac como no caso de seroconversão precoce ou infecção por outra variante do vírus). Por estes motivos, todas as amostras são encaminhadas para o Lab de Imunologia para serem processadas por outra técnica.

Amostra: Soro humano.

4.8.2. Serodiagnósticos - Febrile Antigens da Linear Chemicals

Utilizam-se, no diagnóstico *in vitro*, na detecção e semiquantificação de aglutininas específicas séricas humanas (grupo de Acs que surgem durante algumas infecções febris). A técnica, designada por aglutinação em lâmina, baseia-se numa reacção imunológica

entre os Acs presentes no soro do doente e os Ags presentes na suspensão bacteriana, com formação de complexos Ac-Ag.

Uma reacção positiva traduz-se pela formação de uma aglutinação visível a olho nú. A intensidade da aglutinação e o tempo que leva a surgir, são função do número de Acs presente na amostra.

Amostra: Soro.

a) Rosa de Bengala

O agente etiológico da Brucelose ou Febre de Malta é a *Brucella melitensis*. Utiliza-se para rastreio o teste de Rosa de Bengala, técnica de aglutinação em lâmina que usa um antigénio de *Brucella abortus* corado com Rosa Bengala.

No caso de uma reacção positiva, o soro é enviado para o Lab de Imunologia onde é processado por Imunoflorescência, para confirmação do diagnóstico.

b) Teste de Wright

Esta reacção de aglutinação em tubo, em tempos muito utilizada, foi substituída pelo teste de Rosa de Bengala por ser um método mais sensível e célere.

c) Teste de Weil-Felix

A *Rickettsiae conorii* é o agente etiológico da Febre Escaro Nodular ou Febre da carraça. Esta bactéria é transmitida ao Homem, pela mordedura da carraça do cão.

Este teste baseia-se, na fortuita aglutinação de certas estirpes de *Proteus* (*Proteus vulgaris* OX19, *Proteus vulgaris* OX2 e *Proteus mirabilis* OXK) que ocorre na presença da aglutinina.

Esta reacção é pouco específica (ocorrência de reacções cruzadas) mas ainda se utiliza no diagnóstico como teste rápido de despiste.

d) Reacção de Widal

Os principais agentes etiológicos da Febre Tifóide são a *Salmonella typhi* e a *Salmonella paratyphi*.

Este teste utiliza as seguintes suspensões bacterianas: *S. typhi* H, *S. typhi* O, *S. paratyphi* B-O e *S. paratyphi* B-H, serotipagem segundo os Ag somáticos O (grupo A, B, C,...) e os flagelares H.

Esta reacção de aglutinação é, por vezes, positiva em doentes com infecções causadas por outras bactérias (reacções cruzadas) ou por prévia imunização contra a febre tifóide.

5. ESTUDO – “Infecções respiratórias na criança – Novos caminhos”

5.1. Infecções Respiratórias Virais

As infecções agudas do tracto respiratório, causadas maioritariamente por vírus, têm geralmente um curso benigno, mas são o principal determinante da morte nos países em desenvolvimento e a causa mais comum de hospitalização de crianças nos países desenvolvidos.

Os vírus respiratórios são muitos, pertencentes a diferentes famílias e diferentes géneros. Infectam o tracto respiratório superior e/ou inferior, apresentam afinidade para as mucosas e para as superfícies do epitélio respiratório, podendo ocorrer co-infecções.

Os principais agentes etiológicos virais causadores de doença respiratória são apresentados na **Tabela 5**.

Os vírus *Influenza* (A e B) e os *Vírus Respiratórios Sinciciais* (RSV) são os responsáveis pela maioria das doenças respiratórias graves durante os meses de Inverno. Estas infecções afectam indivíduos de todas as idades, são facilmente transmitidas de pessoa a pessoa e resultam em centenas de milhares de hospitalizações por ano.

5.1.1. Vírus Respiratórios

a) Vírus Influenza

Os vírus *Influenza* humanos pertencem à família *Orthomyxoviridae* e estão divididos nos géneros A, B e C.

Os vírus ***Influenza A*** causam epidemias sazonais recorrentes e pandemias globais ocasionais com níveis devastadores de morbidade e mortalidade, que atingem todas as faixas etárias, ocorrendo com maior gravidade em crianças e idosos. A capacidade que os vírus *Influenza A* possuem em se adaptar a vários hospedeiros (Homem e outros animais) e sofrerem eventuais rearranjos, garante o aparecimento constante de novas estirpes com patogenicidade, transmissibilidade e potencial pandemia, com elevado grau de imprevisibilidade.

Os vírus *Influenza B* causam doença habitualmente menos grave, infectam quase exclusivamente o Homem e podem originar epidemias.

Família	Vírus	Características	Transmissão	Doença
<i>Adenoviridae</i>	<i>Adenovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> . dsDNA . cápside icosaédrica . sem envelope . 47serotipos humanos 	<ul style="list-style-type: none"> . Secreções respiratórias ou aerossóis . Fecal - oral 	<ul style="list-style-type: none"> . Faringite . Pneumonia . Gastroenterites em crianças (serotipos 40 e 41)
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> . ssRNA . Cápside helicoidal . Com envelope 	<ul style="list-style-type: none"> . Desconhecida, provavelmente por contacto directo ou aerossóis 	<ul style="list-style-type: none"> . Constipação comum . SARS (síndrome respiratório agudo severo). . Gastroenterites em crianças
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza</i>	<ul style="list-style-type: none"> . (-) ssRNA . Segmentado (8) . Cápside helicoidal . Com envelope . 3 serotipos (A, B e C) . Os serotipos A e B são os agentes da quase totalidade das doenças humanas 	<ul style="list-style-type: none"> . Secreções respiratórias ou aerossóis 	<ul style="list-style-type: none"> . Gripe . Pneumonia primária . Bronqueolite . Constipação . Otite média em crianças
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Parainfluenza</i>	<ul style="list-style-type: none"> . ssRNA . Cápside helicoidal . Com envelope 	<ul style="list-style-type: none"> . Secreções respiratórias ou aerossóis. 	<ul style="list-style-type: none"> . Constipação . Bronqueolite. . Pneumonia em crianças
	<i>Pneumovirus</i> ou RSV	<ul style="list-style-type: none"> . (-) ssRNA . Cápside helicoidal . Com envelope 	<ul style="list-style-type: none"> . Secreções respiratórias ou aerossóis e de pessoa a pessoa 	<ul style="list-style-type: none"> . Bronqueolite . Pneumonia . Constipação em crianças
	<i>Metapneumovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> . ssRNA . Cápside helicoidal . Com envelope 	<ul style="list-style-type: none"> . Transmissão pessoa a pessoa 	<ul style="list-style-type: none"> . Bronqueolite . Pneumonia em crianças.
<i>Picornaviridae</i>	<i>Rinovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> . ssRNA . Cápside icosaédrica . Sem envelope 	<ul style="list-style-type: none"> . Secreções respiratórias ou aerossóis 	<ul style="list-style-type: none"> . Constipação comum.

Tabela 5 - Principais vírus respiratórios.

Características gerais do vírus Influenza: São vírus muito pleomórficos, com capacidade de sofrer variações antigénicas e infectar vários hospedeiros. Apresentam vários tipos e subtipos.

O virião apresenta:

- Genoma viral de RNA de cadeia simples com polaridade negativa ((-)ssRNA), segmentado (8 segmentos),
- Na nucleocápside de simetria helicoidal estão presentes uma nucleoproteína (NP) específica do género e uma polimerase viral,
- O envelope lipoproteico, formado a partir da membrana citoplasmática do hospedeiro, apresenta as glicoproteínas transmembranares Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA), que formam espículas e se projectam para fora da partícula viral, e a proteína da matriz (M1). O tipo A apresenta ainda a proteína transmembranar M2 que funciona como canal iónico e é indispensável à sua replicação.

A **HA** é um trímero com duas subunidades HA1 e HA2 unidas por pontes dissulfeto. A subunidade HA1 contém os locais de ligação aos receptores celulares (glicoproteínas com terminal de ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico, ligado a uma molécula de galactose). A subunidade HA2 é a responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular.

A **NA** é uma enzima hidrolítica (sialidase) que remove o ácido siálico das glicoproteínas (receptor da HA). É responsável pela libertação das partículas virais ligadas a substâncias presentes no muco e a células não susceptíveis. Promove ainda a libertação dos vírus da célula infectada.

Ciclo de Infecção - Inclui:

- Adsorção: que consiste no reconhecimento e ligação do vírus a uma célula hospedeira susceptível (tropismo viral). A Proteína de Adsorção Viral (VAP) é a HA;
- Penetração: processo pelo qual o vírus entra na célula hospedeira. Mecanismo que envolve a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (por endocitose);
- Descapsidação: ocorre após a internalização do vírus e liberta o genoma viral;
- Replicação do genoma viral: síntese de macromoléculas (produção de ácido nucleico e de polímeros proteicos);

- Reunião e montagem: as proteínas estruturais, os genomas e as enzimas virais são reunidos em viriões. A aquisição do envelope é o passo final deste processo que ocorre no citoplasma;
- Libertação de novos vírus: por exocitose (formação de vesícula). Só cerca de 1% dos novos viriões são viáveis.

O vírus *Influenza* do tipo A possui vários subtipos que se distinguem pelas características antigénicas das suas glicoproteínas de superfície HA e NA. Existem 16 subtipos de HA (H1 a H16) e 9 de NA (N1 a N9). Todos os subtipos (H_xN_y) foram isolados de aves aquáticas, onde se replicam, mas no Homem só alguns estão associados a epidemias e pandemias, nomeadamente o H1, H2 e H3, o N1 e N2.

O vírus *Influenza* é o único agente infeccioso conhecido em que o aparecimento de epidemias está relacionado com a variabilidade antigénica, consequência da sua instabilidade genética (genoma de RNA, fragmentado e infectar vários hospedeiros).

Podem ocorrer dois tipos de variações antigénicas:

- Variações menores ou suaves (“Antigenic drift”) - representam a adaptação do vírus ao desenvolvimento de Acs por parte do hospedeiro e resultam de erros, não corrigidos, que ocorrem durante a replicação do RNA. A acumulação de mutações pontuais nos genes HA e NA ao longo do tempo, conduz a alterações de aminoácidos nestas proteínas e provoca a alteração gradual da antigenicidade. Originam novas estirpes dentro do mesmo subtipo, não reconhecidas pelo Sistema Imunitário da população em geral, resultando em epidemias de gripe relativamente branda cada 1 a 3 anos;
- Variações maiores ou drásticas (“Antigenic shift”) - alterações bruscas e importantes da estrutura antigénica viral, causadas pela recombinação genética (envolve a troca de fragmentos completos do genoma) de 2 vírus diferentes que co-infectam o mesmo hospedeiro. Ocorre quando o vírus humano e o vírus animal infectam a mesma célula, seja no organismo humano, seja num *mixing vessel*. Originam um novo subtipo do vírus *Influenza*, com um novo perfil antigénico (HA ou HA/NA) para o qual existe pouca ou nenhuma imunidade resultando em epidemias periódicas universais (pandemias).

Pandemia de Gripe de 2009

Em Abril de 2009 os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) anunciaram a identificação de um novo vírus *Influenza*. O novo vírus, recombinante triplo do vírus *Influenza* de origem suína, aviária e humana, apresentou as características de uma estirpe pandémica: poderia ser transmitido de humano para humano, era virulento (patogéneo primário) e os seres humanos eram imunologicamente *naives* ao vírus.

Este vírus, *Influenza A* de 2009 (H1N1), emergiu no México em Março de 2009. Na Europa registaram-se os primeiros casos em meados de Abril (semana 16), inicialmente em viajantes oriundos do México ou nos seus contactos directos.

Dia 11 de Junho de 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o início de uma pandemia por *Influenza* associada à estirpe (H₁N₁) 2009 (1, 21), pois foi claro que este vírus cumpria os critérios acordados internacionalmente.

Houve duas ondas de pandemia. A primeira na Primavera/Verão que coincidiu com o término do ano lectivo, o que pode justificar a pouca frequência/expressão da doença. A segunda ocorreu no Outono/Inverno, onde as crianças com menos de 14 anos foram as mais afectadas numa proporção de 8:5:2:1 (idade <4 anos, 5 – 14 anos, 15- 64 anos e > 65 anos, respectivamente) (19).

O fim do período pandémico foi declarado, pela OMS, em 10 de Agosto de 2010. No período pós-pandémico, é de esperar que o vírus continue a causar sérias doenças em jovens.

Inicialmente e com poucas exceções, o vírus *Influenza A* de 2009 (H1N1) permaneceu suscetível aos inibidores da neuraminidase, Oseltamivir e Zanamivir, mas resistente aos inibidores M₂, Amantadina e Rimantadina. No entanto, dados da OMS indicaram que em Março de 2010 foram reportados em todo o Mundo, 264 casos de infecção por vírus *Influenza A* de 2009 (H1N1) resistentes ao Oseltamivir. Todos eles apresentaram uma mutação H275Y que lhes confere resistência ao Oseltamivir, mas não ao Zanamivir (2).

O diagnóstico precoce, o isolamento estrito, o tratamento adequado e atempado, e a eficácia das medidas tomadas pelos países, podem ter diminuído a disseminação da infecção.

As pandemias de gripe que ocorreram ao longo dos tempos foram:

- “Gripe espanhola”, a mãe de todas as pandemias (1918 -1919), subtipo H1N1, 20 a 40 milhões de mortes;
- “Gripe asiática”, (1957 – 1958), subtipo H2N2, 1 a 2 milhões de mortes;
- “Gripe de Hong Kong”, (1968 – 1969), subtipo H3N2, 700 mil mortes;
- “Gripe russa” em 1977 pelo subtipo H1N1;
- “Gripe das aves” em 1997 pelo subtipo H5N1;
- “Gripe de origem suína”, (2009 – 2010), subtipo H1N1, cerca de 18000 mortes e 214 países afectados.

b) Vírus Sincicial Respiratório - RSV

O **RSV** (A e B) é o agente etiológico mais comum das infecções virais do tracto respiratório inferior em lactentes, crianças muito jovens e população idosa. As infecções por RSV resultam em mais de 100.000 hospitalizações de crianças por ano e são a causa mais frequente de bronquiolite e pneumonia em pacientes (crianças menores de 9 meses de idade) hospitalizados (Iwane et al, 2004).

O RSV é um membro da família *Paramyxoviridae*. Possui uma estrutura de (-)ssRNA, com envelope de bicamada lipídica derivado de membrana da célula hospedeira. À superfície do envelope tem duas glicoproteínas: proteína de fusão (F) e Proteína G (G) (Cordeiro e Parks, 2007).

c) Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico microbiológico mais comum é pouco célere para ter o uso clínico desejado. A disponibilidade de um ensaio rápido e sensível para o diagnóstico viral é muito importante:

- Para estabelecer uma apropriada intervenção terapêutica (introdução precoce de tratamento antiviral);
- Para reduzir a utilização de terapia antibiótica desnecessária, favorecendo o uso criterioso de antibióticos;
- Na implementação de precauções para controle da transmissão (isolamento dos doentes), reduzindo o risco de infecções nosocomiais;
- Na redução significativa do tempo e da necessidade de internamento hospitalar;
- Na optimização dos pedidos laboratoriais;
- Na informação epidemiológica.

Nas duas últimas décadas, as tecnologias moleculares sofreram um grande desenvolvimento. A PCR (Polymerase Chain Reaction) e suas variantes são hoje muito utilizadas em Laboratórios de rotina porque são técnicas conceitualmente simples, rápidas, sensíveis, específicas e, nalguns casos, automatizadas (10, 13).

Os testes comerciais existentes baseiam-se na generalidade num paradigma similar:

- Lise da célula e libertação do patógeno (os vírus são parasitas intracelulares);
- Extração e purificação do ácido nucleico (an);
- Amplificação do an por PCR;
- Detecção (exemplo: detecção por microarray de fase sólida ou líquida).

A PCR *multiplex* utiliza-se na detecção em simultâneo de espécies alvo de diferentes patógenos na mesma amostra biológica, o que favorece o diagnóstico de co-infecções, sendo portanto a mais promissora.

5.2. Validação da aplicabilidade do Sistema Verigene® RV+ aos vírus respiratórios.

5.2.1. Importância da Tecnologia Verigene® RV+ da Nanosphere

A eficiência e rapidez com que se detectam e diferenciam os vírus respiratórios é essencial para um tratamento efectivo dos doentes, controlo de infecção e vigilância epidemiológica. Como resposta e com base nos métodos genotípicos, têm surgido equipamentos que efectuem a amplificação, sequenciação, análise e detecção de ácidos nucleicos de alvos específicos virais, e que apresentam a vantagem de possuírem elevada sensibilidade e especificidade. Recentemente têm emergido variados testes que efectuem, simultaneamente e na mesma amostra, a análise de vários vírus respiratórios (Sistemas *Multiplex PCR*). No entanto o tempo de resposta tem sido uma dificuldade para a sua aplicação na rotina laboratorial, serviço de urgência e Unidades de Cuidados Intensivos.

O **Sistema Verigene®**, desenvolvido pela Nanosphere, Inc., utiliza a nanotecnologia (nanopartículas de ouro) para efectuar a extração dos ácidos nucleicos, *Multiplex RT-PCR*, amplificação e hibridização por *microarray*, directamente na amostra do doente, de vírus respiratórios importantes no diagnóstico clínico, em aproximadamente 3 horas.

Foi desenhado tendo em consideração os utilizadores. É uma estação de trabalho que permite a realização de testes de diagnóstico molecular de um modo simples, acessível,

flexível, rápido na detecção de múltiplos alvos (*Multiplex PCR*) e com alta sensibilidade e especificidade.

5.2.2. O Sistema Verigene®

Este sistema de testes, *near-patient* PCR (Verigene® RV+, Nanosphere Inc.), utiliza tecnologia de nanopartículas no diagnóstico molecular. Na base do sistema Verigene SP estão um leitor, um processador e o kit de reagentes.

O leitor (Verigene® reader) é a unidade de controlo do sistema. Efectua a identificação da amostra e do operador, monitorização do todo o processo, leitura dos slides, análise dos resultados com elaboração do relatório do teste e do controlo de qualidade.

O processador (Verigene® processor SP), é um módulo que sequencialmente e sem intervenção do operador realiza, em ambiente fechado, a preparação da amostra (extracção e purificação do ácido nucleico), amplificação do alvo e sua hibridização.

O kit de reagente tem 4 consumíveis: a bandeja de extracção, o suporte de pontas, o reagente de amplificação, e o cartucho de teste:

- A bandeja de extracção tem todos os reagentes necessários para que ocorra a extracção dos an (as esferas magnéticas pretas e o tampão de lise/ligação de cor azul) e o local onde se coloca a amostra;
- A bandeja de amplificação tem todos os reagentes necessários para realizar a transcrição reversa (enzima) e a amplificação do alvo. Contém também os reagentes controlo, validando todo o processo;
- O cartucho de teste contém todos os reagentes necessários à reacção de hibridização, inclusive o suporte sólido (slide de vidro) que detecta e captura o alvo e amplifica o sinal para sua detecção.

O teste RSV+ detecta 4 vírus e identifica 5 subtipos do Influenza A por amostra: *Influenza A*, *Influenza B*, RSV A, RSV B, *Influenza A – H1*, *Influenza A – H3*, *Influenza A – H1N1 2009*, *Influenza A – H275Y – 2009* e *Influenza A – H275Y – H1* (uma mutação do H275Y no gene da neuraminidase em estirpes H1 de *Influenza A*).

5.2.3. Metodologia

Este estudo teve as componentes prospectiva, observacional e laboratorial sendo realizado no período entre 15 de Dezembro 2010 a 31 de Março de 2011.

População de amostragem:

- Foram selecionadas 3 crianças por dia, com idade inferior 6 anos, observadas no Serviço de Urgência do Hospital Pediátrico Dr. Carmoma da Mota, com febre (temperatura axilar $\geq 38^{\circ}\text{C}$) e sintomas respiratórios (tosse e/ou rinorreia);
- As primeiras 3 crianças do dia que cumprissem este critério e cujos encarregados de educação aceitassem participar eram incluídas no estudo, procedendo-se à colheita de secreções nasofaríngeas com zaragatoa.

Colheita, manuseamento e armazenamento de amostras:

- Realização de colheita por zaragatoa nasofaríngea com ponta de polyester e colocada em meio de transporte universal para vírus;
- Após a colheita, a amostra foi conservada a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ se analisada até às 72 horas. Para períodos mais longos, esta foi armazenada a temperatura igual ou inferior a -70°C .

Preparação da amostra para a análise:

- Descongelar as amostras e agitar em vórtex;
- Centrifugar de modo pulsado (5 a 10 segundos).

Processamento da amostra:

- Colocar no processador, pela seguinte ordem:
 1. Bandeja de extração, após ressuspensão completa das esferas magnéticas;
 2. Suporte de pontas;
 3. Reagente de amplificação descongelado e homogeneizado e tubo de amplificação;
 4. Cartucho de teste;
 5. $200 \mu\text{L}$ de amostra.

RT-PCR:

- Extração e purificação do ácido nucleico

No processo de extração ocorre a lise celular e a digestão de proteínas. Os ácidos nucleicos são capturados por micropartículas magnéticas. Estas são depois lavadas para remover contaminantes e restos celulares. Por fim os ácidos nucleicos são colocados num tampão de eluição.

- Amplificação

A amplificação é usada para aumentar o número de alvos presentes, inicialmente na amostra. Este sistema amplifica alvos de RNA usando a técnica de transcrição reversa

seguida de PCR (RT-PCR). Foi concebido de modo a minimizar potenciais contaminações.

- Hibridização por microarray

É realizada com sondas de captura imobilizadas num slide de vidro – microarray de fase sólida. A amostra que contenha a sequência complementar fica, deste modo imobilizada, formando um conjugado sonda / ácido nucleico e disponível para a fase subsequente. No **Anexo VI** encontram-se discriminadas as sondas utilizadas.

- Detecção

É efectuada pela adição de um revelador, a nanopartícula de ligação específica ao conjugado (sonda de captura / ácido nucleico complementar). Se a amostra possuir este conjugado há emissão de luz, sendo assim detectada. Tem a grande vantagem de aumentar a sensibilidade e diminuir o ruído (background ou ligação inespecífica).

Resultados

São emitidos como detectado, não detectado ou sem resultado.

O futuro

No futuro, estes ensaios totalmente automatizados têm de ser aplicáveis a várias espécies incluindo bactérias e fungos relevantes clinicamente (de crescimento lento, não cultiváveis ou mesmo de difícil detecção), distinguir os microorganismos vivos dos mortos, ser capazes de quantificar a carga do patógeno, marcar a severidade da doença, distinguir a contaminação da infecção, fornecer informação relevante em 2-6 horas para ter impacto na escolha do tratamento e capazes de detectar genes que codificam as resistências à terapêutica.

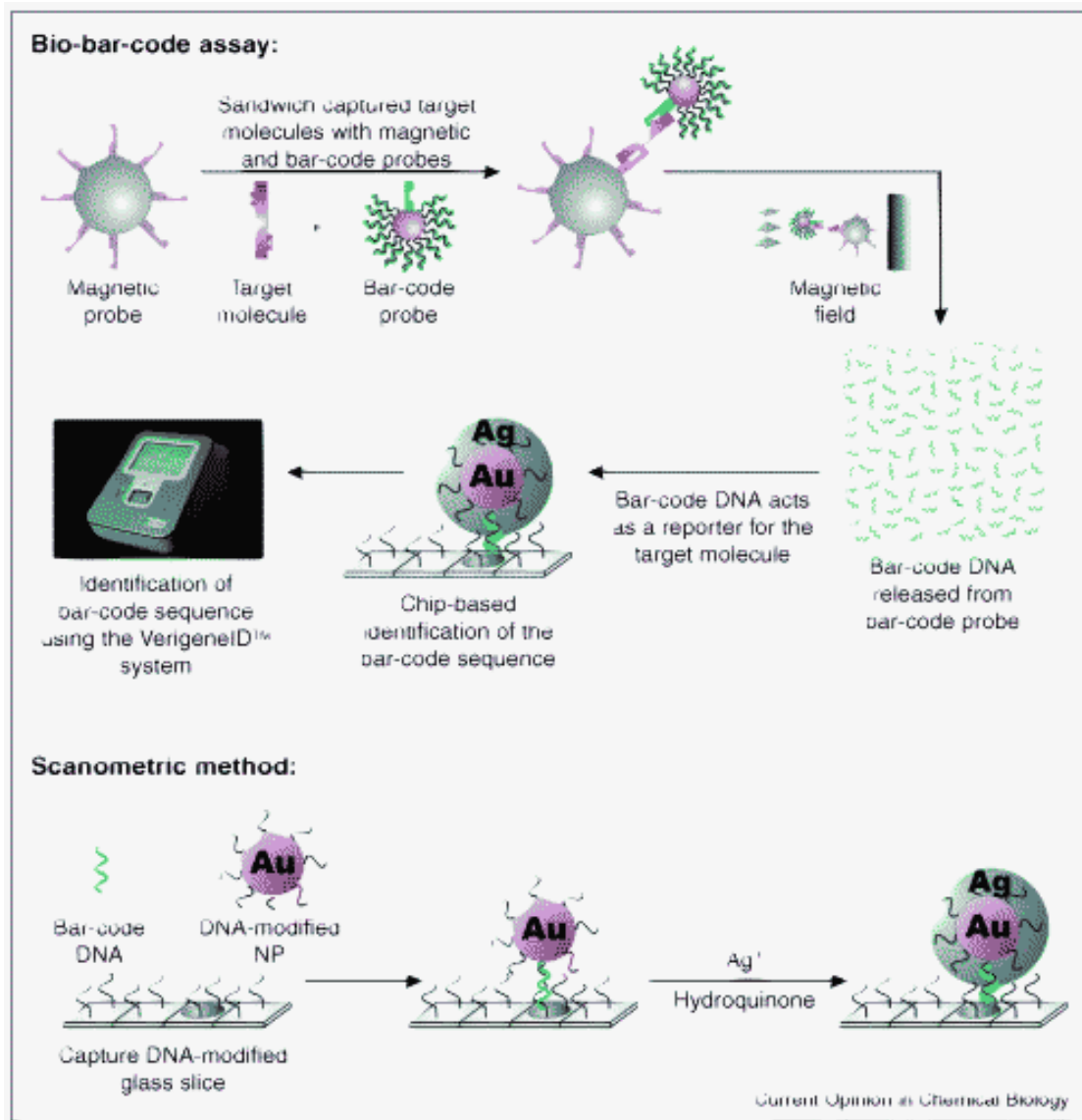


Figure 1 – Tecnologia Verigene®.

6. CONCLUSÕES

A frequência deste Mestrado foi muito proveitosa apesar de difícil e trabalhosa. Gratificante não só pelos conhecimentos adquiridos como pelo convívio. Ao contactar com novas metodologias, descobriu o fundamento de determinadas solicitações, aprofundou os conhecimentos e compreendeu a importância das análises efectuadas nos outros laboratórios, bem como das áreas e tecnologias emergentes, adquiriu novas competências.

Actualizou e consolidou os conceitos teóricos, reviu conhecimentos e metodologias e aplicou-os na prática laboratorial.

Partilhou a informação adquirida impulsionando mudanças de atitude, aumentando o sentido crítico, maior compreensão e até a reformulação de práticas por parte da equipa.

Por vezes sentimos a necessidade de investigar e analisar com mais profundidade para responder às dúvidas que surgem no nosso dia-a-dia mas o tempo e o volume de trabalho não o permitem. Este Mestrado colmatou essa lacuna obrigando-me a parar e debruçar sobre os assuntos da minha rotina profissional o que se repercutiu na atitude e confiança perante os resultados analíticos e na melhoria do desempenho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.M. Correia*, L. Queirós, and J. Dias, *Pandemic influenza A (H1N1) in the North of Portugal: how did the Autumn-Winter wave behave?* Rev Port Pneumol. 2010;16(6):880-886.
2. BAI Lu, CAO Bin and WANG Chen Chinese, *Medical progress Influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus infection*, Medical Journal 2011;124(20):3399-3402 3399.
3. Bailey & Scott's; Forbes, Betty A, Sahm, Daniel F., Weissfeld, Alice S. - *Diagnostic Microbiology*, Twelfth Edition, Mosby, 2007.
4. Barreto, C., Pereira, L. - *Como Interpretar as Provas de Suor com Valores Borderline no Diagnóstico de Fibrose Quística*, Acta Pediatr. Port., 2004; N° 3:Vol. 35: 261-266.
5. Biomérieux Portugal: www.biomerieux.pt.
 - Manual de Utilização do Sistema Mini-Vidas: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/User_Manual/31813001-31814000/User_Manual_-_161150-093_-_pt_-_G_-_mini_VIDAS.pdf.
 - Upline: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/763001-764000/Package_Insert_-_08359_-_D_-_56507_-_56508.pdf.
 - Brochuras:
Procalcitonina, Infecções Bacterianas e Sepsis.
Procalcitonin in pediatric practice, a useful biomarker in the management of severe bacterial infections (Pediatricians' experience and case studies).
6. Burtis, Carl A., Ashwood, Edward R., Bruns, David E. - Tietz, *Fundamentos de Química Clínica*, 6ª Edição. Brasil: Sauders / Elsevier, 2008.
7. Fogazzi, Giovanni B. - *The Urinary Sediment, An Integrated View*, Third Edition. Italia, Masson / Elsevier, 2009.
8. Garcia, S. C., et al. – *Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão*, J. Bras Patol Med Lab, Vol. 40, N° 6, pag. 393-401, 2004.
9. Instrumentation Laboratory: www.ilww.com.
 - GEM® Premier™ 3000 – Manual do Utilizador, Part No 0024001457 Rev. 0.0 Maio 2003.

- VAPRO®5520 Vapor pressure Osmometer, User's Manual. M2648-4 rev B. WESCOR. INC Biomedical Products.
 - MACRODUCT 3700 – SYS, Sweat Collection System, Instruction / Service Manual.M2551-7 rev C. WESCOR. INC Biomedical.
10. Jannetto P.J et al. – *Real-Time Detection of Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial Virus A and B in Respiratory Specimens by Use of nanoparticle Probes*, Journal of Clinical Microbiology, 48 (11):3997, 2010.
11. Kouri T., Fogazzi G.B., Gant H. et al. - *European urinalysis guidelines*, Scand J Clin Lab Med 2000.
12. Menarini
- Aution Max AX-4030 Manual de Instruções. DOC. N.º OM-39095 REV. 0 03/08.
 - Aution Jet™ AJ-4270 manual de Operação. DOC. N.º OM-25078 REV. 9 07/08.
13. Nanosphere: www.nanosphere.us.
14. NCCLS - *Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens; approved guideline*, second edition, 2001.
15. Normas da Direcção Geral de Saúde (DGS):
- Actualização dos Critérios de Classificação e Diagnóstico da Diabetes Mellitus, Número 09/DGCG de 04/07/2002.
 - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, Número 002/2011 de 14/01/2011.
 - Diagnóstico e Conduta na Diabetes Gestacional, Número 007/2011 de 31/01/2011.
16. Ortho:
- <http://www.orthoclinical.com/en-gb/TechnicalDocuments/ClinicalLabProducts/Pages/default.aspx>.
17. Saudubray, JM & Charpentier, C-Clinical Phenotypes: Diagnosis / Algorithms. In: Scriver, CR, Beaudet, L., Sly, WS and Valle - *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, chapter 5, pp. 327-400, 1995.
http://www.ommbid.com/OMMBID/the_online_metabolic_and_molecular_bases_of_inherited_disease/b/abstract/part6/ch66.
18. Siemens: <http://healthcare.siemens.com>.

19. Tatiana Mitiko Kanashiro et al., *Identification of Respiratory Virus in Infants With Congenital Heart Disease by Comparison of Different Methods*, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 53(5):241-246, September-October, 2011.
20. Vacuette: www.gbo.com/preanalytics
- VACUETTE® Blood Collection System, Handling Recommendations, 980200 - Rev 11 07-2011.
21. Vitor Duque, João Vaz, Vanda Mota, Célia Morais, Saraiva da Cunha, António Meliço-Silvestre Meliço-Silvestre et al - *Clinical manifestations of pandemic (H1N1) 2009 in the ambulatory setting*, J Infect Dev Ctries 2011; 5(9):658-663.
22. Zschocke, Johannes, Hoffmann, Georg F. – *Vademecum Metabolicum, Manual de Pediatria Metabólica*, 2ª Edição. Brasil: Segmento Farma, 2007.

Anexo I – Equipamentos

Os LB dispõem de vários equipamentos:

- **VITROS® 5600 Integrated System, VITROS® 5,1 FS Chemistry System e VITROS® 350 Chemistry System** da Ortho Clinical Diagnostics – Autoanalísadores de Química Seca.



- **Dimension RXL® Chemistry Analyzer** da Siemens – Autoanalísador de Química Líquida.



- **GEM® Premier 3000** da Instrumentation Laboratory – Analisador de Gases no Sangue.



- **Aution MAX, SediMAX e Aution JET** da A. MENARINI Diagnostics – Sistemas de Urinálise.



- **Automated Glycohemoglobin Analyser HLC-723G8** da TOSOH – Hemoglobinas glicadas.



- **UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer com TMSPC 8** da Shimadzu® Scientific Instruments – Espectrofotómetro com temperatura controlada.



- **Ultrospec 3000 UV / Visible Spectrophotometer** da Pharmacia Biotech.



- **VAPRO® 5520, Vapor Pressure Osmometer** da Wescor – Osmómetro.



- **3100 Sweat Check** da Wescor – Analisador de Condutividade do Suor.



- **Mini VIDAS®** da BioMérieux.



Anexo II – Valores de Referência

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
ACET	Acetaminofeno / Paracetamol	MicroSlide	Colorimetria. Aril acil amidase.	670 nm	10 - 200	Terapêutico* ¹	10 - 30	µg/ml
						Toxicidade possível* ¹	150 - 200	
						Toxicidade provável* ¹	>200	
ALB	Albumina	MicroSlide	Espectrofotometria. Verde de Bromocresol	630 nm	100 - 60	Adulto	35 -50	g/L
ALC	Alcool / Etanol	MicroSlide	Álcool desidrogenase, tampão Tris pH 8,75.	340 nm	0,1 - 3,6	Negativo	< 0,1	g/L
						Tóxico	0,5 - 1,0	
						Depressão do SNC	> 1,0	
ALKP	Fosfatase alcalina	MicroSlide	Cinética. p nitrofenil fosfato, AMP e sulfato de magnésio (SFBC)	400 nm	20 - 1500	Adulto	38 - 126	U/L
ALT	Alanina aminotransferase	MicroSlide	Cinética. L-alanina + α-cetoglutarato, PLP, NAD/NADH, tampão Tris pH 8	340 nm	6 - 1000	Adulto	13 - 69	U/L
						Feminino	9 - 52	
						Masculino	21 - 72	
AMON	Amónia	MicroSlide	Espectrofotometria. Azul de Bromocresol	600 nm	8,7 - 500	Adulto	9 - 30	µmol/L
AMYL	Amilase	MicroSlide	Cinética 2 pontos. Substrato = amilopectina pH 7,2.	540 nm	30 - 1200	Adulto	30 - 110	U/L
						Criança		
						Urina		

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
AST	Aspartato aminotransferase	MicroSlide	Cinética. L-aspartato + α -cetoglutarato, PLP, acetoacetato descarboxilase, piruvato oxidase, peroxidase.	670 nm	3,0 - 750,0	Adulto	15 - 46	U/L
						Feminino	14 - 36	
						Masculino	17 - 59	
Bu	Bilirrubina não conjugada	MicroSlide	Colorimetria em ponto final a dois comprimentos de onda. Cafeína, benzoato de sódio em meio alcalino (pH 8). Espectrofotometria directa.	400 e 460 nm	0 - 462	Adulto	0 - 19	μ mol/L
						Recém-nascido	10 - 180	
Bc	Bilirrubina conjugada	MicroSlide	Colorimetria em ponto final a dois comprimentos de onda. Cafeína, benzoato de sódio em meio alcalino (pH 8). Espectrofotometria directa.	400 e 460 nm	0 - 462	Adulto	0 - 5	μ mol/L
						Recém-nascido	0 - 10	
BUN / UREA	Ureia	MicroSlide	Espectrofotometria. Urease, membrana semi-permeável a NH ₃ , pH 8.	670 nm	0,71 - 42,83	Feminino	2,5 - 6,1	mmol/L
						Masculino	3,2 - 7,1	
						23,91 - 899,39	Urina 24 horas	428 - 714

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
Ca	Cálcio	MicroSlide	Espectrofotometria. Arzenaso III	680 nm	0,25 - 3,49	Adulto	2,10 - 2,55	mmol/L
					0,25 - 4,44	Sem Ca ²⁺ na dieta	0,13 - 1,00	
						Baixa a média ingestão de Ca ²⁺	1,25 - 3,75	
						Alta ingestão de Ca ²⁺	2,50 - 7,50	
CHE	Colinesterase	MicroSlide		400 nm	0,20 - 12,50	Feminino	4,65 - 10,44	U/mL = kU/L
						Masculino	5,9 - 12,22	
CHOL	Colesterol	MicroSlide	Espectrofotometria. Esterase-oxidase-peroxidase, cromogéneo fenólico	540 nm	1,29 - 8,40	Desejável	<5,2	mmol/L
						Fronteira elevado	5,2 - 6,2	
						Elevado	>6,2	
CK	Creatina Cinase	MicroSlide	Cinética. Creatinina fosfato + ADP pH 7, NAC, L-α GPO, peroxidase.	670 nm	20 - 1600	Feminino	30 - 135	U/L
						Masculino	55 - 170	
CKMB	Creatina Cinase MB	MicroSlide	Cinética. Inibição. Creatina fosfato + ADP pH 7, NAC, L-α GPO, peroxidase.	670 nm	2,7 - 300,0	% de CK-MB = CK-MB CK x 100		U/L

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
CK-MB	Creatina Cinase MB	MicroWell		Imunométrico	0,22 - 400	Soro	3,38	ng/mL
						Plasma de Heparina	2,37	
						Plasma de EDTA	2,03	
Cl ⁻	Cloreto	MicroSlide	Potenciometria directa. Eléctrodo selectivo.	Potenciometria	50,0 - 175,0	Adulto	98 - 107	mmol/L
CRBM	Carbamazepina	MicroSlide		670 nm	3,0 - 20,0	4,0 - 12,0		µg/mL
CREA	Creatinina	MicroSlide	Cinético 2 pontos. Técnica enzimática, creatinina amidohidrolase, sarcosina.	670 nm	4 - 1238 µmol/L	Masculino (soro ou plasma)	71 - 133	µmol/L
						Feminino (soro ou plasma)	62 - 106	
					84 - 30639 µmol/L	Urina 24 horas	7000 - 25000 µmol/dia	
CRP	Proteína C reactiva	MicroSlide	Imunoenzimático cinético 2 pontos. Anticorpos monoclonais anti-CRP, fosforilcolina, CaCl ₂ .	670 nm	0,5 - 9,00 mg/dL	< 1,0		mg/dL

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
dHDL	Colesterol HDL directo	MicroSlide	Espectrofotometria. Sulfato de dextrano (50 000MW) e MgCl, Esterase-oxidase-peroxidase. Cromogéneo fenólico.	670 nm	0,13 - 2,84	Baixo	<1,03	mmol/L
						Alto	≥1,55	
dLDL	Colesterol LDL directo	MicroTip		600 nm	0,78 - 9,05	Ideal	< 2,59	mmol/L
						Próximo e acima de Ideal	2,59 - 3,34	
						Fronteira elevado	3,36 - 4,11	
						Alta	4,11 - 4,89	
						Muito Elevada	> 4,91	
GENT	Gentamicina	MicroTip		340 nm	0,60 - 10,00	Terapêutica mínima (Infec. menos graves)	< 1,00	µg/mL
						Terapêutica mínima (Infec. potencialmente fatais)	< 2,00	
						Tóxica - Mínima	≥ 2,00	
						Terapêutica - Pico (Infec. menos graves)	5,00 - 8,00	
						Terapêutica - Pico (Infec. potencialmente fatais)	8,00 - 12,00	
						Tóxica - Pico	> 12,00	

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
PHOS	Fósforo	MicroSlide	Espectrofotometria. Redução de fosfomolibdato de amónia	670 nm	0,16 - 4,20	Soro e Plasma	0,81 - 1,45	mmol/L
					1,78 - 46,17	Urina 24 Horas	12,9 - 42,0	
PHYT	Fenitoína	MicroSlide	Imunoenzimático cinético 2 pontos. Anticorpos anti-fenitoína.	670 nm	3,00 - 40,00	Intervalo Terapêutico	10,0 - 20,0	µg/mL
PROT	Proteína no LCR	MicroSlide	Espectrofotometria. Biureto modificado, LiOH, fenilazo piridinol.	670 nm	10 - 300	12 - 60		mg/dL
TBIL	Bilirrubina total	MicroSlide	Sal diazotado, difilina, difenil diazónio.	540 e 460 nm	1,7 - 461,7	3 - 22		µmol/L
THEO	Teofilina	MicroSlide	Cinética 2 pontos. Inibição enzimática, PNPP e PAL de boi, Mg ²⁺ .	400 nm	1,00 - 40,00	10,0 - 20,0		µg/mL
TP	Proteínas totais	MicroSlide	Espectrofotometria. Biureto.	540 nm	20,0 - 110,0	63 - 82		g/L
TRIG	Triglicerídeos	MicroSlide	Espectrofotometria. Técnica enzimática: glicerol-fosfato oxidase (PAP).	540 nm	0,11 - 5,93	Normal	< 1,69	mmol/L
						Fronteira elevado	1,69 - 2,25	
						Elevado	2,26 - 5,64	
						Muito Elevado	≥ 5,65	

ABREV	Nome do teste	Método	Princípio	CDO	Intervalo Dinâmico	Intervalo de Referência ou cutoff sugerido		UNID
UPRO	Proteínas da urina	MicroSlide	Espectrofotometria. Violeta de pirocatenol (próximo do vermelho de pirogalol).	670 nm	5 - 200	Aleatório	< 12	mg/dL
						24 horas	42 - 255	mg/dia
URIC	Ácido Úrico	MicroSlide	Espectrofotometria. Técnica enzimática: uricase, peroxidase-cromogéneo com ascorbato oxidase	670 nm	29,7 - 1101,2	Masculino (soro ou plasma)	208 - 506	µmol/L
						Feminino (soro ou plasma)	149 - 369	
					327,1 - 11122,8	Urina 24 horas	1480 - 4430	µmol/dia
VALP	Valproato	MicroTip	Imunocinético 2 pontos.	340 nm	10 - 150	Mínima	50,0	µg/mL
						Terapêutico	50,0 - 120,0	
						Possivelmente tóxico	> 100,0	
						Gravemente tóxico	> 200,0	
VANC	Vancomicina	MicroTip	Imunocinético 2 pontos.	340 nm	5,00 - 50,00	Terapêutica (Mínima)	5,00 - 10,00	µg/mL
						Tóxica (Pico)	> 40,00	

*1 = valor 4 horas após administração

Tecnologia Vitros

O Sistema Vitros[®], denominado comumente como “Química Seca”, utiliza as tecnologias MicroSlide, MicroTip, Intellicheck[®] MicroSensor e MicroWell.

Tecnologia MicroSlide[™] – O início da tecnologia VITROS[®] é o MicroSlide[™], método de química seca, baseado no doseamento totalmente integrado num slide. O MicroSlide é composto por múltiplas camadas de lâminas secas. O equipamento dispensa a amostra na camada de difusão porosa. O analito difunde através desta e reage, ao longo das camadas de lâminas subjacentes com os reagentes presentes e característicos de cada reacção, originando-se o produto final, mensurável por espectrofotometria de reflectância (**Fig.1**).

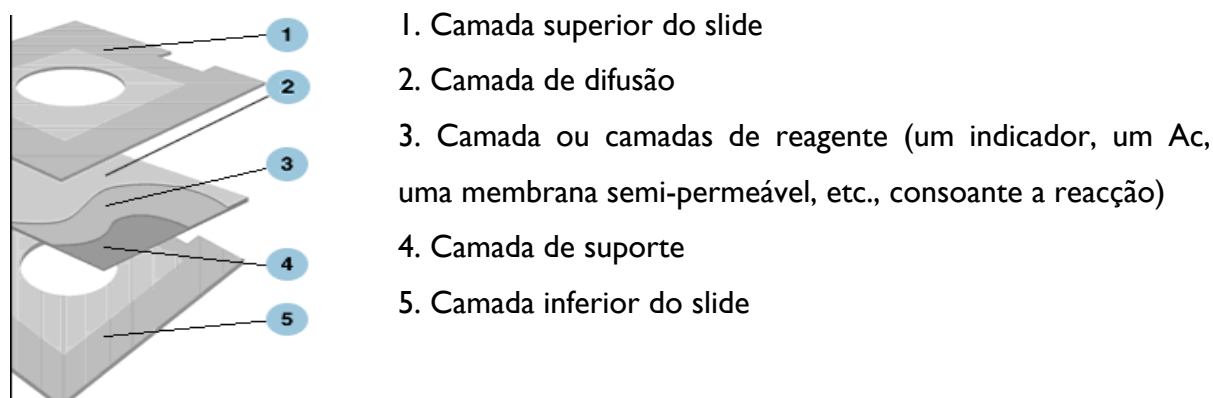


Fig.1 – Técnica MicroSlide

Tecnologia MicroTip[™] - Foi desenvolvida com o intuito de alargar as determinações analíticas aos fármacos e ao Colesterol-LDL. Utiliza reagentes líquidos, prontos a usar.

Tecnologia Intellicheck[®] - Foi desenvolvida para proporcionar uma redução significativa dos erros analíticos. Monitoriza, analisa e documenta as verificações realizadas na amostra e no ensaio. Relativamente à integridade da amostra aplica o “SMART Metering” (detecta a presença de bolhas e coágulos, não utilizando amostra neste caso) e o MicroSensor que assinala e quantifica as interferências mais comuns (hemólise, turbidez e icterícia).

Tecnologia MicroWell[™] - (apenas presente no Vitros 5600 do HG) - Foi desenvolvida para aumentar a sensibilidade e precisão dos imunoensaios utilizando um processo de

revestimento exclusivo que permite aumentar as capacidades de ligação. A embalagem do reagente tem duas divisões, não comunicantes. Cada divisão tem um reagente (Reagente 1 e Reagente 2). O reagente 1 é um tampão de diluição e o reagente 2 contém anticorpos específicos acoplados a micropartículas de látex. Estes são adicionados sequencialmente à amostra ocorrendo uma reacção imunoquímica com formação de complexos de Antígeno – Anticorpo e consequente alteração na turvação. Esta é mensurável espectrofotometricamente (quimioluminescência).

Metodologia Aplicada

I. MicroSlide

I.1. Colorimetria

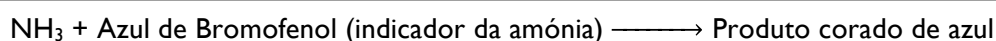
a) Colorimétrico

Analitos: Albumina, Amónia, Cálcio, Fósforo, Magnésio, Proteínas séricas totais, Urinárias e do LCR.

Princípio do Método:

Amónia: A amostra (10 µL) é colocada no slide e distribuída uniformemente pela camada de difusão para as camadas subjacentes. A água e os componentes não proteicos migram para a camada de reagente com tampão e os iões de amónia são convertidos em amónia gasosa. A membrana semi-permeável (camada abaixo da de reagente) permite apenas a passagem da amónia, evitando que o tampão alcance a camada indicadora. Após o período de incubação (5 minutos a 37°C), a densidade do reflexo do corante é medida a 600nm.

Exemplo de Reacção:



b) Colorimétrico de Ponto Final

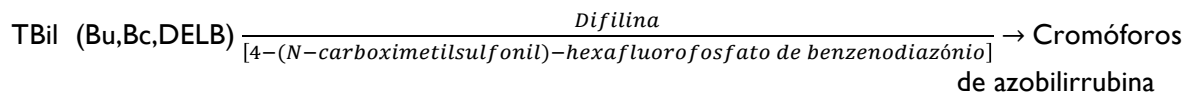
Analitos: Bilirrubinas Total, Conjugada e Não Conjugada.

Princípio do Método:

Bilirrubina Total: Reacção diazo clássica modificada e leitura a duplo comprimento de onda.

O método utiliza difilina para dissociar a bilirrubina não conjugada da albumina. A Bu, a Bc e a BDEL reagem subsequentemente com o sal de diazónio para formar cromóforos de azobilirrubina, medidos a 540 nm e a 460 nm. A medição da reflectância a 460 nm corrige as interferências espectrais.

Exemplo de Reacção:



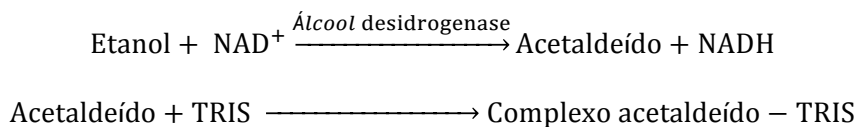
c) Associado a uma Reacção Enzimática de Ponto Fixo:

Analitos: Acetaminofeno (Paracetamol), Ácido Úrico, Colesterol Total e HDL, Etanol, Glicose, Lactato, Triglicerídeos, Ureia.

Princípio do Método:

Etanol: O etanol presente na amostra (10µl) é oxidado pela álcool-desidrogenase (ADH) em acetaldeído, enquanto a coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) é transformada na sua forma reduzida (NADH). A formação de NADH, medida a 340 nm, é directamente proporcional à concentração de etanol presente na amostra. O tampão, Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), existente nas camadas de reacção capta o acetaldeído para que não ocorra a reacção inversa.

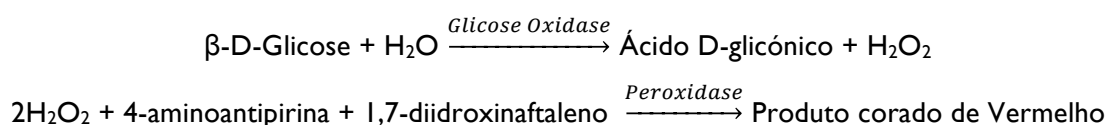
Exemplo de Reacção:



Glicose: Método da glicose oxidase.

A oxidação da glicose presente na amostra (10 µL) é catalisada pela glicose oxidase para formar peróxido de hidrogénio e ácido glicónico. A adição, da enzima peroxidase e de um aceitador de oxigénio cromogéneo, resulta na formação de um composto corado, cuja intensidade é medida a 540 nm.

Exemplo de Reacção:



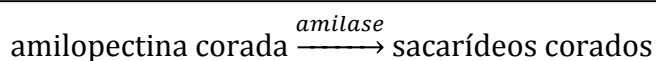
d) Associado a uma Reacção Enzimática de 2 Pontos:

Analitos: Amilase, Creatinina, Lipase, Teofilina.

Princípio do Método:

Amilase: A camada de difusão do slide contém o substrato de amido corado (corante ligado por covalência à amilopectina). A amilase presente na amostra catalisa a hidrólise do amido corado em sacarídeos corados. A densidade do reflexo dos sacarídeos corados na camada de reagente é medida por espectrofotometria de reflectância aos 2,3 e aos 5 minutos. A diferença, na densidade do reflexo do slide entre as duas leituras a 540 nm, é proporcional à actividade da amilase da amostra.

Exemplo de Reacção:



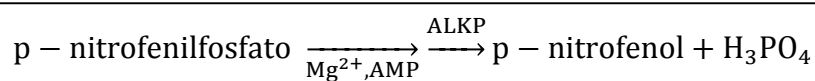
e) Associado a uma Reacção Enzimática de Pontos Múltiplos:

Analitos: Enzimas (ALKP, ALT, AST, CK, CK-MB, Colinesterase, GGT, LDH).

Princípio do Método:

Fosfatase alcalina (ALKP): A ALKP da amostra catalisa, em meio alcalino, a hidrólise do p-nitrofenilfosfato (presente na camada de difusão) a p-nitrofenol. O p-nitrofenol difunde-se na camada subjacente e é monitorizado por espectrofotometria de reflectância a 400 nm. A taxa de alteração da densidade do reflexo é convertida em actividade enzimática.

Exemplo de Reacção:



I.2. Imunocinética:

a) De Ponto Fixo:

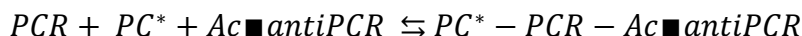
Analitos: Proteína C Reactiva.

Princípio do Método:

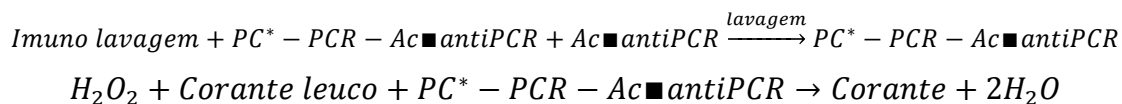
Este imunoensaio enzimático heterogéneo em sanduíche, utiliza um derivado da fosforilcolina (PC*) e um anticorpo anti-PCR (Ac-anti-PCR) conjugado com peroxidase. A reacção decorre em duas etapas. Na 1ª, a PCR presente na amostra (11 µL) liga ao PC* e ao Ac-anti-PCR com formação de um complexo insolúvel. Na 2ª, é realizada uma lavagem (para remover todo o material não ligado), adicionado o peróxido de hidrogénio necessário à oxidação do corante leuco (reacção mediada pela peroxidase presente no complexo) e realizada a leitura (densidade do reflexo) a 670 nm que é directamente proporcional à concentração da PCR presente na amostra.

Exemplo de Reacção:

1ª



2ª



b) De Pontos Múltiplos (Competitiva Enzimática):

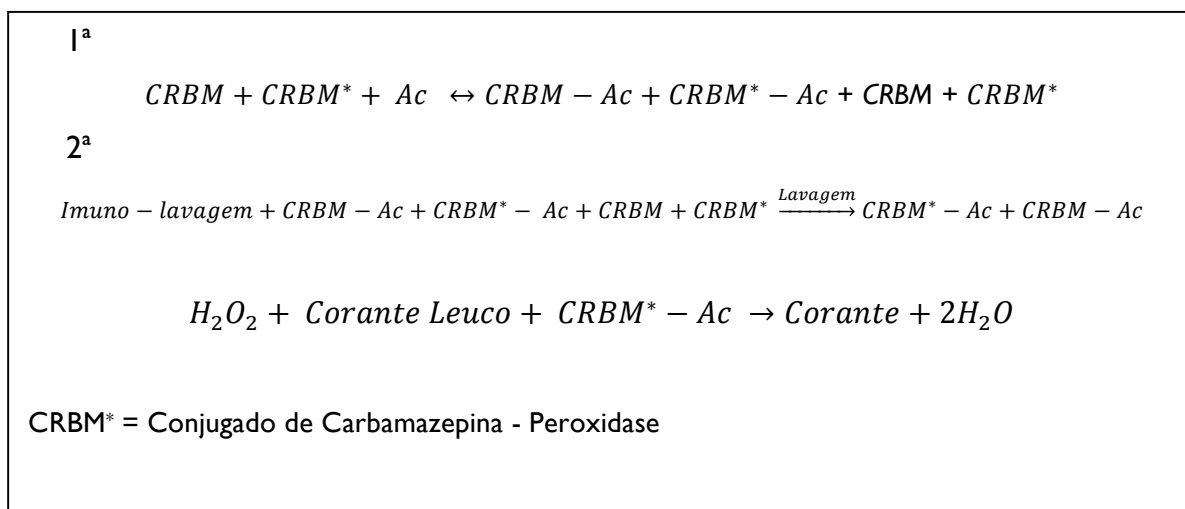
Analitos: Carbamazepina, Fenobarbital, Fenitoína e Digoxina.

Princípio do Método:

Carbamazepina (CRBM): Este imunoensaio competitivo enzimático utiliza um Ac anti-CRBM imobilizado e o conjugado de CRBM-peroxidase presentes na camada de difusão. A CRBM da amostra compete com o conjugado de CRBM-peroxidase para os locais de ligação do Ac (em número limitado) durante a Incubação I. A adição subsequente da solução de lavagem ao slide elimina o conjugado de CRBM-peroxidase não ligado da área de leitura, fornecendo simultaneamente um substrato para a oxidação do corante leuco, mediada por uma enzima. A taxa de formação do produto final corado, realizada por espectrofotometria

de reflectância a 670 nm, é inversamente proporcional à concentração do fármaco na amostra:

Exemplo de Reacção:



2. MicroTip

2.1. Colorimetria: Associado a uma Reacção Enzimática de Ponto Final:

Analitos: Colesterol LDL.

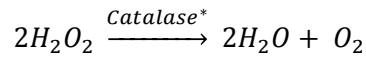
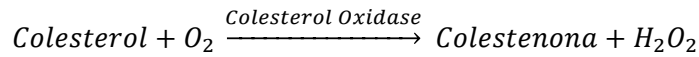
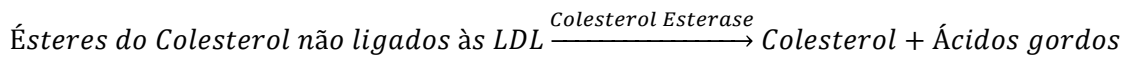
Princípio do Método:

A sua quantificação decorre em duas etapas. Na primeira com a adição do reagente 1, o colesterol não ligado às LDL (HDL, VLDL e Quilomícrons) é eliminado selectivamente através de uma reacção com a colesterol esterase e a colesterol oxidase, para formar colesterona e peróxido de hidrogénio. O peróxido produzido é imediatamente sequestrado pela catalase.

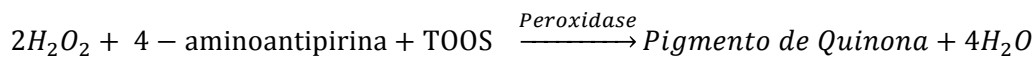
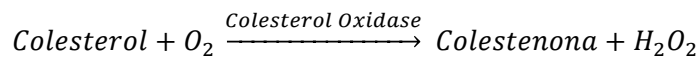
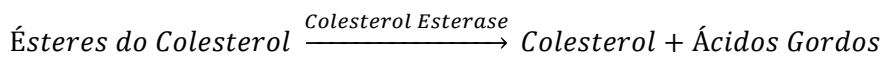
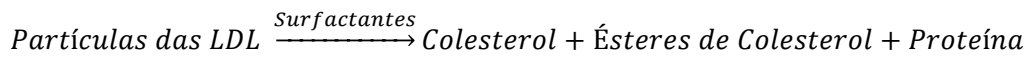
A adição do reagente 2 inicia a segunda etapa, na qual a catalase é imediatamente inactivada pela azida de sódio. Na presença de surfactantes, ocorre a dissociação do colesterol e dos ésteres do colesterol das partículas das LDL, e ocorrem as reacções enzimáticas catalisadas pela colesterol esterase e pela colesterol oxidase. O peróxido reage com o sistema de corante (TOOS e 4-aminoantipirina) na presença da peroxidase com formação de um produto corado, medido por espectrofotometria a 600 nm.

Exemplo de Reacção:

Etapa 1: adição de R1 – Eliminação de Colesterol dos quilomicrons, VLDL e HDL



Etapa 2: Adição de R2 – Medição específica de LDLC



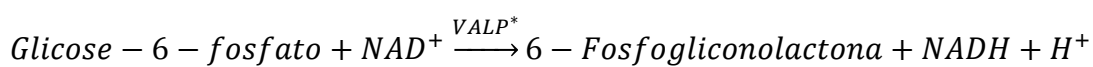
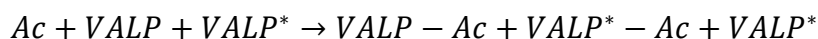
2.2. Imunocinética: de Dois Pontos:

Analitos: Ácido Valpróico, Gentamicina e Vancomicina.

Princípio do Método: Imunoensaio competitivo enzimático

Ácido Valpróico (VALP): O ensaio baseia-se na competição entre o VALP da amostra e o VALP marcado com Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), para os locais de ligação do Ac reactivo ao VALP. São adicionados sequencialmente o Reagente 1 que contém Ac-anti-VALP, G6P e NAD^+ e o Reagente 2 que contém VALP marcado com a G6PD. A actividade da G6P-DH diminui após a ligação ao anticorpo. A concentração do fármaco na amostra é medida em termos da actividade enzimática da G6PD, que converte o NAD^+ em NADH, resultando numa variação da absorvância medida por espectrofotometria a 340 nm.

Exemplo de Reacção:



VALP^* = Conjugado de Ácido Valpróico/Glicose-6-fosfato

3. MicroWell (Imunoensaio Enzimático)

3.1. Turbidimetria: de dois Pontos:

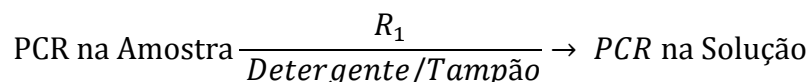
Analitos: Proteína C Reactiva de Alta Sensibilidade (*hsPCR*).

Princípio do Método:

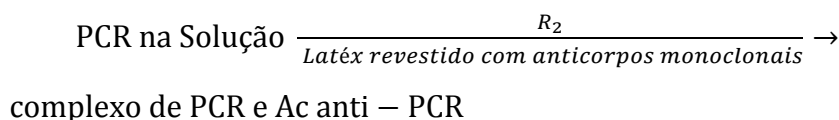
A amostra (16 µL), calibradores e controlos são misturados com o Reagente 1, que contém um tampão. Com a adição de anticorpos anti-PCR acoplados a micropartículas de látex (Reagente 2) dá-se a aglutinação (reacção imunoquímica com formação de complexos de antígeno/anticorpo de PCR). A turvação é medida espectrofotometricamente a 660 nm.

Exemplo de Reacção:

Etapa 1: Diluição da amostra



Etapa 2: Formação do Complexo Antígeno-Anticorpo



3.2. Quimioluminescência: Imunométrico:

Analitos: Mioglobina, Troponina, Peptídeo Natriurético Cerebral (pro-BNP).

Princípio do Método:

A Troponina, a Mioglobina e o NT-proBNP são quantificados, apenas no H.G., no Sistema Vitros pela Técnica de Microwell (Imunodiagnóstico). A metodologia aplicada é um imunoensaio enzimático imunométrico, que começa com a formação de um complexo antígeno-anticorpo tipo *sandwich*, seguindo-se uma reacção enzimática de substratos luminogénicos, com produção de luz. Os sinais luminosos são detectados, sendo a sua intensidade proporcional à concentração do marcador cardíaco em questão.

Anexo IV – Manual de Colheitas para Doseamento de Fármacos

Os factores farmacocinéticos influenciam a hora correcta de colheita da amostra, após a última administração do fármaco.

Estes factores incluem:

- Forma farmacêutica;
- Modo de administração;
- Terapêutica medicamentosa concomitante;
- Variações biológicas.

As condições do estado de equilíbrio são atingidas após 4/5 semi-vidas num regime posológico inalterado; a monitorização dos níveis mínimos do fármaco começará depois do estado de equilíbrio ser atingido.

Só é aceitável um tempo de colheita aleatório, na necessidade urgente de confirmação de toxicidade.

É necessário:

- Registrar a informação imprescindível à interpretação do doseamento pedido;
- Que os tubos de colheita estejam inequivocamente identificados relativamente ao dia/hora de colheita e dia/hora da última toma;
- Efectuar a colheita em catéter periférico onde não esteja a ser administrado o fármaco;
- As amostras devem dar entrada no Laboratório até 2 horas após a colheita. Se tal não acontecer, estas devem ser centrifugadas, separadas e refrigeradas (2-8°C).

IMUNOSSUPRESSORES, ANTIMETABÓLITO/ANTINEOPLÁSICO:

FÁRMACO	TEMPOS DE COLHEITA	AMOSTRA	INFORMAÇÕES ADICIONAIS
Ciclosporina	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma C2: • 2 horas após a toma	Sangue total em EDTA	Motivo do pedido (intoxicação, monitorização, novo tratamento)
Tacrolimus	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma	Sangue total em EDTA	Motivo do pedido (intoxicação, monitorização, novo tratamento)

Metotrexato	C24: • 24h após perfusão C48: • 48h após perfusão C72: • 72h após perfusão	Soro ou plasma (heparina). Proteger da luz	
-------------	---	---	--

LÍLIO:

FÁRMACO	TEMPOS DE COLHEITA	AMOSTRA	INFORMAÇÕES ADICIONAIS
Lítio	C mínima: • 12h após a toma da última dose ou até 60 minutos antes da toma	Soro ou plasma (EDTA)	

ANTIEPILÉPTICOS:

FÁRMACO	TEMPOS DE COLHEITA	AMOSTRA	INFORMAÇÕES ADICIONAIS
Ácido Valpróico	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma Pelo menos 12h após a última toma	Soro ou plasma (heparina)	
Carbamazepina	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma	Soro ou plasma (heparina)	
Fenobarbital	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma	Soro ou plasma (heparina)	
Fenitoína	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma	Soro ou plasma (heparina)	Estar há pelo menos 2 dias com dosagem estável da medicação

ACETAMINOFENO, DIGOXINA, TEOFILINA:

Acetaminofeno	C4: • 4 horas após a ingestão Caso não se conheça a hora de ingestão, colher 2 ou mais amostras em intervalos de 3 horas	Soro ou plasma (heparina)	
Digoxina	C mínima: • 0 – 60 minutos antes da toma C máxima: • 6-8 horas após a última toma	Soro ou plasma (heparina)	

Teofilina	<p>C mínima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0 – 60 minutos antes da toma <p>C máxima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 - 4 horas após dose IV 	Soro ou plasma (heparina)	
-----------	---	---------------------------	--

ANTIBIÓTICOS (VANCOMICINA, GENTAMICINA e AMICACINA):

FÁRMACO	TEMPOS DE COLHEITA	AMOSTRA	INFORMAÇÕES ADICIONAIS
Vancomicina	<p>C mínima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0 - 30 minutos antes da próxima dose <p>C máxima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 60 - 120 minutos após perfusão intravenosa 	<p>Soro ou plasma (EDTA)</p> <p>Proteger da luz</p>	
Gentamicina	<p>C mínima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0 - 30 minutos antes próxima dose <p>C máxima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 60 - 120 minutos após perfusão intravenosa 	Soro ou plasma (heparina)	<p>A monitorização da conc. mínima e máxima em tratamento convencional deve ser iniciada depois de alcançado o estado de equilíbrio (após 3 - 4 doses)</p> <p>Quando utilizados nomogramas de administração intermitente (pulse-dosing), colher amostra 8 - 12h após fim da perfusão.</p>
Amicacina	<p>C mínima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0 - 30 minutos antes da administração da dose seguinte <p>C máxima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 60 minutos após administração IM ou 30 / 60 minutos após perfusão intravenosa de 30 / 60 minutos, respectivamente. 	Soro ou plasma (EDTA)	

I. Análise Sumária de Urina ou Urianálise

A urianálise compreende o exame macroscópico, químico e microscópico da urina.

O exame macroscópico:

É importante porque pode revelar desvios à normalidade relativamente à côr (amarela), turvação (transparente) e cheiro.

A urina pode apresentar alterações na côr, reflexo de causas endógenas (estado de concentração, presença de cristais de ácido úrico, de hemoglobina, de mioglobina, de bilirrubina ou de ácido homogentísico) e exógenas (pigmentos alimentares, drogas e fármacos). A côr varia desde o incolor, branco, amarelo (palha, alaranjado), rosa, vermelho, castanho e preto.

A turvação tem origem, frequentemente, na presença de um grande número de células epiteliais de escamação de origem vaginal, de leucócitos, de bactérias e de fosfatos ou uratos amorfos.

O exame microscópico do sedimento:

É qualitativo e quantitativo. Revela a presença de células (eritrócitos, leucócitos e de células epiteliais de escamação renais ou do tracto urinário), de cilindros, de cristais, de bactérias e de leveduras.

É realizado na presença do relatório emitido pelo autoanalisador porque o seu conhecimento ajuda a direccionar o exame do sedimento urinário, reduzindo o número de resultados falsos negativos ou falsos positivos.

Há valores de pH e de densidade da amostra que influenciam o resultado:

- Valores de pH elevados ($\text{pH} > 7.0$) provocam a lise celular, apresentando-se os leucócitos sobreviventes mais pequenos e os cilindros em número reduzido, e favorecem a precipitação de fosfatos. Valores baixos favorecem a precipitação de uratos;
- Um valor de densidade baixa (< 1.010) promove a lise considerável dos eritrócitos e dos leucócitos, que incham, no caso de valores elevados, os eritrócitos e os leucócitos ficam mais pequenos o que dificulta a sua identificação;

- No caso de um resultado negativo, no relatório, para hemoglobina, leucócitos, nitritos ou proteína (albumina) há uma grande probabilidade de ter associado um exame microscópico negativo; enquanto um resultado positivo, para um ou mais destes analitos, orienta o exame microscópico para a procura de eritrócitos, leucócitos, bactérias ou cilindros.

Princípio do Método:

Todas as fases do processo analítico são determinantes no resultado final:

Amostra: urina fresca em frasco estéril.

Colheita: Após lavagem com água, colher o jacto médio (rejeitar a primeira porção que pode estar contaminada com elementos celulares e bactérias provenientes da zona genital). No caso das mulheres, não efectuar a recolha durante a menstruação. Em crianças é frequente o uso de saco colector (evitar a contaminação fecal); a recolha por cateter (pode causar eritrocitúria) ou punção suprapúbica também é utilizada.

Conservação: A amostra deve ser processada no espaço máximo de 3 horas após a colheita. Se necessário conservar a 2°C – 8°C até processamento (pode ocorrer a precipitação de uratos e fosfatos).

Análise: Homogeneizar a amostra (a formação de espuma é indicativa da presença de proteína), retirar uma alíquota de 10 ml/15 ml e colocar no autoanalisador. Depois de analisada e de emitido o relatório, centrifugar a 400g durante 10 minutos. Rejeitar o sobrenadante ficando com cerca de 0,5 ml de concentrado; homogeneizar, suavemente, com pipeta Pasteur até suspensão completa do sedimento e transferir 1 gota (cerca de 50µL) para lâmina, cobrir com lamela e observar ao microscópio. Utiliza-se um microscópio de contraste de fase, equipado com duas objectivas (×10 e ×40) e a binocular ×10. Inicia-se com a pequena ampliação e prossegue-se com a grande ampliação. Percorrem-se, em média, 10/20 campos.

Interferentes: Exercício físico violento (pode causar hematúria e cilindúria); diurese excessiva (na urina diluída muitos dos elementos encontram-se em número reduzido), lavagem com desinfectantes (favorece a lise das células).

Relatório final: Neste deverão ser referidos, além da cor e da turbidez, os analitos físico-químicos determinados pela tira - pH, densidade específica (SG), hemoglobina, esterase leucocitária, nitritos e proteína (albumina) - e a presença e quantificação (número médio/campo) das partículas microscópicas - eritrócitos, leucócitos, células

epiteliais (tubulares renais, de transição e escamosas), cilindros e seus subtipos, cristais, bactérias, leveduras.

2. Análise Microbiológica

O Uriline da Biomérieux, técnica de DipSlide permite a detecção, contagem e identificação presuntiva dos patogénicos urinários comuns.

Princípio do Método:

O Uriline consiste num tubo fechado, estéril, que contém uma lâmina com duas faces revestidas, cada uma, por um meio de cultura diferente. A face 1 está coberta por gelose CLED (coloração verde) a face 2 por gelose MacConkey (coloração avermelhada).

A gelose CLED permite o crescimento e contagem dos uropatogénios e a diferenciação entre fermentadores e não fermentadores da lactose. As bactérias lactose (+) originam colónias amarelas por acidificação do meio (viragem do indicador azul de bromotimol), enquanto as lactose (-) apresentam colónias verdes, azuis ou incolores.

A gelose de MacConkey permite o crescimento selectivo e a diferenciação das enterobactérias. Os microorganismos fermentadores da lactose, pela alteração de cor do indicador (vermelho neutro), apresentam colónias vermelhas, enquanto os não fermentadores da lactose originam colónias incolores ou beijas. A selectividade em relação a bactérias Gram (+) é feita pelos sais biliares.

A leitura consiste na estimativa da concentração bacteriana (por comparação da densidade das colónias presentes na gelose CLED e do esquema apresentado na bula do produto), e na avaliação de cultura (pura/polimicrobiana).

Na interpretação dos resultados é necessário, distinguir entre infecção e contaminação, e basearmo-nos nos critérios de positividade relativamente ao número de colónias (varia entre 10^2 U.F.C./mL e 10^5 U.F.C./mL) tendo em conta o tipo de colheita e a informação clínica. O LB Segue as *Guidelines* gerais para a interpretação de culturas de urina.

Amostra: urina obtida por colheita asséptica, seja por jacto, saco, cateterismo ou punção supra-púbica.

Anexo VI – Sequenciação genética de referência utilizada na identificação de vírus respiratórios, pelo sistema Verigene.

Strain	Gene sequence
Influenza A	
A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)	Segment 7
A/New Caledonia/20/1999(H1N1)	Matrix proteins M1, M2
A/Moscow/10/1999(H3N2)	Segment 7
A/Panama/2007/1999(H3N2)	Matrix proteins M1, M2
A/Fujian/411/2002(H3N2)	Matrix proteins M1, M2
A/Wyoming/3/2003(H3N2)	Matrix proteins M1, M2
A/Wisconsin/67/2005(H3N2)	Matrix proteins M1, M2
Influenza B	
B/Sichuan/379/1999	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Hong Kong/1434/2002	Segment 7
B/Hong Kong/330/2001	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Hong Kong/330/2001 egg adapted	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Hong Kong/330/2001	Segment 7
B/Shanghai/361/2002	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Jiangsu/10/2003	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Yamanashi/166/1998	Segment 7, Matrix protein M1, BM2 protein
B/Panama/45/1990	Segment 7, Matrix protein M1, BM2 protein
B/Lee/40	Segment 7, Matrix protein M1, BM2 protein
B/Lee/40 cold-adapted	Matrix protein M1, BM2 protein
B/Hong Kong/310/2004	Segment 7
B/Florida/02/2006	Segment 7
B/Egypt/2040/2004	Segment 7
RSV A	
RSV type A S2	Complete genome
RSV type A ATCC VR-26	Complete genome
RSV type A recombinant mutant rA2cp	Complete genome
RSV type A mutant cpts-248	Complete genome

RSV type A mutant cp-RSV	Complete genome
RSV type A mutant cpts-248/404	Complete genome
RSV B	
RSV type B 9320	Complete genome
RSV type B mutant cp52	Complete genome
RSV type B wild-type strain B1	Complete genome

Tabela 6 – Sequenciação genética de referência utilizada na identificação de vírus respiratórios, pelo sistema Verigene.