

Ana Rosa Fernandes Barreira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Silva e pelo Dr. Duarte Paiva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



Ana Rosa Fernandes Barreira

Relatório de Estágio

Laboratório de Análises Clínicas de São Lázaro

De Janeiro a Maio de 2016

Áreas: Microbiologia, Hematologia, Imunologia e Bioquímica

Orientador externo: Dr. Duarte Paiva

Orientador interno: Prof. Dr^a Ana Miguel Silva

Agradecimentos

À Direção Técnica do Laboratório de Análises Clínicas de São Lázaro, na pessoa do Dr. Duarte Paiva, que prontamente me recebeu para a realização deste estágio.

À Professora Doutora Ana Miguel Silva, pela completa disponibilidade e orientação na escrita deste relatório.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pela dedicação e apoio prestados ao longo de todo o tempo de estágio.

À Dr^a. Cristina Silva e ao Dr. Jaime Peliteiro, pelos conhecimentos transmitidos.

A todo o pessoal do laboratório.

Aos meus pais, pelo investimento e pelo apoio que sempre me deram ao longo destes anos de estudo.

Ao meu irmão, por ser o meu porto de abrigo e o meu melhor amigo.

Ao Nuno, que me acompanhou desde o início da minha vida académica e que sempre esteve presente para me ajudar em todos os momentos.

Às minhas meninas, Andrea Santos, Carolina Figueiredo, Isabel Mariz e Catarina Lopes, que me acompanharam ao longo desta aventura de dois anos em Coimbra.

Índice

Abreviaturas	VII
Resumo	IX
Abstract	X
Introdução	I
Fase Pré-Analítica	2
Fase Analítica	4
Microbiologia	4
Urocultura.....	4
Análise sumária de urina.....	5
Coprocultura e exame parasitológico de fezes.....	5
Culturas de outros produtos.....	8
Identificação e Antibiograma.....	10
Hematologia	11
Interpretação de Hemogramas.....	12
Histograma.....	13
Esfregaços sanguíneos.....	14
Velocidade de Sedimentação.....	15
Estudo da coagulação.....	16
Doseamento da Hemoglobina Glicada.....	17
Técnicas manuais em Hematologia.....	18
Bioquímica	20
Eletroforese de proteínas.....	21
Gasometria.....	22
Imunologia e Endocrinologia	23
<i>ImmunoCap 250</i>	24
Técnicas manuais em Serologia.....	25

Fase pós-analítica	30
Controlo de qualidade	30
Sistema de gestão de qualidade da empresa	30
Procedimentos de controlo internos	31
Avaliação externa da qualidade (AEQ).....	31
Conclusões	33
Bibliografia	34

Abreviaturas

- AEQ**_ Avaliação Externa da Qualidade
- APTT**_ *activated partial thromboplastin time* (tempo de tromboplastina parcialmente ativado)
- AR**_ Artrite Reumatóide
- CA 19.9**_ *cancer antigen 19-9*
- CA 125**_ *cancer antigen 125*
- CEA**_ *Carcinoembryonic Antigen* (Antigénio Carcino-Embriónico)
- CK**_ Creatina Quinase
- CLED**_ *cystine lactose eletrolyte deficient*
- CMI**_ Concentração Mínima Inibitória
- CMV**_ Citomegalovírus
- CQI**_ Controlo de Qualidade Interno
- CRP**_ *C-reactive protein* (Proteína C-Reativa)
- DGS**_ Direção Geral de Saúde
- EDTA**_ *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EN**_ *European Standard* (Norma Europeia)
- FSH**_ *Follicle-Stimulating Hormone* (Hormona Estimuladora do Folículo)
- HAV**_ Hepatite A Viral
- HCV**_ Hepatite C Viral
- HDL**_ *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)
- HIV**_ *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HPLC**_ *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
- H₂S**_ Sulfureto de Hidrogénio
- INR**_ *international normalized ratio* (razão normalizada internacional)
- INSA**_ Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
- ISE**_ *ion-selective electrode* (elétrodo seletivo de iões)
- ISO**_ *International Organization for Standardization*
- LDH**_ Lactato Desidrogenase
- LH**_ *Luteinizing Hormone* (Hormona Luteínizante)
- MALT**_ *mucosa-associated lymphoid tissue* (tecido linfoide associado à mucosa)
- MCDT**_ Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica
- MGUS**_ *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*
- NECAS**_ *National External Quality Assessment Service*
- NP**_ Norma Portuguesa

PLT-O_ canal ótico para contagem de plaquetas
PSA_ *Prostate Specific Antigen* (Antigénio Prostático Específico)
RICAS_ *Randox International Quality Assessment Scheme*
RF_ *Rheumatoid Factor* (Fator Reumatóide)
RNA_ *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
SEQC_ *Sociedad Española De Bioquímica Clínica Y Patología Molecular*
SS_ *Salmonella Shigella* Agár
TGO_ Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP_ Transaminase Glutâmico Pirúvica
TP_ tempo de protrombina
TPHA_ *Treponema pallidum Haemagglutination*
TSH_ *Thyroid-Stimulating Hormone* (Hormona Estimuladora da Tiróide)
TT_ tempo de trombina
T₃_ Triiodotironina
T₄_ Tiroxina
UFC_ Unidades Formadoras de Colónias
VDRL_ *Venereal Disease Research Laboratory*
WBC_ *white blood cells* (leucócitos)
β-HCG_ Fração β da Gonadotrofina Coriônica Humana

Resumo

Os meios complementares de diagnóstico e terapêutica (MCDT) é a designação genérica que engloba vários tipos de exames, entre os quais os laboratoriais, e a colheita de amostras por meios mais ou menos invasivos, realizados em regime ambulatorio ou hospitalar e que se revelam da maior importância para a atividade clínica, possibilitando o diagnóstico e a prescrição adequados a cada utente e a cada situação. Acompanhando a evolução científica e tecnológica, existe atualmente um leque cada vez mais diversificado e automatizado destes meios, o que se traduz numa economia de tempo e recursos extremamente importante na sociedade atual.

Este relatório descreve de forma sucinta a aplicação de alguns desses meios a nível clínico, em contexto real de laboratório. O trabalho apresentado foi desenvolvido ao longo de 5 meses, no Laboratório de Análises Clínicas de S.Lázaro em Braga, no âmbito do estágio final para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Serão abordadas genericamente as valências de Imunologia, Bioquímica, Microbiologia e Hematologia.

Abstract

The complementary methods of diagnosis assume a total relevance in clinical activity, enabling the diagnosis and the prescription suitable for every situation. Following the scientific and technological evolution there is, nowadays, a much more diversified and automatized set of these methods, which leads to a time and resource economy extremely important in current society.

This report describes, in a short way, the use of some of those methods in a real clinical laboratory context. The work submitted was developed for 5 months, at Laboratório de Análises Clínicas de S. Lázaro in Braga, within the final stage to obtain the master's degree in Clinical Analysis by the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

Will be generally discussed the fields of Immunology, Biochemistry, Microbiology and Hematology.

Introdução

O Laboratório de Análises Clínicas de S. Lázaro, dirigido pelo Dr. Duarte Paiva, é, desde Dezembro de 2001, certificado pela norma portuguesa e europeia NP EN ISO (*International Organization for Standardization*) 9001:2000. Como parte integrante de seu Sistema de Qualidade, o Laboratório além dos seus processos internos de controle de qualidade, tem os seus desempenhos nas diferentes áreas de atuação monitorizados permanentemente através da participação em programas de controle de qualidade externos com instituições nacionais e estrangeiras, entre as quais o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), a Labquality (Finlândia), NEQAS - *National External Quality Assessment Service*, RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme* (Reino Unido) e a SEQC - *Sociedad Española De Bioquímica Clínica Y Patología Molecular* (Espanha).

O laboratório encontra-se dividido em 3 setores:

- Setor administrativo: é suportado por um sistema informático (*segilac-Edeia*) para gestão do atendimento aos utentes do laboratório e postos, desde a integração dos dados analíticos à emissão dos boletins e faturação. O laboratório possui um total de 10 receções (2 no laboratório central e 8 nas unidades de colheita) distribuídas pelo distritos de Braga e Vila Real. As unidades de colheita encontram-se ligadas informaticamente com o laboratório central, permitindo o processamento célere dos dados administrativos e técnicos das amostras provenientes das mesmas.
- Setor de colheitas: existem 2 setores de colheitas no laboratório central, cada um deles com várias salas, e nas unidades de Real , Maximinos, Vieira do Minho, Vila Verde, Amares, Monsul, Póvoa de Lanhoso e Montalegre.
- Setor técnico: com um fluxo médio de 250 utentes por dia e ainda algumas amostras veterinárias, o Laboratório de Análises Clínicas de S. Lázaro conta com uma equipa multidisciplinar de Técnicos de Análises e Técnicos Superiores nas diferentes valências, em constante atualização e formação e é dotado de equipamentos analíticos de ultima geração.

Neste relatório serão aprofundados os processos relativos ao sector técnico, no âmbito das suas valências específicas: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia.

Fase Pré-Analítica

A realização dos exames laboratoriais abrange 3 etapas distintas: a pré-analítica, a analítica e a pós-analítica, sendo o principal objetivo assegurar uma articulação e coordenação entre as três, de modo a que a determinação da concentração ou atividade do analito no material biológico reflita a qualidade do desempenho prestado.

Durante esta primeira fase, a atenção para com o utente e o cuidado com os procedimentos para obtenção do material biológico são um modo de garantir a qualidade no laboratório.

1. Pedido de exame

O processo para a realização dos exames laboratoriais inicia-se com uma requisição de exame, elaborada de um modo geral em consulta médica, podendo no entanto o utente, se assim o desejar, efetuar uma requisição a título próprio. É conveniente que o clínico descreva corretamente o que solicita. O pedido deve ser o mais informativo possível, constituindo um auxílio no momento de realização do exame. Dado que a solicitação pelo médico tem como objetivo a confirmação ou rejeição de um diagnóstico ou obtenção de parâmetros para acompanhamento, os resultados corretos são extremamente importantes para a decisão adequada com vista à condução do tratamento.

2. Preparação do paciente

No momento que antecede a colheita, o paciente recebe todas as informações necessárias para a realização do exame pelo laboratório, nomeadamente do período de jejum que deverá seguir e outras orientações específicas necessárias para o exame a que será submetido. Essas orientações são fornecidas por escrito quando o paciente for o responsável pela colheita, ou facultadas verbalmente no caso de instruções simples. São recomendadas instruções escritas para exames como espermograma, provas hormonais funcionais, provas digestivas funcionais, entre outras.

3. Colheita

No momento da colheita, o técnico de análises deve sempre agir com cuidado e atenção, seguindo as diretrizes específicas de modo a diminuir os erros que podem

eventualmente ocorrer. A preparação e organização do material e equipamentos são de suma importância para o trabalho desenvolvido neste momento. As amostras depois de obtidas são transportadas e encaminhadas em tempo útil, de modo a não comprometer a sua qualidade e o resultado final.

4. Transporte

Após a colheita, as amostras são corretamente identificadas e armazenadas até ao seu processamento analítico. Se necessário o transporte, estas são acondicionadas em malas próprias, refrigeradas e transportadas em veículos adaptados, sendo a relação tempo/temperatura à qual o material é exposto rigorosamente controlada.

5. Preparação final

Imediatamente antes do processamento analítico, é efetuada novamente a verificação da qualidade das amostras, retração, centrifugação e aliquotagem quando necessário e distribuição final pelo setor analítico.

Fase Analítica

Microbiologia

O sector de Microbiologia/Bacteriologia é responsável por todos os processos analíticos associados ao estudo microbiológico das amostras, sendo estes observação microscópica de produtos biológicos como fezes, urina, exudatos vaginais e ureterais, expectoração, fluidos nasais, esperma ou aspirados/raspados; exames culturais dos mesmos e posterior identificação e antibiograma. São definidas diariamente listas de trabalho pelo Técnico Superior, em função das análises solicitadas, que são executadas pelo Técnico de Análises.

As análises bacteriológicas mais frequentemente efetuadas são as uroculturas, coproculturas, culturas de exsudatos vaginais, uretrais, expectoração, fluidos nasais ou esperma, bem como alguns testes rápidos de pesquisa de microrganismos específicos nestes produtos biológicos. Podem ainda ser realizadas pesquisas parasitológicas microscópicas, a fresco ou com coloração. Caso seja confirmada a presença do microrganismo, segue-se uma identificação e teste de suscetibilidade a antibióticos.

Urocultura

As infeções do trato urinário são das mais comuns em humanos, principalmente em mulheres. O acesso dos microrganismos pode dar-se por via ascendente, hematogénea ou linfática, sendo a ascendente a mais frequente. A infeção pode ser sintomática ou assintomática e é demonstrada pela bacteriúria. A presença de enterobactérias é a causa mais comum, no entanto podem ainda estar associados fungos como *Candida*, nomeadamente em pacientes algaliados ou com outras patologias do trato urinário.

Para o diagnóstico laboratorial deste tipo de infeções é realizada uma sementeira de urina em meio CLED (*cystine lactose electrolyte deficient*), com quantificação dos microrganismos presentes na urina (um resultado positivo é dado pelo isolamento de pelo menos 10^4 UFC - unidades formadoras de colónias, salvo número inferior a valorizar pela clínica), e uma análise sumária (Urina Tipo II) que verifica a presença ou ausência de determinados parâmetros químicos e bioquímicos, bem como o estudo do sedimento urinário.

O laboratório define critérios específicos para a colheita e transporte, de modo a evitar contaminações. Em casos particulares podem ser recolhidos sacos coletores de urina, amostras cateterizadas ou a partir de aspiração supra-púbica.

Análise sumária de urina

Inclui o exame físico, químico e microscópico da urina, a partir do qual é possível o rastreio de bacteriúria assintomática, proteinúria e/ou hematuria e inclui a avaliação dos seguintes parâmetros: densidade, pH, presença de leucócitos, nitritos, sangue, proteínas, glucose, ácido ascórbico, cetonas, urobilinogénio e bilirrubina. Pode ser realizado por técnica manual, através de tiras de teste (*Combur10 Test-® Roche*) ou pelo analisador automático *CLINITEK Novus* (Siemens) (fig 1-a). Conjuntamente, são ainda avaliados outros parâmetros como a presença de bactérias, cristais, cilindros, leucócitos, células epiteliais e eritrócitos pelo *UF-1000i* (sysmex). (fig 1-b) Se as amostras revelarem parâmetros anormais ou discordantes entre si são submetidas a uma análise microscópica de sedimento confirmatória e conclusiva.



Fig. 1-a: Analisador automático *CLINITEK Novus* (Siemens)



Fig. 1-b: *UF-1000i* (sysmex)

Faz ainda parte dos procedimentos do laboratório a realização de testes como o imunológico de gravidez e despiste de drogas de abuso, tanto a partir de 1^{as} amostras como de urinas de 24 horas, por recurso a *kits* de ensaio imunocromatográfico.

Coprocultura e exame parasitológico de fezes

O diagnóstico das infeções gastrointestinais pode ser realizado a partir de culturas, testes rápidos ou exame parasitológico de amostras de fezes.

Para uma coprocultura é utilizada uma amostra de fezes, inoculada em dois meios: SS (*Salmonella Shigella* Agár) e Hektoen (meios seletivos e de diferenciação destinados à pesquisa de espécies de *Shigella* e *Salmonella*) e caldo Selenito F (destinado ao enriquecimento de *Salmonella* a partir de fezes. Após a etapa de enriquecimento, o caldo selenito é repicado novamente para os meios destinados à detecção das *Salmonella*).

- Gelose Hektoen: os microrganismos que fermentam um dos 3 açúcares contidos no meio originam colônia amarelas a amarelas salmão, os restantes colônias azuis a azuis esverdeadas. Os microrganismos que produzem H₂S (sulfureto de hidrogênio) originam colônias com centro negro. A presença de colônias verdes a azuis esverdeadas com ou sem centro negro (colônias características) é presuntiva de *Salmonella* ou *Shigella*. Para confirmação segue-se o processo de identificação e antibiograma. A inibição de microrganismos gram positivo é obtida por uma mistura de sais biliares e corantes.

- Gelose SS: o meio permite evidenciar colônias que fermentam a lactose e reduzem o tiussulfato. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colônias rosa, os outros colônias incolores. Os microrganismos que produzem H₂S originam colônias com centro negro. A presença de colônias incolores ou fracamente coloridas com ou sem centro negro é presuntiva de *Salmonella* ou *Shigella*. Para confirmação, segue-se o processo de identificação e antibiograma.

O exame parasitológico é realizado de forma macroscópica, com observação direta dos parasitas (incluindo larvas e fragmentos) ou microscópica direta, a partir de uma preparação a fresco entre lâmina e lamela ou após concentração. Através de um exame microscópico direto minucioso é possível encontrar grande parte dos parasitas intestinais, nomeadamente quistos de protozoários ou ovos de helmintas.

A colheita de fezes para exame parasitológico deve ser efetuada para um recipiente descartável em 3 dias consecutivos, sem misturar as amostras. É aconselhada a colheita em 3 dias distintos para a pesquisa de parasitas presentes em pequena quantidade ou de eliminação intermitente.

Ao longo do tempo que permaneci nesta valência, tive ainda a oportunidade de realizar os seguintes testes rápidos:

1. Pesquisa de *Campylobacter* spp. - *CertTest campylobacter one step card* (Certest BioTec)

Imunoensaio cromatográfico para a detecção qualitativa de *Campylobacter spp.* a partir de amostras de fezes ou de colónias suspeitas em coprocultura.

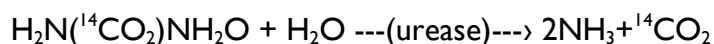
2. Pesquisa de *Helicobacter pylori* (Pylory-strip Coris BioConcept)

Imunoensaio cromatográfico para a detecção *in vitro* de *Helicobacter pylori* em amostras de fezes.

3. Pesquisa de *Helicobacter pylori* por teste respiratório

O HeliProbe® é um sistema de diagnóstico primário para detecção de *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* é uma bactéria que infeta o estômago e é responsável pela elevada percentagem de úlceras estomacais e duodenais, estando associada a cancro do estômago e ao linfoma de MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). A infeção ocorre geralmente na infância e pode persistir por vários anos. A transmissão dá-se por contacto direto com a pessoa infetada.

O sistema HeliProbe® é constituído por 3 componentes: HeliCap™, BreathCard™ e um analisador. (fig II) O paciente ingere uma cápsula com ureia marcada com C¹⁴. (HeliCap™). Na presença de *Helicobacter pylori* a ureia é metabolizada a dióxido de carbono e amónia pela enzima urease, produzida pela bactéria.



Os isótopos C¹⁴ disponíveis na forma de ¹⁴CO₂ são difundidos no sangue e transportados para os pulmões, onde são exalados durante a expiração. A detecção deste isótopos (positividade da amostra) constitui uma evidência conclusiva de que o paciente está infetado com *Helicobacter pylori*. Na ausência de *Helicobacter pylori*, a ureia administrada é absorvida pelo trato gastrointestinal e subsequentemente eliminada.



Fig. II: Ilustração do funcionamento do HeliProbe®. O paciente ingere a cápsula HeliCap™. Após 10 minutos, o paciente respira para o BreathCard™, que retém a amostra. Este dispositivo é colocado no analisador e a análise é efetuada. Após 250s, o resultado do teste está disponível.

4. Pesquisa de sangue oculto (NADAL® FOB cassette)

Teste rápido de visualização imunocromatográfica para a deteção qualitativa de hemoglobina humana em amostras de fezes, com vista a indiciar possíveis distúrbios gastrointestinais, cancro do intestino ou hemorroidas graves.

Culturas de outros produtos

Para além das uroculturas e coproculturas, faz ainda parte dos procedimentos diários do laboratório as culturas de outros produtos biológicos: exsudatos vaginais, uretrais, expetoração, fluidos nasais, esperma e aspirados/raspados.

Para estas amostras são realizados esfregaços com coloração de *Gram* e podem ser inoculados os seguintes meios, cuja seleção vai depender do microrganismo em pesquisa:

- Gelose Chocolate+*PoliVitex*: indicada para o crescimento das estirpes exigentes pertencentes aos géneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus* (*S.pneumoniae*). Este meio é constituído por uma base nutritiva enriquecida com factores X (hemina) e V (NAD), introduzidos pela hemoglobina e pelo *PoliVitex*.
- Gelose *Columbia* + 5% sangue carneiro: meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes (como estreptococos e *Listeria*) O sangue de carneiro torna-o um meio nutritivo muito rico, adaptado ao crescimento da maioria das estirpes bacterianas, independentemente do metabolismo destas e permite a

expressão de hemólise, o que constitui um critério de base para a orientação da identificação bacteriana. Esta gelose é também adequada para o isolamento de anaeróbios, pelo que é incubada em anaerobiose.

- Gelose *Chapman*: destina-se ao isolamento e diferenciação de estafilococos. Os microrganismos fermentam o manitol, originando colónias amarelas por acidificação do meio. Esta característica constitui um critério de orientação presuntiva para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O teor elevado em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de outros microrganismos que não estafilococos.

- Gelose *MacConkey*: esta gelose com cristal violeta é um meio de isolamento seletivo e de diferenciação para pesquisa de enterobactérias. Permite evidenciar a fermentação da lactose pela viragem do vermelho neutro. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosa ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Os microrganismos que não fermentam a lactose originam colónias incolores ou ligeiramente bege. A seletividade em relação às bactérias gram positivas é proporcionada pelos sais biliares e o cristal violeta.

- Gelose *Sabouraud* Cloranfenicol: meio seletivo recomendado para o isolamento de leveduras e de fungos filamentosos. A presença de peptonas favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas. A seletividade do meio em relação às bactérias é assegurada pelo cloranfenicol.

Os raspados de tipo ungueal apenas são inoculados neste tipo de meio.

Para além destes meios, pode ainda ser inoculado o meio de *Lowenstein-Jensen* a partir de expetoração, urina ou lavados gástricos, apenas para pesquisa de micobactérias.

No âmbito destes produtos pude ainda realizar alguns testes rápidos de pesquisa de microrganismos específicos, tais como:

- Pesquisa de estreptococos β -hemolíticos do grupo A (*S. pyogenes*), por imunoensaio em cassete
- Pesquisa de *Chlamydia* por imunocromatografia
- Pesquisa de micoplasmas urogenitais – com a galeria *Mycoplasma IST2*
- Pesquisa de estreptococos β -hemolíticos do grupo B (*S. agalactie*) em meio Granada, a partir do exudato vaginal de grávidas, incubado em anaerobiose.

Identificação e Antibiograma

A identificação de microrganismos em culturas positivas pode ser feita a partir de:

- Repicagem de colónias suspeitas e utilização de teste rápidos de identificação ou provas de filamentação para leveduras.
- Repicagem de colónias, com ou sem nova inoculação em meios diferenciais, seguida de confirmação pelo *Vitek 2 compact*.

O *Vitek 2 compact* (fig.III) possui uma unidade de leitura de códigos de barras de cartas de identificação e antibiogramas. O aparelho inclui: uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas e uma zona de incubação e leitura automática das mesmas (por turbidimetria e colorimetria), acoplado a um software e base de dados que analisam e interpretam os dados enviados pelo sistema de leitura. Este software cruza a informação da identificação e do antibiograma. Esta informação permite a avaliação dos valores de CMI (concentração mínima inibitória) e a identificação de fenótipos de acordo com os resultados obtidos. A avaliação final indica se o resultado do antibiograma é consistente com a bactéria identificada. (1)



Fig. III: *Vitek 2 compact*

Hematologia

A Hematologia compreende o estudo do sangue e dos tecidos hematopoiéticos e constitui uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos. A este nível, o Laboratório de S. Lázaro executa, por métodos automáticos, os seguintes exames de hematologia de rotina:

- Hemograma
- Velocidade de Sedimentação
- Estudo da coagulação
- Doseamento da hemoglobina glicada

e por técnicas manuais:

- Tipagem sanguínea A, B e O
- Tipagem Rh

Os hemogramas (eritograma, leucograma e contagem de plaquetas) são efetuados a partir de amostras de sangue colhidas em tubo com K3-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (fig.IV). Este anticoagulante preserva a morfologia celular ao atuar como quelante pela ligação com os íons de Ca^{2+} .



Fig. IV: tubos de colheita com K3-EDTA

As amostras são processadas automaticamente pelo *Sysmex XT-4000i* (fig.V), tendo por base o princípio de contagem celular a partir da tecnologia de citometria de fluxo fluorescente e foco hidrodinâmico, o que oferece a sensibilidade necessária para contar e diferenciar os constituintes presentes no sangue total, permitindo classificar de modo consistente populações normais de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, diferenciando-as das populações anormais, o que reduz o número de intervenções manuais. (II)

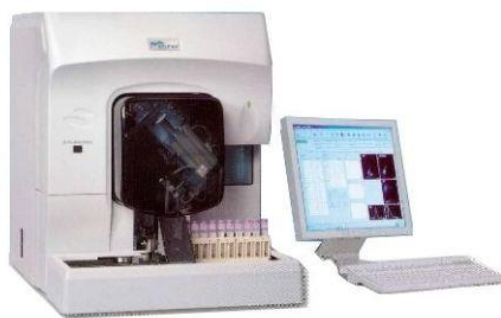


Fig. V: Sysmex XT-4000i

A citometria de fluxo fluorescente permite uma contagem diferencial de 6 partes para WBC (leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eósinófilos, basófilos e granulócitos imaturos), reticulócitos, fração de reticulócitos imaturos e PLT-O (contagem ótica de plaquetas). O foco hidrodinâmico, corrente direta, permite a contagem de eritrócitos e plaquetas.

O XT-4000i utiliza ainda o reagente livre de cianeto laurilsulfato de sódio para determinação da hemoglobina. O produto final é um composto corado cuja leitura é feita no espectrofotómetro.

Interpretação de Hemogramas

Eritrograma:

O eritrograma é definido a partir de 3 pontos: o hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos, aos quais se associam 3 índices: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Globular Média (HGM), e Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular (CMHC). A anemia é uma patologia que pode estar associada a alterações ao nível destas especificações.

A anemia corresponde a uma redução do número de glóbulos vermelhos no sangue. Sendo estes os responsáveis pelo transporte do O_2 por meio da hemoglobina, numa situação anémica existe um menor aporte do mesmo aos tecidos. A anemia pode ser consequência de deficiências a nível da eritropoiese ou destruição/perda excessiva relativamente à sua capacidade de reposição pela medula óssea.

Pode ser classificada com base na concentração de hemoglobina determinada e na sua morfologia.

A mais comum é a anemia causada pela deficiência em ferro ou ferropriva, consequente de perda crônica no adulto, má-absorção, ingestão insuficiente ou mesmo por aumento das necessidades em crianças e gestantes.

Para uma avaliação mais precisa do estado de anemia podem ainda ser requisitados outros exames complementares que auxiliem o diagnóstico, como o doseamento do ferro sérico, transferrina, ferritina, ácido fólico, vitamina B12, taxa de saturação de transferrina e capacidade total de fixação do ferro.

Leucograma:

O leucograma diferencial da *Sysmex XT-4000-i* permite a quantificação individual das subpopulações leucocitárias: linfócitos, granulócitos (basófilos, eosinófilos, neutrófilos) e monócitos, e ainda a contagem de granulócitos imaturos, sendo possível a partir da tecnologia de fluorescência diferenciar as populações normais e anormais de modo confiável.

As alterações do número e função dos leucócitos podem estar associadas várias patologias, congênitas ou adquiridas, sendo portanto a história clínica de extrema importância na avaliação e diagnóstico. As mais comuns estão associadas a infecções com alteração no número de neutrófilos, como o caso de infecções bacterianas, uma vez que estes constituem a população mais abundante. Nas infecções víricas é frequente a linfocitose e nas parasitárias e reações alérgicas a eosinofilia.

Plaquetas:

As plaquetas têm como principal função a hemostase.

Tal como os glóbulos vermelhos ou leucócitos, a avaliação plaquetária é feita a partir da sua quantificação, morfologia e função. A contagem de plaquetas pode ser conseguida a partir de dois métodos: o tradicional de impedância ou a partir de fluorescência ótica, o que maximiza o nível de informações obtidas a partir das amostras.

A hemostase é comprometida quando se verificam distúrbios da função plaquetária como trombocitopenias (diminuição do número de plaquetas), falências de agregação plaquetária, dos fatores de coagulação ou trombocitose (aumento do número de plaquetas).

Histograma

Os resultados do pedido de hemograma são apresentados da seguinte forma (fig. VI),

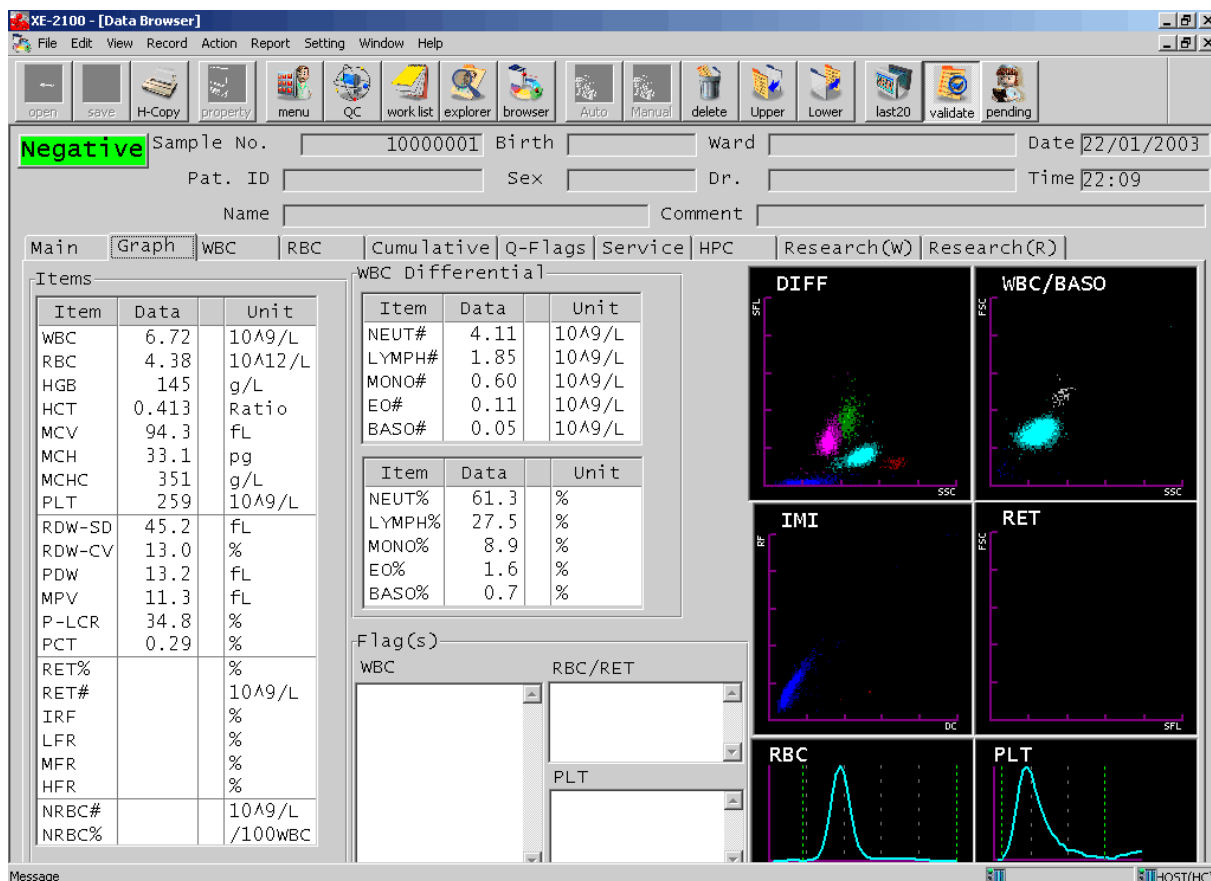


Fig. VI: Exemplo de um resultado de hemograma

sendo dados como POSITIVOS ou NEGATIVOS consoante sejam detetadas ou não alterações nas populações celulares, respetivamente. Estes dados são revelados de forma quantitativa, percentual ou sob a forma de histogramas. A alterações estão normalmente associados alertas (*flags*), dados pelos sistema. No entanto será sempre importante uma avaliação do historial clínico do utente para melhor interpretação dos resultados. Poderá também ser necessário a realização de esfregaços sanguíneos nos casos positivos com alterações morfológicas significativas ou que apresentem valores muito diferentes dos de referência.

Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços sanguíneos podem ser realizados, não só para as situações acima descritas, como também como meio de diagnóstico para pesquisa de parasitas presentes no sangue periférico: *Plasmodium*, *Babesia* e *Leishmania*, ou a pedido específico do clínico. São corados pela técnica de *May-Grünwal-Giemsa*. Este método permite a coloração diferencial dos vários componentes celulares, com base na sua acidofilia ou basofilia, por recurso à utilização de um corante básico (azul de metileno) e outro ácido (eosina). O azul de metileno cora os núcleos, grânulos de granulócitos basófilos e moléculas de RNA (ácido ribonucleico) no

citoplasma dos leucócitos; a eosina as hemácias e os grânulos dos granulócitos eosinófilos. Deste modo, os núcleos dos leucócitos e os grânulos dos granulócitos basófilos surgem com cor azul enquanto que os glóbulos vermelhos e os grânulos dos eosinófilos são corados de vermelho. Já os neutrófilos apresentam um núcleo azul escuro e citoplasma rosa, com granulações que variam do rosa ao azul claro e os monócitos um núcleo azul violeta e citoplasma azul claro. O citoplasma dos leucócitos apresenta uma coloração azul clara, devido à baixa concentração de moléculas de RNA. (fig. VII)

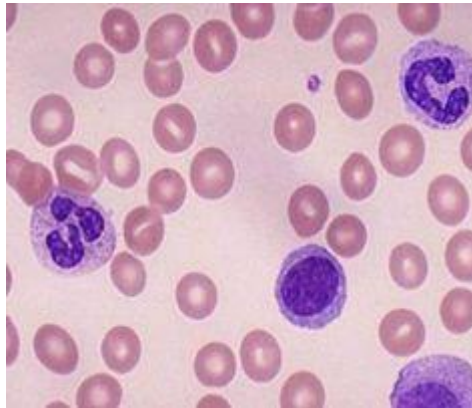


Fig. VII: aspecto de um esfregaço de sangue periférico, após coloração com *May-Grünwald-Giemsa*.

Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação é a determinação dada ao teste que, a partir de sangue com anticoagulante em coluna vertical, mede a distância do hematócrito ao plasma por hora por recurso a um sensor ótico. Esta análise é efetuada a partir de sangue colhido em tubos com K3-EDTA no *VES- MATIC Clube 200* (Diesse). (fig. VIII)



Fig. VIII: *VES-MATIC Clube 200* (Diesse)

Neste aparelho os tubos inseridos são primeiramente agitados, permanecendo depois em posição vertical, permitindo a sedimentação. A análise pode ser conseguida em

aproximadamente 30 minutos, por recurso apenas à leitura por sensor ótico da altura da coluna de eritrócitos que sedimentam, evitando a utilização de outros consumíveis e reagentes. O resultado será extrapolado para um período de uma hora de sedimentação, sendo esse valor calculado automaticamente. No entanto em casos que assim o exijam, como volumes pequenos de amostra, a análise pode ser efetuada manualmente com uma pipeta graduada.

A velocidade de sedimentação é um parâmetro analítico usado como medida não específica da inflamação. Embora não sendo específico, é um teste muito sensível e o primeiro indicador de doença quando outros parâmetros químicos e físicos permanecem normais. Existem vários fatores que o podem influenciar, no sentido do seu aumento, como existência de inflamação aguda ou crónica, artrite reumatoide, idade avançada, gravidez, anemia, paraproteinémia, infeção ou malignidade. (III)

Estudo da coagulação

Todos os ensaios de hemostasia são realizados na *Sysmex CA-500*. (fig. IX). Este equipamento determina vários parâmetros relacionados com a função de coagulação a partir do plasma, tais como o APTT (tempo de tromboplastina parcialmente ativado), TP (tempo de protrombina), TT (tempo de trombina) e a concentração de fibrinogénio e antitrombina III, a partir da deteção ótica do coágulo formado. Para tal são utilizadas amostras colhidas em tubos com o anti-coagulante citrato de sódio (fig. X), seguidas de centrifugação.

O APTT (tempo de tromboplastina parcial ativada) avalia a via intrínseca da cascata de coagulação e pode estar prolongado em situação de deficiência dos fatores de coagulação I, II, V, VIII, IX, X, XI, e XII, uso de heparina, coagulação intravascular disseminada ou doença hepática. Pode estar diminuído em qualquer situação de hipercoagulabilidade.

O PT (tempo de protrombina) avalia a via extrínseca a partir dos fatores dependentes da vit.K (II, VII, X), fibrinogénio e fator V. Um aumento do TP pode ser resultado de uma deficiência destes fatores ou da própria vit.K ou de terapêuticas com varfarina. Atualmente estes resultados são expressos através de um padrão mundial, o INR (razão normalizada internacional). Este índice internacional normalizado é muito utilizado na monitorização da terapêutica com anticoagulantes, sendo o valor de 0,8-1,2 o considerado normal para um indivíduo não medicado, podendo atingir os 3 para um paciente em terapia.



Fig. IX: Sysmex CA-500



Fig. X: tubos de colheita com citrato de sódio

Doseamento da Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos.

Segundo a DGS (Direção Geral de Saúde), a hemoglobina glicada A1c (HbA1c) é determinada, por rotina, em todas as pessoas diagnosticadas com diabetes mellitus, de modo a avaliar o grau de controlo glicémico, uma vez que a glicação da hemoglobina varia em função da concentração da glicose a que os eritrócitos são expostos, integrada ao longo do tempo de vida destas células. A hemoglobina glicada é assim um indicador de grande utilidade clínica, refletindo a glicemia média nas últimas 8 a 12 semanas, atendendo a que o tempo médio de vida dos eritrócitos é de 120 dias. Este parâmetro é determinado a partir de sangue total, podendo o próprio ser usado como método de diagnóstico da doença quando a HbA1c >6,5%. No entanto deverá privilegiar-se, para o diagnóstico da diabetes, o valor da glicose obtida no plasma venoso em jejum ou os valores da prova de tolerância à glicose oral. (IV)

A determinação da HbA1c deve ser realizada, pelo menos, semestralmente em todas as pessoas com diabetes.

O doseamento da HbA1c é efetuado na *ADAMS A1c HA-8160* (fig. XI), pelo método de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Os resultados são apresentados na forma percentual e de cromatograma, no qual figuram, para além da A1c, as frações HbA1, HbF e hemoglobinas variantes.



Fig. XI: ADAMS A1c HA-8160

Técnicas manuais em Hematologia

Tipagem de grupos sanguíneos: A, B, O e fator Rh

Os tipos sanguíneos são determinados pela presença de diferentes antígenos na superfície das hemácias, de natureza bioquímica distinta. Cada indivíduo possui um conjunto diferente de antígenos eritrócitários, em cujo soro estão ausentes as respectivas aglutininas. A determinação dos tipos sanguíneos é de extrema importância para garantir o sucesso das transfusões sanguíneas. Os reagentes utilizados na grupagem sanguínea são anticorpos (aglutininas) monoclonais do tipo IgM: anti-A, anti-B e anti-AB, cuja aglutinação direta em sangue total é indicativa da presença do antígeno correspondente.

O fator Rh é outro tipo de antígeno eritrocitário de grande importância clínica, estando envolvido nas reações transfusionais hemolíticas e na doença hemolítica do recém-nascido. É obrigatória a sua determinação, juntamente com os antígenos do grupo AB0, no procedimento de tipagem sanguínea que antecede qualquer transfusão. Os indivíduos são classificados como Rh⁺ ou ⁻ consoante a presença ou ausência do antígeno D respetivamente. Quando o indivíduo não possui este antígeno, é facilmente sensibilizado na presença do mesmo, o que estimula a produção dos anti-corpos correspondentes. Esta situação pode ocorrer numa gravidez de mulher Rh⁻ com feto Rh⁺ ou transfusão incompatível, o que pode resultar em doença hemolítica do recém-nascido ou noutras reacções hemolíticas graves. O procedimento de determinação do fator Rh é semelhante ao do sistema AB0, com base no princípio da aglutinação.

Teste de *Coombs*

O teste de *Coombs* ou da antiglobulina humana baseia-se no princípio de pesquisa e identificação de anticorpos que provocam aglutinação das hemácias. Existem dois tipos de teste:

- *Coombs* directo, que permite a deteção de anticorpos ligados à superfície das hemácias, por reação com as respetivas antiglobulinas. A positividade da reação (ocorrência de aglutinação) confirma a presença dos anticorpos. Este teste é efetuado a partir de sangue total e constitui o método de diagnóstico de doença auto-imune ou doença hemolítica do recém nascido.
- *Coombs* indirecto, que deteta anti-corpos contra as hemácias que se encontram livres no plasma sanguíneo. Este teste, realizado a partir do soro, é utilizado como exame pré-natal de grávidas Rh⁻ e em fases pré-transfusionais.

Outras técnicas executadas no setor de Hematologia:

- Pesquisa de eosinófilos em secreção nasal para diagnóstico de rinite alérgica.
- Teste de avaliação da fragilidade osmótica eritocitária para diagnóstico de esferocitose hereditária ou talassemia.

Bioquímica

É na secção de Bioquímica Clínica que são realizados os testes automatizados de química clínica, a maior parte a partir de soro sanguíneo (fig. XII) mas também de plasma e urina, com recurso ao *ADVIA® 1800* (Siemens) (fig. XIII).



Fig. XII: tubo de colheita para obtenção de soro, contendo gel separador



Fig. XIII: *ADVIA® 1800* (Siemens)

O *ADVIA® 1800* é o analisador automatizado de química clínica utilizado para processar testes no soro humano, plasma ou urina, tanto por fotometria como pelo método ISE (eléctrodo seletivo de iões) indireto, para doseamentos de sódio, potássio e cloro.

Os ISE, ou eléctrodos seletivo de iões, são eléctrodos de membrana que respondem seletivamente a alguns iões em presença de outros, medindo o potencial de um ião específico em solução. São utilizados 2 tipos de eléctrodos, um enquanto analisador da amostra (um para cada ião a determinar) e outro de referência. Uma vez que os potenciais de membrana dos eléctrodos de referência são constantes, qualquer variação na voltagem é devida à atividade do ião específico na amostra (a diferença de potencial entre os dois eléctrodos depende da concentração do ião).

Na fotometria é medida a luz refletida dispersa. A luz refletida vem da iluminação, com luz dispersa, de uma mistura de reação num suporte. A intensidade de luz refletida do suporte de reagente é comparada aquela refletida por uma superfície de referência. Como a intensidade de luz refletida não é linear à concentração do analito, são normalmente utilizados algoritmos matemáticos para linearizar a relação de refletância para a concentração. (V)

Na tabela I, encontram-se as principais análises efetuadas no *ADVIA® 1800* (Siemens).

Tabela I - principais análises efetuadas no ADVIA® 1800 (Siemens)

CRP	Amilase	Cálcio	Coolestrol HDL	LDH
Gama-GT	Creatinina	Bilirrubinas	Fósforo	
CK	Capacidade de fixação do ferro	Magnésio	Microalbuminuria	
Ferro	Ureia	Acido Úrico	Transferrina	
Triglicerídeos	Ionograma	TGO	TGP	
RF	Fosfatase alcalina	Coolestrol	Glucose	

Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas é uma técnica de rotina utilizada nos laboratórios de análises clínicas para a deteção de anomalias no tipo e quantidade de proteínas presentes no soro e outros fluídos.

Para o efeito é utilizado o *Sebia Capillarys*, cujo sistema se baseia no princípio da eletroforese capilar em solução livre. As diferentes moléculas carregadas eletricamente são separadas com base na sua mobilidade a um pH específico. Este instrumento possui vários capilares dispostos paralelamente, o que permite múltiplas análises em simultâneo.

Cada amostra é diluída com um tampão de diluição e os capilares são preenchidos com o tampão de separação. As amostras são injetadas por aspiração na extremidade do ânodo do capilar. Uma separação de alta voltagem é então efetuada. A deteção direta e quantificação das diferentes frações de proteínas é realizada a um comprimento de onda específico na extremidade do cátodo do capilar.

Neste equipamento podem ser utilizadas amostras de soro ou urina, sendo as proteínas do soro separadas em seis frações principais: albumina, alfa-1, alfa2, beta-1, beta-2 e gama (fig. XIV) e as da urina em cinco: albumina, alfa-1, alfa2, beta e gama.

A eletroforese de soro e urina constitui uma análise essencial para a deteção e quantificação de componentes monoclonais para o diagnóstico e monitorização de pacientes com gamopatias monoclonais (Mieloma Múltiplo, MGUS – gamopatia monoclonal de significado indeterminado, doença de Waldenström, entre outras)

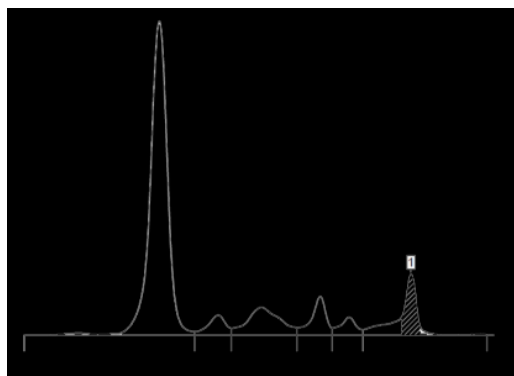


Fig. XIV: Exemplo de perfil eletroforético de proteínas do soro. Da esquerda para a direita estão representadas, respectivamente, as frações de albumina, α -I, α -II, β -I, β -II e gama, verificando-se um aumento da banda das gamaglobulinas.

Gasometria

A gasometria arterial é o exame que avalia a performance pulmonar, indicando o *status* ácido-base do sangue arterial do paciente. A partir da amostra colhida da artéria radial, são fornecidos os valores de pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, por recurso a elétrodos específicos, e eletrólitos: K^+ , Na^+ , Ca^{++} e Cl^- . Outros parâmetros são determinados de forma indireta por cálculo, como a saturação da hemoglobina em O_2 e CO_2 , HCO_3^- e hiato aniônico.

O exame de gasometria é pedido como auxiliar ao diagnóstico e monitorização de doenças pulmonares, metabólicas ou renais que possam causar desequilíbrio ácido-base ou dificuldades respiratórias. A gasometria arterial por si só não fornece informação suficiente para diagnosticar uma doença, mas ajuda a determinar se um paciente tem ou não necessidade adicional de oxigênio. Ao mesmo tempo, outros exames podem ser pedidos visando objetivos correlacionados, como a dosagem da glicose, ureia e creatinina. Adicionalmente ajuda a avaliar a função renal, o que constitui um fator essencial no equilíbrio ácido-base.

Neste laboratório é utilizado o *RAPIDLab 348 EX* (Siemens) para este tipo de análise (fig XV).



Fig. XV: *RAPIDLab 348 EX* (Siemens)

Imunologia e Endocrinologia

Na secção de Imunologia/Endocrinologia, o Laboratório de Análises Clínicas de S.Lázaro é dotado de três equipamentos principais : *Advia Centaur XP Immunoassay System* (Siemens), *mini-ViDAS®* (Biomérieux) e *ImmunoCAP 250* (Phadia).

O *Advia Centaur XP Immunoassay System* utiliza a tecnologia de quimioluminescência direta para o imunoensaio, recorrendo a moléculas de conjugado geradoras de quimioluminescência, como os esteres *acridinium*. Nesta reação o substrato quimioluminescente é hidrolisado, dando origem a um produto instável, o qual após estabilização gera fotões de luz amplificados que são medidos através de um fotomultiplicador cuja função é transformar a luz emitida pelos fotões em impulsos elétricos. Estes impulsos são lidos em *cps* (contagens de luz por segundo). (VI)

Na tabela II estão referenciadas as principais análises efetuadas no *Advia Centaur XP Immunoassay System*:

Tabela II: principais análises efetuadas no *Advia Centaur XP Immunoassay System*:

TSH	T ₄ e T ₄ livre	Estradiol	Rubéola IgG e IgM	CEA
LH	Prolactina	CA 19.9	PSA e PSA livre	Hbc total
Vit. B ₁₂	Ferritina	HCV	HBsAg	
T ₃ e T ₃ livre	β-HCG	HBeAg	Toxoplasma IgG e IgM	
Progesterona	Testosterona	CA 125	Alfa-fetoproteína	
Cortisol	FSH	HAV total	Anti- Hbs	

O mini-VIDAS® é um sistema automatizado de imunoensaios baseado nos princípios ELFA. (fig. XVI)

O ELFA ou *Enzyme Linked Fluorescent Assay* é um ensaio imunoenzimático fluorescente que incorpora o método sanduíche em duas etapas, com uma deteção final por fluorescência. A reação antigénio-anticorpo é dada a partir de um anticorpo associado com uma enzima fosfatase alcalina, que ao reagir com um substrato irá produzir um composto fluorescente. A emissão de fluorescência é proporcional a quantidade de antigénio (ou anticorpo) presente na amostra.



Fig: XVI: mini-VIDAS®

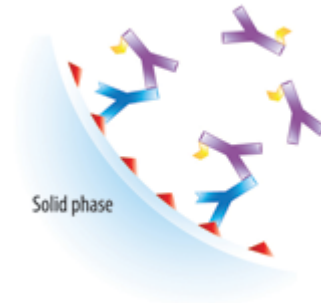
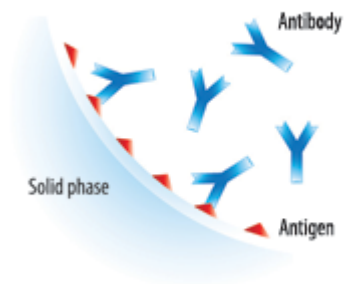
No *mini-VIDAS*® são realizados os doseamentos de IgG e IgM de CMV (citomagalovírus), HIV (vírus da imunodeficiência humana) (p24) e da 25-hidroxivitamina D total.

ImmunoCap 250

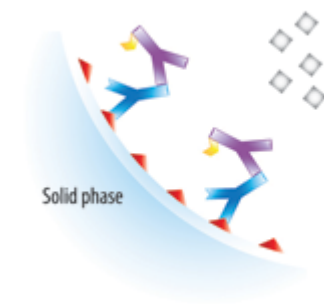
O *ImmunoCap 250* é concebido para a realização de testes de alergia, cujos ensaios abrangem várias categorias (pólen de gramíneas, ervas e árvores; microrganismos; ácaros; gatos, cães e outros animais com pêlo; insetos; venenos de animais; alergénios alimentares; ECP- marcador celular de asma e inflamação e tripticase- marcador de mastócitos) e testes de auto-imunidade, cobrindo os marcadores clinicamente relevantes para a avaliação das doenças auto-imunes mais comuns, como a artrite reumatoide, doença celíaca e doenças do tecido conjuntivo. A tecnologia utilizada é de imunoensaio em sanduíche fluoroenzimático (EliA), (fig. XVII) em que o poço é revestido com um antígeno que é reconhecido pelos anticorpos alvo, representando os marcadores para determinada doença auto-imune. Se estes anticorpos específicos estiverem presentes na amostra de sangue do doente, ligar-se-ão ao antígeno. No passo seguinte da reação, um anticorpo secundário conjugado com enzima liga-se ao anticorpo alvo, ligado ao antígeno. A enzima transforma um substrato adicionado num produto fluorescente. A comparação do sinal de fluorescência com o de calibradores de concentrações conhecidas permite determinar a concentração de anticorpos na amostra do ensaio. (VII)

Nestes ensaios podem ser utilizadas amostras de soro ou plasma.

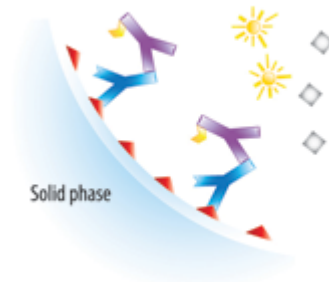
O antígeno de interesse, revestido na fase sólida, liga-se aos anticorpos (por ex. da classe IgG) específicos na amostra do doente.



Após a lavagem de anticorpos não específicos e não ligados, são adicionados anticorpos marcados por uma enzima contra o anticorpo alvo para formarem um complexo.



Após a incubação, os anticorpos não ligados marcados por uma enzima são lavados e o complexo ligado é incubado com o substrato.



Após paragem da reação, mede-se a fluorescência do eluído. A fluorescência é diretamente proporcional à presença de anticorpos específicos na amostra.

Fig. XVII: Tecnologia ELISA

Técnicas manuais em Serologia

VDRL e TPHA

A sífilis é uma doença crónica, exclusiva do ser humano, infectocontagiosa, transmitida predominantemente por via sexual, mas que também pode ser transmitida verticalmente durante a gestação. Causada pelo *Treponema pallidum*, subespécie *pallidum*, a sífilis caracteriza-se como doença sistémica, pois o patógeno atinge a corrente sanguínea após infetar o organismo. Durante a evolução natural da doença, ocorrem períodos de atividade, com características clínicas, imunológicas e histopatológicas distintas e também períodos de latência nos quais não se observa a presença dos sinais ou sintomas.

Existem 2 tipos de testes imunológicos para detecção de sífilis, os treponémicos e os não-treponémicos. Os não-treponémicos, como o VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*), detetam anticorpos anti-cardiolipina que não são específicos para os antígenos do *T.pallidum*. Este teste baseia-se numa suspensão antigénica constituída por uma solução alcoólica que contém cardiolipina, colesterol e lecitina purificada e utiliza soro como amostra. Os componentes da suspensão antigénica (colesterol, lecitina e cardiolipina) ligam-se ao acaso resultando na formação de estruturas denominadas micelas. Os anticorpos não treponémicos, quando presentes nas amostras, ligam-se às cardiolipinas das micelas. Consequentemente, a ligação de anticorpos com várias micelas resulta numa floculação. Os flocos ou grumos podem ser pequenos ou grandes e são visualizados a olho nu ou com o auxílio de um microscópio. Nestes testes são detetados anticorpos IgM e IgG contra o material lipídico libertado pelas células danificadas em decorrência da sífilis e possivelmente contra a cardiolipina libertada pelos treponemas. No entanto, esses anticorpos não são produzidos exclusivamente como consequência da sífilis e de outras doenças treponémicas. Eles podem surgir noutras doenças que também levam a destruição celular, resultando em falsos-positivos. Desta forma, o teste não-treponémico por si só não confirma a infeção pelo *T.pallidum* e, portanto, não define o diagnóstico de sífilis.

Por outro lado, os testes treponémicos, como o TPHA (hemoaglutinação de *Treponema pallidum*), detetam anticorpos específicos para os antígenos de *T.pallidum* e são mais específicos e sensíveis que o VDRL. A sua janela imunológica é mais curta, podendo apresentar um resultado positivo poucos dias após o aparecimento da doença. O TPHA também apresenta menor taxa de falsos positivos que o exame VDRL. No teste TPHA, um resultado normal aponta para uma leitura negativa no que respeita à presença de anticorpos, o que significa que não há infeção e não existiu contacto anterior com a doença. Um resultado positivo significa que o indivíduo contraiu a infeção. Este resultado mantém-se sempre positivo mesmo que exista diagnóstico anterior de sífilis e que a doença tenha sido tratada com sucesso. Por esta razão, o TPHA não pode ser utilizado para monitorizar a eficácia dos tratamentos da doença.

Reação de *Widal*

A reação de *Widal* é um teste serológico presuntivo que permite detetar a infeção por bactérias do género *Salmonella*. O princípio do teste baseia-se na aglutinação de anticorpos numa amostra de soro, após adição de uma pequena quantidade dos antígenos O-somático e

H- flagelar. (fig. XVIII) No caso de infecção a aglutinação ocorre na presença de um ou ambos os antígenos, consoante se trate de uma infecção por *Salmonella typhi* ou *paratyphi*, respetivamente.

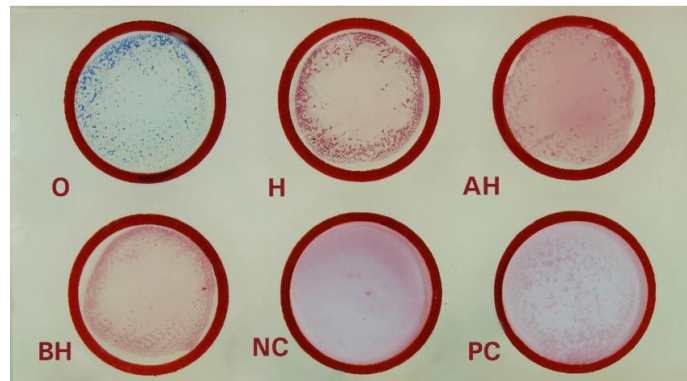


Fig. XVIII: Exemplo de um resultado de uma reação de Widal

Para a reação de *Widal*, o sangue deve ser colhido 7 a 14 dias após o início da infecção. Na primeira semana, em geral, é evidenciada a presença de reações positivas com antígeno “O” (com títulos iguais ou superiores a 1/80), confirmando a presença de infecção ativa. As reações com o antígeno “H” aparecem mais tardiamente, com títulos superiores ao antígeno “O”. Para a pesquisa de *Salmonella paratyphi*, títulos maiores que 1/80 são sugestivos da doença. É importante realizar a avaliação através de outros métodos: hemocultura ou coprocultura.

Reação de *Weil-Felix*

A reação de *Weil-Felix* é um teste de aglutinação para o diagnóstico de rickettsioses. As rickettsioses são causadas por bactérias gram negativo intracelulares obrigatórias da família *Rickettsiaceae* e que são transmitidas por carrapatos, ácaros ou piolhos. Nas doenças causadas por *rickettsiacaes* estão incluídos o tifo epidémico, o tifo endémico e as febres exantemáticas.

Reação de *Waler-Rose*

O teste *Waler-Rose* é um teste rápido de aglutinação (hemaglutinação indireta) para a determinação qualitativa, em placa, do Fator Reumatóide, com recurso a hemácias de carneiro, revestidas por imunoglobulina de coelho.

O termo fator reumatóide (FR) engloba um grupo de auto-anticorpos das classes IgG, IgM e IgA que têm em comum a capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da molécula da imunoglobulina G humana. Apesar da pequena evolução no conhecimento dos mecanismos de ligação do FR (fator reumatóide) aos auto-antígenos e do seu envolvimento

no processo patológico típico da artrite reumatoide, o FR IgM pode servir como marcador precoce na AR, apoiando-se em dados que demonstram que o risco de desenvolvimento de AR (artrite reumatóide) aumenta de forma proporcional ao aumento da concentração de FR em indivíduos normais.

O FR está presente em cerca de 50-90% dos casos de AR clássicos, alguns meses após o início da doença, e, dessa percentagem, 17% em média apresentam-se negativos nas fases mais precoces da doença. Durante a fase ativa, são encontradas concentrações mais elevadas, que começam a decair à medida que o paciente evolui para a remissão clínica, mantendo-se positivas em níveis baixos e estáveis e tornando a elevar-se nos períodos de reativação da doença.

O FR está aumentado também em 75 a 95% dos quadros de síndrome de Sjögren, em 50 a 60% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), em 15 a 35% dos casos de lúpus eritematoso sistémico, em 20 a 30% dos casos de esclerodermia, em outros casos de colagenoses e em outras patologias, como nefropatia e crioglobulinémia. Sabe-se hoje que o FR não é produzido apenas sob condições patológicas, e uma pequena percentagem da população normal, especialmente os idosos, pode apresentar positividade para FR. (VIII)

Reação de *Paul Bunnel*

A reação de *Paul Bunnel* destina-se ao diagnóstico de mononucleose infecciosa. A mononucleose infecciosa é uma doença causada pelo vírus de *Epstein-Barr* (EBV) e apresenta maior incidência em crianças, adolescentes e adultos jovens, sendo caracterizada pelos sinais clínicos de febre, adenomegalia e acompanhada por linfocitose com alto grau de atipia linfocitária. No decurso da infeção são produzidos anticorpos heterófilos, capazes de aglutinar hemácias de carneiro e cavalo, característica esta que permite o diagnóstico da doença a partir deste teste, dado que a reação pesquisa a presença desses anticorpos. São considerados sugestivos de mononucleose títulos superiores a 1/56.

Reação de *Wright*

A reação de *Wright* é a prova serológica que permite o diagnóstico presuntivo de brucelose, também pela titulação de anticorpos específicos no soro, medindo a sua fração aglutinante e na ausência de confirmação bacteriológica.

A brucelose, também conhecida como febre ondulante, febre mediterrânea, febre de Malta ou doença de *Bang* é causada por uma bactéria intracelular facultativa do gênero *Brucella*, transmitida ao Homem pelo gado caprino, ovino, bovino e suíno.

É uma zoonose com distribuição universal e várias vias de transmissão: contacto (maioria dos casos de doença profissional), inalação e ingestão de produtos lácteos não pasteurizados, nomeadamente leite e queijo fresco. Reconhecem-se 6 espécies diferentes: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, sendo as quatro primeiras responsáveis pela maioria dos casos de doença humana. As primeiras manifestações clínicas surgem em média 2 a 8 semanas após a inoculação podendo contudo ser mais tardias, com um intervalo de vários meses.

A sintomatologia é regra geral inespecífica, pelo que uma história detalhada, incluindo local de residência, viagens, exposição a animais e hábitos alimentares é extremamente importante.

Febre, com ou sem arrepios, cefaleias, sudorese, anorexia, fadiga e perda de peso são os sinais e sintomas mais referidos. Nas crianças, a sintomatologia é, regra geral menos grave, sendo classicamente descrita a tríade: febre, artralgia/artrite e hepatosplenomegalia. (IX)

Fase pós-analítica

Controlo de qualidade

Sistema de gestão de qualidade da empresa

A Associação Portuguesa para a Qualidade define qualidade como “a totalidade das características de um produto ou serviço que determinam a sua aptidão para satisfazer uma dada necessidade”. Segundo a própria definição da ISO, o Sistema de Qualidade é “uma estrutura organizativa que define responsabilidades, procedimentos, atividades, capacidades e recursos, que garante que os processos, produtos e serviços respondem aos requisitos da Qualidade estabelecidos”. Ou por outras palavras, é o conjunto de compromissos, metodologias e regras que, aplicados à organização e funcionamento da empresa, lhe garante a conformidade com os requisitos da Norma selecionada.

O Sistema de Gestão da Qualidade do Laboratório S.Lázaro caracteriza-se por:

- Descrever os processos operativos em procedimentos normalizados, na ótica dos seus executores;
- Clarificar a relação interna Fornecedor/Cliente;
- Responsabilizar as atividades componentes do processo operativo;
- Identificar e regulamentar os Documentos Controlados, os Registos de Qualidade e os objetivos da qualidade dos diferentes processos;
- Ser acessível a qualquer colaborador, tanto para consulta, como para iniciativas de melhoramento e ações de correção e prevenção.

Componentes do sistema de qualidade:

- Política da Qualidade
- Manual da Qualidade
- Objetivos da Qualidade
- Procedimentos Gerais
- Procedimentos Específicos
- Matrizes
- Registos de Qualidade
- Procedimentos Diários
- Procedimentos de controlo internos

- Procedimentos de Manutenção
- Manuais Internos
- Instruções de Trabalho
- Manuais de Equipamentos

Procedimentos de controlo internos

Controlo de qualidade interno (CQI)

É um conjunto de procedimentos postos em prática no laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas. Baseia-se na análise diária de uma amostra controlo, cujos valores analíticos são conhecidos, permitindo avaliar a precisão dos ensaios, garantir a reprodutibilidade dos resultados e verificar a calibração dos sistemas analíticos.

Através do controlo de qualidade interno pode-se avaliar o funcionamento efetivo e eficiente dos procedimentos laboratoriais fornecendo resultados válidos, que possam contribuir de forma eficaz no estabelecimento do diagnóstico pelo clínico. (X)

Em linhas gerais e de forma a uniformizar o controlo de qualidade interno no laboratório, existem 2 procedimentos válidos para cada processo:

1. Utilização de controlos a dois níveis diferentes (normal e patológico) no início de cada procedimento analítico.
2. Repetição de amostras de utentes no mesmo dia selecionadas de forma aleatória e executadas em diferentes fases do dia de trabalho.

Avaliação externa da qualidade (AEQ)

Trata-se de uma avaliação interlaboratorial, por meio de testes de proficiência em que o resultado de cada parâmetro realizado no laboratório participante é comparado com a média de consenso, obtida a partir dos laboratórios participantes que utilizam a mesma metodologia, para verificar regularmente a exatidão dos resultados. Os participantes, por sua vez, recebem relatórios de desempenho individuais e globais em que podem avaliar a sua própria prática. (X)

O Laboratório de Análises Clínicas de S. Lázaro garante a qualidade dos seus resultados através de programas de controlo da qualidade interno (CQI) e da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade.

O Laboratório de Análise Clínicas de S. Lázaro participa nos seguintes programas de AEQ:

- INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge)
- RIQAS (*Randox International Quality Assessment Schemes*)
- *Labquality*
- UKNEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*)
- SEQC (*Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*)

Conclusão

A realização deste estágio permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos a nível curricular no mestrado em Análises Clínicas com a prática desenvolvida a nível laboratorial, o que me permitiu adquirir competências específicas para execução de funções enquanto Técnica Superior de Saúde e profissional apta para planear, otimizar e executar procedimentos de análises clínicas com recurso aos métodos analíticos mais adequados, respeitando as normas de segurança e os procedimentos definidos no âmbito da acreditação e certificação e promovendo a melhoria contínua do controlo de qualidade analítica do laboratório.

Enquanto primeiro contacto com o mundo do trabalho revelou-se uma experiência extremamente enriquecedora e gratificante e não poderia estar mais satisfeita com esta opção.

Bibliografia

- I. L'ETOILE, Marcy - **bioMérieux SA. VITEK® 2 Compact Operation Summary**. France: bioMérieux SA, 2005 [Acedido a Junho 2016]. Disponível na Internet : www.biomerieux.pt.
- II. **Haematology Analyzer**. Japan: Sysmex Corporation, 2016 [Acedido a Julho 2016]. Disponível na Internet: www.sysmex.com.
- III. MALCOLM L. BRIGDEN, M.D., B.C. - **Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate**. In: Am Fam Physician. Kelowna, British Columbia, Canada: Cancer Agency, 1999. 60(5):1443-1450
- IV. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde – **Norma 033/2011: Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c**. Lisboa, 2012.
- V. BOYD J.C., HAWKER C. D., **Automation in the clinical laboratory**. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis, 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2006: 265-97.
- VI. KRICKA, L.J., PHIL D. – **Princípios das Técnicas Imunoquímicas**. In: Burtis CA , Ashwood Er, Bruns, DE. Tietz Fundamentos de Química Clínica. Brasil: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p 171-172.
- VII. U.S.A. Thermo Fisher Scientific Inc - **Princípio do teste EliA**. Waltham, 2016
- VIII. **Factor Reumatóide**. Portugal: Laboratório Pioledo, 2016 [Acedido em Agosto 2016]. Disponível na Internet: www.laboratoriopioledo.pt

- IX. **Wright.** Portugal: Instituto Camões, 2006 [Acedido em Agosto 2016]. Disponível na Internet www.instituto-camões.pt
- X. **Garantia da Qualidade.** Portugal: Laboratório Vale do Sousa, 2016 [Acedido em Agosto 2016]. Disponível na Internet: www.labvalesousa.pt