

TRANSPLANTAÇÃO DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

**MONOGRAFIA DO 2º CICLO DE ESTUDOS CONDUCENTE
AO GRAU DE MESTRE EM ANÁLISES CLÍNICAS**

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA ALICE
SANTOS SILVA (FFUP)

SANDRA CRISTINA RIBEIRO TAFULO

SETEMBRO, 2012

DECLARAÇÃO

AUTORIZADO A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Porto, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Alice Santos Silva, pela disponibilidade, atenção dispensada, dedicação e profissionalismo.

Aos meus colegas de Mestrado, pela interatividade e partilha.

A todos os meus amigos e família, pelo incentivo e motivação durante todo o Mestrado.

A todos Muito Obrigada.

RESUMO

A transplantação de progenitores hematopoiéticos é o tratamento de primeira linha de várias doenças do foro hematológico, designando-se autotransplante ou alotransplante dependendo da origem autóloga ou alogénica das células.

As análises clínicas têm um papel de extrema importância na transplantação hematopoiética, no pré-transplante com a seleção do melhor dador e no pós-transplante, garantindo o seguimento adequado do doente. No estudo analítico pré-transplante é de salientar a importância da determinação do grau de compatibilidade no par dador-recetor, a análise dos marcadores víricos do dador e o número de células total e células CD34. Por outro lado, o estudo analítico pós-transplante visa verificar a reconstituição hematológica, efetuada por contagens hematológicas periódicas ao doente, e analisar a doença residual mínima, determinante na avaliação do sucesso do transplante.

Atualmente são três as fontes de células utilizadas na transplantação hematopoiética: medula óssea, sangue periférico após mobilização celular e sangue de cordão umbilical. A opção da fonte celular é efetuada de acordo com o dador compatível disponível e o diagnóstico do doente.

O número de dadores voluntários e as amostras de cordão umbilical criopreservadas têm sofrido um aumento exponencial em todo o mundo, o que aumenta a probabilidade de encontrar pelo menos um dador compatível. Portugal é um país de sucesso nesta área, tendo contribuído grandemente para o aumento da disponibilidade da população de dadores voluntários.

Palavras-chave: transplantação, medula óssea, cordão umbilical, células estaminais

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation is the first-line treatment option for many hematologic disorders. Depending on cell origin, autologous or allogeneic, the transplant is respectively referred as autotransplant or allotransplant.

Clinical analyses have an extremely important role in hematopoietic transplant, before and after transplant, by selecting the best donor and ensuring patient follow-up. Compatibility degree, viral infectious analysis that reassure safety donors samples and number of nucleated cells and cells expressing CD34, are extremely important in pre-transplant analytical studies. On other hand, pos-transplant analytical studies, evaluating transplant success, verify hematological reconstitution, periodical hematological counting and minimal residual disease.

Currently there are three cells types used in hematopoietic transplants: bone marrow, peripheral blood after cell mobilization and cord blood cells. The choice of cellular type is made according to the compatible donor availability and patient diagnostic.

The number of bone marrow donors and cord blood samples available has been exponential rising all over the world increasing the probability of finding at least one compatible donor. Portugal is a success in this area, being the large contributing country to the growth of the donor's population.

Key-words: transplantation, bone marrow, cord blood, stem cells

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS	3
2.1. CÉLULAS PROGENITORAS DA MEDULA ÓSSEA	5
2.2. CÉLULAS PROGENITORAS DO SANGUE PERIFÉRICO	8
2.3. CÉLULAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL	9
2.4. COMPARAÇÃO ENTRE FONTES DE CÉLULAS ESTAMINAIS.....	11
3. PATOLOGIAS TRATADAS COM TRANSPLANTAÇÃO	13
4. ESTUDO ANALÍTICO NO PRÉ-TRANSPLANTE	17
4.1. FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA	17
4.2. MARCADORES VÍRICOS.....	18
4.3. HEMOGRAMA	19
4.4. IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS CD34+	20
4.5. ENSAIOS CLONOGÉNICOS.....	21
4.6. GENOTIPAGEM HLA	23
5. PESQUISA DE DADOR COMPATÍVEL.....	29
5.1. ESTUDO FAMILIAR.....	29
5.2. PESQUISA DADOR NÃO APARENTADO	31
6. PROCESSO DE TRANSPLANTE.....	33
6.1. CONDICIONAMENTO	33
6.2. INFUSÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS.....	34
6.3. FASE NEUTROPÉNICA	34
6.4. FASE DE ENXERTO	34
6.5. FASE PÓS-TRANSPLANTE.....	35
6.5.1. DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO	35
6.5.2. FALÊNCIA DO ENXERTO.....	35

7. ESTUDO ANALÍTICO NO PÓS-TRANSPLANTE	37
7.1. RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA.....	37
7.1.1. HEMOGRAMA.....	37
7.1.2. IMUNOFENOTIPAGEM	38
7.2. QUIMERISMO	38
7.2.1. ANÁLISE CITOGÉNÉTICA	39
7.2.2. ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES	39
7.2.3. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS.....	40
7.3. DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA	41
7.3.1. ANÁLISE CITOGÉNÉTICA	41
7.3.2. HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i> POR FLUORESCÊNCIA.....	42
7.3.3. IMUNOFENOTIPAGEM	42
7.3.4. ANÁLISE QUANTITATIVA POR RT-PCR	42
8. TRANSPLANTAÇÃO EM PORTUGAL	43
8.1. ESTUDOS FAMILIARES.....	43
8.2. PESQUISA DE DADOR NÃO APARENTADO	44
8.3. PEDIDOS DE ENXERTO PARA TRANSPLANTE	45
9. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	49
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento das células estaminais.	3
Figura 2 – Processo de diferenciação e fenótipo das células sanguíneas.....	4
Figura 3 – Recolha de células estaminais de medula óssea.....	7
Figura 4 – Processamento e criopreservação das unidades de sangue de cordão umbilical.....	10
Figura 5 - Grupos sanguíneos do sistema ABO.	17
Figura 6 – Esquema de imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência.	18
Figura 7 - Pesquisa de ácidos nucleicos virais pelo teste Cobas®s201.	19
Figura 8 – Imunofenotipagem das células CD34+ por Citometria de Fluxo pelo método ISHAGE de plataforma única, estratégia de <i>gating</i>	20
Figura 9 – Procedimento laboratorial de ensaios funcionais.	21
Figura 10 – Exemplos de resultados de ensaios funcionais de células formadoras de colónias (CFC).....	22
Figura 11 – Localização e organização do sistema MHC no cromossoma 6.....	23
Figura 12 – Estrutura das moléculas HLA classe I e classe II.....	23
Figura 13 – Apresentação antigénica das moléculas classe I e classe II.....	24
Figura 14 – Nomenclatura HLA.....	25
Figura 15 - Sistema Luminex para a Genotipagem HLA.	26
Figura 16 – Método de PCR-SSP para a genotipagem HLA.....	27
Figura 17 – Exemplo de eletroferogramas obtidos com o método de PCR-SBT para o <i>locus</i> HLA-DRB1.....	27
Figura 18 – Esquema ilustrativo das combinações possíveis entre os haplótipos dos progenitores A e B.....	29
Figura 19 – Genotipagem HLA baixa resolução não permitindo a determinação haplotípica.....	29
Figura 20 – Esquema exemplificativo de um caso de compatibilidade HLA fenotípica.	30
Figura 21 – Esquema ilustrativo da Infusão de células estaminais.	34
Figura 22 – Esquema representativo de contagem diferencial.	37
Figura 23 – Esquema representativo do procedimento de Imunofenotipagem.....	38
Figura 24 - Marcadores STR.....	39
Figura 25 – Análise do Quimerismo pós-transplante em diferentes linhagens celulares.....	40
Figura 26 – Análise do quimerismo por SNP-PCR.	40
Figura 27 - Exemplo de um cariógrama neoplásico.	41
Figura 28 – Esquema representativo de sondas FISH de fusão, em cromossomas e núcleos em interfase.....	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução do número total de doadores voluntários de medula óssea no registo Internacional.	5
Gráfico 2 – Número de doadores de medula óssea e unidades de cordão umbilical, e número de fenótipos HLA, por milhão.	6
Gráfico 3 - Evolução do número total de unidades de cordão umbilical criopreservadas.	9
Gráfico 4 – Indicações para transplante hematopoiético nos USA em 2009.	15
Gráfico 5 - Evolução do Polimorfismo dos alelos HLA.	25
Gráfico 6 – Polimorfismo das moléculas HLA classe I e classe II.	26
Gráfico 7 – Faixas etárias dos doentes propostos para transplante de medula óssea.	43
Gráfico 8 – Distribuição dos doentes, por sexo, propostos a transplante.	44
Gráfico 9 – Resultado dos 135 estudos familiares de genotipagem HLA.	44
Gráfico 10 – Distribuição dos doentes propostos a transplante alogénico com dador não aparentado.	44
Gráfico 11 – Distribuição dos doadores não aparentados estudados.	45
Gráfico 12 – Distribuição dos enxertos solicitados para transplante hematopoiético.	45
Gráfico 13 – Número de compatibilidades HLA dos enxertos solicitados para transplante.	46
Gráfico 14 – Evolução da transplantação hematopoiética em Portugal.	46
Gráfico 15 - Números de transplantes realizados em Portugal, com doadores não aparentados.	47
Gráfico 16 – Números de transplantes hematopoiéticos realizados nas três principais unidades de transplante (IPO Porto, IPO Lisboa e Hospital de Santa Maria) e as diferentes fontes de células estaminais.	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças tratáveis com transplante hematopoiético.	13
---	----

ABREVIATURAS

7-AAD	7 - Aminoactinomycin D
AR	Anemia refratária
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-T	Anemia refratária com excesso de blastos, em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ASST	Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação
BMDW	<i>Bone Marrow Donor Worldwide</i>
CEDACE	Centro nacional de Dadores de Células de medula óssea, Estaminais ou de Sangue de Cordão
CFC	<i>Colony-forming cell</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CFU-GEMM	CFU - granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos
CFU-GM	CFU - granulócitos e monócitos
CFU-S	CFU - <i>spleen</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitors</i>
CMIA	<i>Chemiluminescence microparticle immuno assay</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitors</i>
CMV	Citomegalovírus
DAT	<i>Direct antiglobulin test</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRM	Doença residual mínima
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFI	<i>European Federation for Immunogenetics</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
GvL	<i>Graft-versus-leukemia</i>
Hb	Hemoglobina
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HPC	<i>Human progenitor cell</i>
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplant</i>
HTLV	<i>Human T lymphotropic virus</i>
IDCS	Imunodeficiência combinada severa
iPS	<i>induced pluripotent stem cell</i>

ISHAGE	<i>International Society for Hematotherapy and Graft Engineering</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
miHA	<i>Minor histocompatibility antigens</i>
MM	Mieloma múltiplo
MPS	Mucopolissacaridose
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
NB	Neuroblastoma
NRBC	<i>Nucleated red blood cell</i>
PBSC	<i>Peripheral blood stem cell</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	R-Phycoerythrin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (culture medium)</i>
RT-PCR	<i>Reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
SBT	<i>Single based typing</i>
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	<i>Single nucleotide polymorphim</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
SSO	<i>Single specific oligonucleotide</i>
SSP	<i>Single specific primer</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TAN	Teste ácidos nucleicos
TBI	<i>Total body irradiation</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
UCB	Unidade de cordão umbilical
UTM	Unidade de transplante de medula
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VIH	Vírus de imunodeficiência humana

1. INTRODUÇÃO

A transplantação de células estaminais hematopoiéticas (HSCT), também designada de transplantação hematopoiética, é indicada nos casos em que a medula óssea necessita de ser reconstituída, como acontece em caso de falência da medula óssea ou de lesão devido a tratamentos agressivos, e em casos de hemopatias malignas.

Dependendo da fonte de células progenitoras, autóloga, alogénica ou singénica, o transplante hematopoiético é designado autotransplante, alotransplante ou transplante singénico. Na autotransplantação são colhidas células hematopoiéticas progenitoras do próprio doente, numa fase precoce ou de remissão da doença. Na alotransplantação são colhidas células hematopoiéticas de um dador voluntário, aparentado ou não, enquanto na transplantação singénica o dador é um irmão gémeo monozigótico do doente.

Este tipo de transplantação teve início na década de 50, evidenciando-se nesta área, o trabalho de E. Donnall Thomas que, em 1957, demonstrou a viabilidade e segurança da infusão endovenosa de um grande volume de medula óssea¹. Contudo, apenas em 1968 foi anunciado o primeiro transplante alogénico com sucesso numa criança com imunodeficiência congénita ligada ao cromossoma X². Desde então, as indicações terapêuticas da transplantação hematopoiética foram-se alargando progressivamente a outras patologias.

A descrição e avanço do conhecimento da doença de enxerto-contra-hospedeiro (GvHD) nos anos 70^{3,4,5,6}, permitiu diminuir a principal causa de mortalidade e morbilidade associada à transplantação hematopoiética⁷. Em 1979, a disponibilidade da ciclosporina como fármaco imunossupressor⁸ foi revolucionária na prevenção e terapêutica da GvHD.

Em 1988 foi efetuado o primeiro transplante com células estaminais de sangue de cordão umbilical a uma criança com anemia de Fanconi⁹. Deste então, são criopreservadas em todo o mundo, amostras de sangue de cordão umbilical, criando uma nova fonte de células estaminais.¹⁰ Por outro lado, o aumento dos registos de dadores voluntários de medula óssea por todo o mundo aumentou a probabilidade de encontrar um dador compatível.

Finalmente, os avanços do conhecimento na área da histocompatibilidade e a realização de transplantes alogénicos com compatibilidade HLA em alta resolução¹¹, permitiram que a transplantação de células estaminais hematopoiéticas se tornasse o tratamento ideal em doenças que eram incuráveis até há 30 anos atrás.

2. CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS

O desenvolvimento humano começa com a fertilização do óvulo por um espermatozoide, criando uma célula estaminal totipotente (zigoto). Totipotência é a capacidade de uma única célula estaminal se dividir e diferenciar para produzir todos os tipos de células do organismo, incluindo os tecidos extraembrionários. São células estaminais não diferenciadas, com grande poder de multiplicação e especialização, formando o blastocisto. A massa interna do blastocisto é uma fonte de células estaminais embrionárias pluripotentes, que podem originar todas as células diferenciadas de um organismo adulto (Figura 1). Distinguem-se das células totipotentes por não serem capazes de originar tecidos extraembrionários, como a placenta.

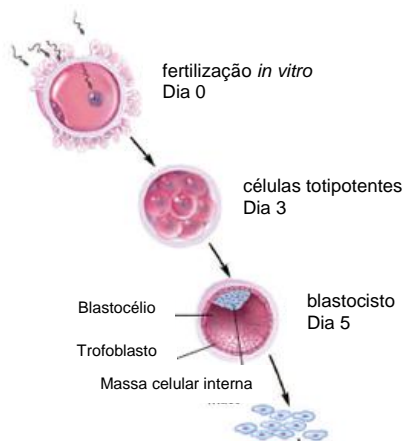


Figura 1 – Desenvolvimento das células estaminais. Adaptado de <http://stemcells.nih.gov>.

As células pluripotentes diferenciam-se em células multipotentes, células com capacidade de diferenciação em células unipotentes, já sem capacidade de diferenciação. As células unipotentes constituem o final do processo de diferenciação, permanecendo comprometidas com uma função específica. Recentemente têm sido desenvolvidos trabalhos de investigação no sentido de estimular a diferenciação de células somáticas, estimulando certos genes¹².

As células sanguíneas resultam de um processo de diferenciação de células estaminais hematopoiéticas (HSC), células com capacidade multipotente e de autorrenovação (Figura 2)¹³. As células sanguíneas maduras têm tempos de vida limitados pelo que, num indivíduo saudável, são continuamente produzidas na medula óssea pelas células estaminais hematopoiéticas - hematopoiese¹⁴. Há estudos que evidenciam alguma capacidade pluripotente das células estaminais hematopoiéticas, podendo contribuir para a produção de tecido não hematopoiético, com enormes potencialidades na medicina regenerativa^{15,16}.

As células estaminais hematopoiéticas possuem fenótipos diferentes, identificáveis por diferentes recetores à superfície das células. Ensaio funcionais de células formadoras de colónias (CFC) *in vitro*¹⁷, permitiram a identificação de células estaminais hematopoiéticas, CD34+, CD90 (Thy1)+ e Lin-, com capacidade de diferenciação em progenitores mieloides e linfoides, e de células CD34+, CD90-, Lin-, sem essa capacidade. O antígeno de superfície CD34, expressa-se em cerca de 1-3% das células na medula óssea, em 0,1-0,4% das células do sangue do cordão umbilical e em 0,01-0,1% no sangue periférico¹⁸. As células hematopoiéticas com capacidade regenerativa de medula óssea expressam este marcador (Figura 2)¹⁹.

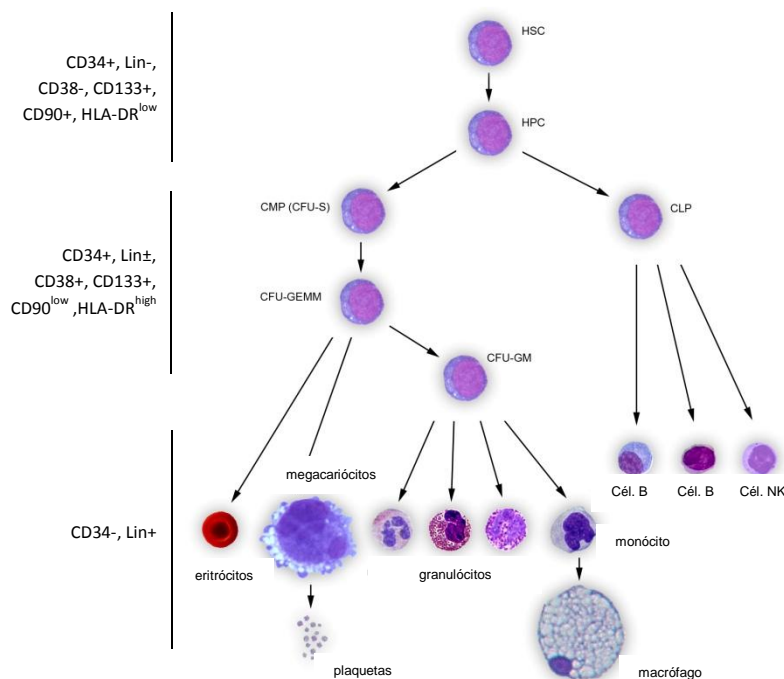


Figura 2 – Processo de diferenciação e fenótipo das células sanguíneas, sendo HSC - Células estaminais hematopoiéticas, HPC – Células progenitoras hematopoiéticas, CMP – Progenitor mieloides comum, CLP – Progenitor linfóide comum, CFU-S – Unidades formadoras de colónias no baço, CFU-GEMM – Unidades formadoras de colónias de granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos, CFU-GM – Unidades formadoras de colónias de granulócitos e monócitos. Adaptado de <https://daley.med.harvard.edu>.

As células estaminais hematopoiéticas utilizadas no transplante hematopoiético podem ser provenientes de células do sangue de cordão umbilical, células progenitoras da medula óssea e células progenitoras do sangue periférico. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de utilização do tecido adiposo como fonte extramedular de células estaminais hematopoiéticas²⁰.

2.1. CÉLULAS PROGENITORAS DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um tecido de consistência mole que preenche o interior das porções distais dos ossos longos e as cavidades esponjosas de ossos, como é o caso os ossos da bacia, e de ossos curtos e planos, como ossos da coluna lombar, esterno e ossos cranianos.

É na medula óssea que existem células estaminais progenitoras, ou seja, células com capacidade para se diferenciarem e originar as células sanguíneas existentes no sangue periférico. Estas células têm a capacidade de auto-renovação mantendo um número relativamente constante.

A recolha de células estaminais da medula óssea pode ser efetuada em doentes, para autotransplante, e em familiares e dadores voluntários de medula óssea, para alotransplante. Atualmente existem no registo internacional, *Bone Marrow Donor Worldwide* (BMDW), 19.155.246 dadores voluntários de medula óssea inscritos (Gráfico 1).

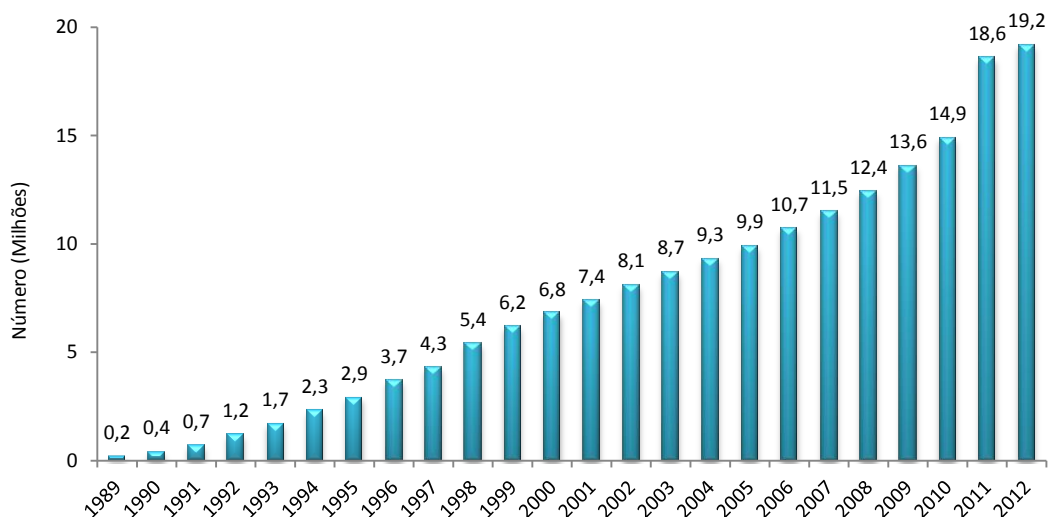


Gráfico 1 – Evolução do número total de dadores voluntários de medula óssea no registo Internacional. Adaptado de <http://bmdw.org>, acedido a 16-06-2012.

Portugal contribui para esta base de dados através do Registo Português CEDACE (Centro Nacional de Dadores de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue de Cordão). Trata-se de um registo Nacional de dadores voluntários de medula óssea, criado em 1995, e que conta com 293.352 inscritos à data de 16-06-2012, sendo o segundo país Europeu com maior número de dadores *per capita*.

Apesar do aumento exponencial do número de dadores voluntários de medula óssea, é de salientar que o aumento do número de fenótipos HLA não acompanha esse aumento. Em 1990 mais de metade dos dadores inscritos correspondiam a novos fenótipos, e em 2010 apenas 1 em cada 15 dadores corresponde a uma nova tipagem (Gráfico 2).

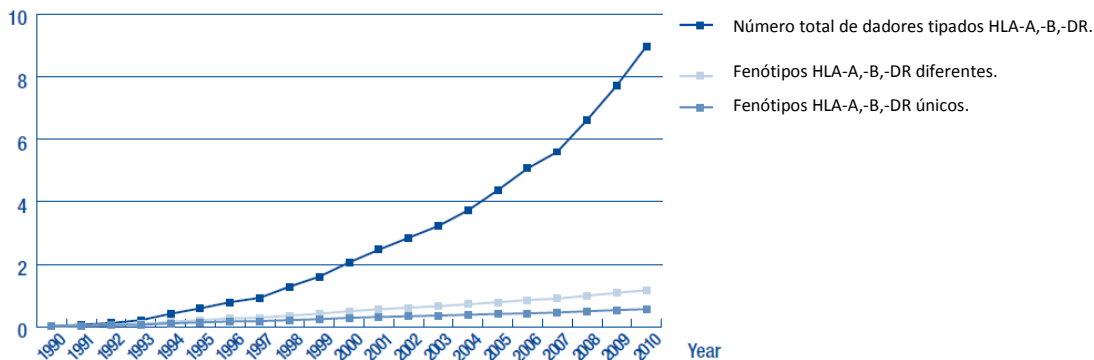


Gráfico 2 – Número de dadores de medula óssea e unidades de cordão umbilical, e número de fenótipos HLA, por milhão. Adaptado de <http://bmdw.org> (relatório anual 2010).

A técnica de recolha consiste na aspiração da medula óssea do osso da crista íliaca, sendo executada em condições assépticas, sob anestesia geral (Figura 3). Em alguns casos podem ser necessárias aspirações adicionais no osso esterno.

Os riscos deste procedimento são escassos, estando geralmente associados à anestesia^{21,22}. São habitualmente explicados ao dador numa sessão informativa, que antecede a recolha. O dador é também sujeito a uma avaliação médica exaustiva que inclui a história clínica completa e um exame físico.

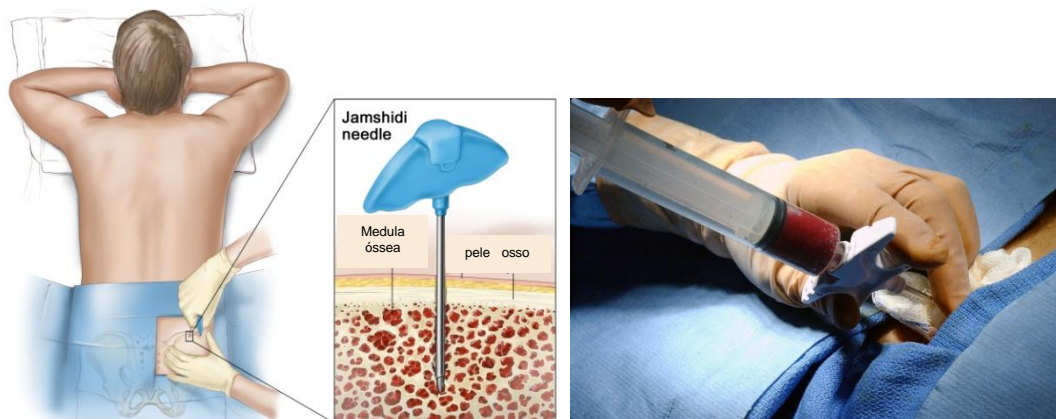


Figura 3 – Recolha de células estaminais de medula óssea. Adaptado de <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov>.

Os sacos de colheita são previamente preparados com meio de cultura, RPMI 1640, e anticoagulante. São puncionadas as cristas ilíacas posteriores, com agulhas de punção medular descartáveis, realizando-se aspirações de cerca de 5 mL. O conteúdo das seringas é imediatamente introduzido no saco de colheita, passando por filtros que permitem a remoção de gordura, coágulos, agregados e fragmentos ósseos. O volume a colher depende do número de células nucleadas que se pretende obter. Com cerca de 50 mL obtêm-se 1×10^9 células nucleadas. No final da colheita, a amostra é processada, testada e infundida no doente.

O processamento inclui a depleção eritrocitária e a concentração de células nucleadas. Os testes efetuados incluem as contagens globulares, contagem das células CD34+ e análise microbiológica, de forma a garantir a esterilidade da amostra. O número mínimo de células nucleadas recomendadas para transplante é de 2.0×10^8 e 2.8×10^6 de células CD34+, por quilograma de peso do doente.

Quarenta e oito horas após a recolha, o dador é contactado para registar e avaliar quaisquer reações adversas; este procedimento é repetido passados sete dias. Aconselha-se um intervalo de 6 meses até uma segunda doação.

2.2. CÉLULAS PROGENITORAS DO SANGUE PERIFÉRICO

A população de dadores de células progenitoras do sangue periférico (PBSC) é a população de dadores de medula óssea, cabendo sempre aos dadores a escolha do processo de doação. A recolha de PBSC é efetuada por citafereze, processo menos invasivo que a recolha de células da medula óssea. Contudo, para que existam células progenitoras em número suficiente no sangue periférico, é necessário que a sua produção seja estimulada, o que se consegue administrando fatores de crescimento adequados. O fator de crescimento mais utilizado é o fator estimulador de colónias granulocíticas (G-CSF), administrado em injeções subcutâneas, na dose de 10 µg/Kg/dia durante quatro dias, sendo a citafereze efetuada ao quinto dia²³. Esta forma de recolha permite a obtenção de um maior número de células estaminais, sendo recomendada a infusão entre 9.0×10^8 células nucleadas e 7.0×10^6 de células CD34+ por quilograma de peso do doente.

Neste tipo de recolha, os principais riscos recaem na necessidade da aplicação de um cateter venoso central e os efeitos adversos mais temidos são os da administração de G-CSF a longo prazo, pois pode estimular a proliferação de células mieloides malignas já existentes²⁴. No entanto, alguns estudos publicados são indicadores de segurança para os dadores^{25,26}.

2.3. CÉLULAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

As células estaminais do cordão umbilical são colhidas na altura do parto, sendo criopreservadas nas 48 a 72 horas seguintes, conforme a colheita é efetuada para transplante alogénico ou autólogo, respetivamente.

Tal como nos doadores voluntários de medula óssea, tem havido um aumento exponencial no número de unidades de cordão umbilical (UCB) criopreservadas em todo o mundo para transplante alogénico, sendo atualmente de 531.587 (Gráfico 3).

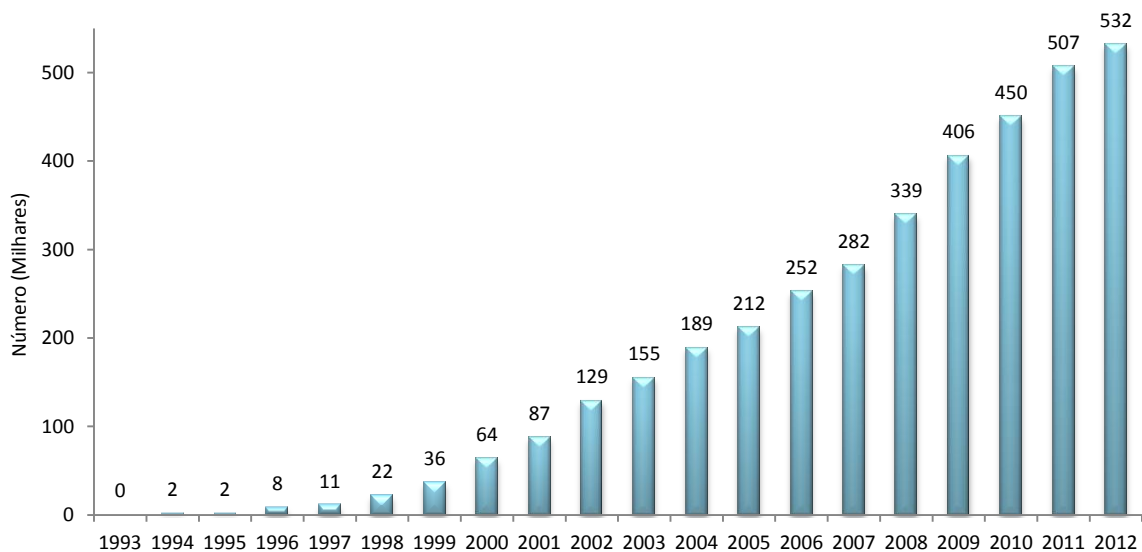


Gráfico 3 - Evolução do número total de unidades de cordão umbilical criopreservadas. Adaptado de <http://bmdw.org>, acessado a 16-06-2012.

Portugal constituiu um banco público de cordão umbilical (LusoCord) em 2009, ano em que regulamentou a colheita e criopreservação de células e tecidos (Lei nº 12/2009). Por outro lado, tem havido um aumento crescente de bancos de criopreservação privados em Portugal, que visam a transplantação autóloga.

O número mínimo de células nucleadas recomendadas para o transplante deve ser de 3.0×10^7 e de 2.0×10^5 células CD34+ por quilograma de peso do doente, quantidade inferior relativamente às outras fontes de células estaminais. Dado o baixo volume de sangue recuperado, a quantidade total de células é baixa, sendo, por isso, usado maioritariamente em crianças de baixo peso. A sua utilização em adultos habitualmente requer a infusão de duas ou três unidades de sangue de cordão^{27,28}. A utilização desta fonte de células estaminais está associada a uma menor percentagem de casos de doença enxerto-contra-hospedeiro²⁹.

Antes da criopreservação, a unidade de sangue de cordão umbilical (UCB) é submetida a um processo de concentração celular e redução de volume^{30,31,32}. São vários os métodos descritos e utilizados, mas o objetivo é comum, ou seja, concentrar as células estaminais hematopoiéticas no menor volume possível. Após a redução de volume, é adicionado o criopreservante, dimetilsulfóxido (DMSO), e é efetuada a criopreservação em azoto líquido (Figura 4).



Figura 4 – Processamento e criopreservação das unidades de sangue de cordão umbilical.

Todas as unidades com destino alogénico são testadas antes de serem colocadas em listas nacionais e internacionais. O estudo analítico inclui a avaliação dos marcadores víricos, contaminação microbiológica, contagens globulares, contagem de células CD34+, genotipagem HLA e fenotipagem eritrocitária.

A qualidade final da unidade de sangue de cordão umbilical está relacionada com a amostra inicial, nomeadamente com a quantidade de células e volume de sangue de cordão colhido, com fatores obstétricos^{33,34}, tais como o tamanho do cordão, peso do bebé, tipo de parto, e ainda com fatores relacionados com o processamento³⁵, tal como o tempo decorrido desde a colheita até à criopreservação³⁶, método de processamento e de congelação-descongelação³⁷.

2.4. COMPARAÇÃO ENTRE FONTES DE CÉLULAS ESTAMINAIS

As diferentes fontes de células estaminais diferem nos métodos de colheita, no conteúdo celular obtido e nos resultados do transplante hematopoiético³⁸.

Os dois tipos de colheita de células em doadores adultos apresentam diferenças nos efeitos adversos³⁹. Dores ósseas e fadiga são os principais sintomas registados nos dois tipos de colheita, que resolvem em cerca de 1 semana no caso da colheita de PBSC e de 3 semanas nas colheitas de medula óssea. Ambos os tipos de doadores apresentam alterações transitórias nas contagens de leucócitos, plaquetas e de concentração de hemoglobina após o procedimento de colheita. São raros os eventos adversos sérios reportados, estando maioritariamente associados à anestesia, no caso das doações de medula óssea, e à necessidade de aplicar um cateter venoso central no caso das doações de sangue periférico.

Por outro lado, a colheita de células de cordão umbilical não apresenta qualquer risco, devendo ser efetuada em locais de colheita certificados, de forma a garantir a obtenção de uma amostra com qualidade. Estas amostras têm ainda a vantagem de poderem ser imediatamente disponibilizadas⁴⁰. Contudo, esta vantagem implica um grande número de testes a todas as amostras criopreservadas, mesmo que possam nunca ser escolhidas para transplante, o que aumenta muito o custo por amostra.

O nível de compatibilidade HLA, necessário para o sucesso do transplante, é inferior para amostras de sangue de cordão umbilical relativamente às outras fontes de células estaminais, estando também associado a um menor risco na transmissão de doenças infecciosas. A grande desvantagem das amostras de sangue de cordão umbilical é o volume reduzido e o esgotamento da amostra com um transplante, não possibilitando uma segunda infusão no caso de não ocorrer reconstituição imunológica.

Todas as fontes de células estaminais são importantes, com vantagens e desvantagens, devendo ser avaliadas as diferentes possibilidades terapêuticas para cada caso clínico. Contudo, no caso de doadores voluntários de medula óssea, a opção do tipo de colheita é sempre do dador, após assinatura do consentimento informado.

3. PATOLOGIAS TRATADAS COM TRANSPLANTAÇÃO

O tipo de patologias que podem ser tratadas com transplantação hematopoiética (Tabela 1) tem sofrido alterações, ao longo do tempo, devido ao aparecimento de tratamentos alternativos. É o caso da leucemia mielóide crónica (LMC), em que houve um decréscimo do número de transplantes desde a aprovação do Imatinib® pela FDA em 2001⁴¹ para o seu tratamento.

Tabela 1 - Doenças tratáveis com transplante hematopoiético. Adaptado de <http://marrow.org>.

Leucemias Agudas	Leucemia linfoblástica aguda (LLA) ⁴²
	Leucemia mieloide aguda (LMA)
	Leucemia bifenotípica aguda
	Leucemia indiferenciada aguda
Leucemias Crónicas	Leucemia mieloide crónica (LMC)
	Leucemia linfóide crónica (LLC)
	Leucemia mieloide crónica juvenil
	Leucemia mielomonocítica juvenil
Síndromes Mielodisplásicas	Síndrome mielodisplásico (SMD)
	Anemia refratária (AR)
	Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)
	Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)
	AREB em transformação (AREB-T)
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	
Doenças da Medula Óssea	Anemia aplástica
	Anemia de Fanconi
	Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN)
	Aplasia eritróide pura
Síndromes Mieloproliferativas	Mielofibrose aguda
	Metaplasia mieloide agnógena (mielofibrose)
	Policitemia vera
	Trombocitopenia essencial
Síndromes Linfoproliferativas	Linfoma Não-Hodgkin (LNH)
	Doença de Hodgkin
Síndromes Fagocíticas	Síndrome de Chediak-Higashi
	Doença granulomatosa crónica
	Deficiência em actina dos neutrófilos
	Disgénese Reticular
Patologia dos Glóbulos Vermelhos	Beta Talassemia Major
	Anemia falciforme
Patologia das Plaquetas	Trombocitopenia congénita

Tabela 1 (Continuação)

Doenças Histiocíticas	Linfohistiocitose hemofagocítica familiar
	Histiocitose de células de Langerhans (Histiocitose X)
	Síndrome hemofagocítico
Doenças Metabólicas Hereditárias	Mucopolissacaridose (MPS)
	Síndrome de Hurler (MPS-IH)
	Síndrome de Scheie (MPS-IS)
	Síndrome de Hunter (MPS-II)
	Síndrome de Sanfilippo (MPS-III)
	Síndrome de Morquio (MPS-IV)
	Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS-VI)
	Síndrome de Sly, Deficiência β -Glucuronidase (MPS-VII)
	Adrenoleucodistrofia
	Mucopolipidose II
	Doença de Krabbe
	Doença de Gaucher
	Doença de Niemann-Pick
Doença de Wolman	
Leucodistrofia metacrómica	
Doenças Hereditárias do Sistema imunitário	Ataxia-telangiectasia
	Síndrome de Kostmann
	Deficiência na adesão e migração leucocitária
	Síndrome de DiGeorge
	Síndrome linfocítico de Bare
	Síndrome de Omenn
	Imunodeficiência combinada severa (IDCS)
	Deficiência da adenosina desaminase com IDCS
	IDCS com ausência de células T & B
	IDCS com ausência de células T & células B normais
	Imunodeficiência variável comum
	Síndrome de Wiskott-Aldrich
Síndrome linfoproliferativo ligado ao X	
Outras Doenças Hereditárias	Síndrome de Lesch-Nyhan
	Hipoplasia cartilagem-cabelo
	Trombastenia de Glanzmann
	Osteopetrose maligna
Discrasias dos plasmócitos	Mieloma múltiplo
	Leucemia das células plasmáticas
	Macroglobulinémia de Waldenstrom
Outras	Retinoblastoma
	Sarcoma de Ewing
	Neuroblastoma
	Carcinoma de células renais, metastático

A evolução nos regimes de condicionamento pré-transplante tem permitido a sua aplicação em doentes com mais de 50 anos, aumentando o número de transplantes efetuados em doenças como os síndromes mielodisplásicos, linfomas não-Hodgkin e leucemia mielóide aguda (LMA). Contudo, a lista de patologias tratáveis com transplantação de medula continua a crescer, com algumas doenças em fase de ensaios clínicos como é o caso de doenças autoimunes^{43,44}.

O tipo patologia é determinante no tipo de transplante a realizar, autólogo ou alogénico, bem como o grau de compatibilidade exigido. O transplante alogénico é a escolha preferencial em casos de leucemias e síndromes mielodisplásicos e o transplante autólogo é preferencial em casos de neuroblastoma e linfoma de Hodgkin (Gráfico 4).

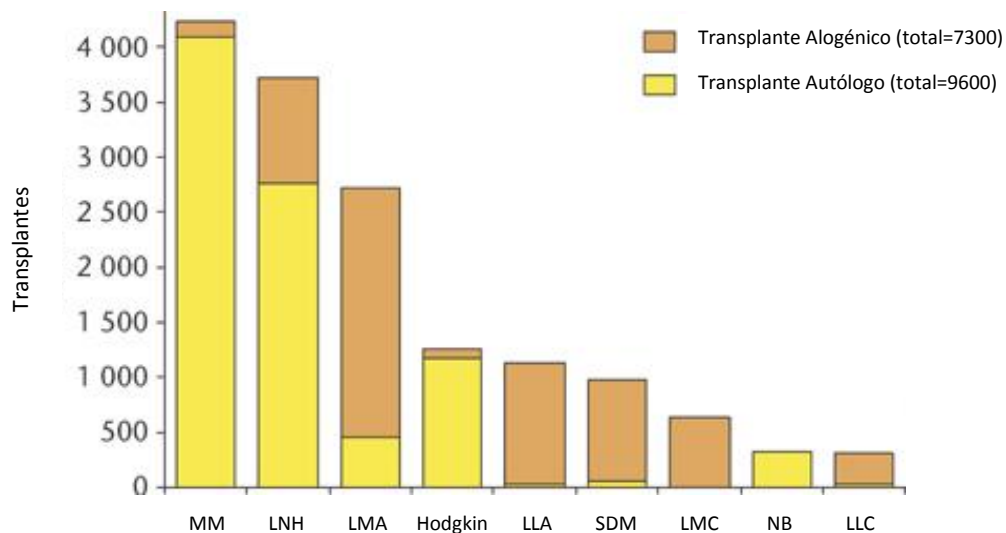


Gráfico 4 – Indicações para transplante hematopoiético nos USA em 2009, sendo MM – Mieloma Múltiplo, LNH – linfoma não-Hodgkin, LMA - leucemia mieloide aguda, LLA – leucemia linfoide aguda, SMD - síndrome mielodisplásico, LMC – leucemia mieloide crónica, NB – neuroblastoma e LLC – leucemia linfoide crónica. Adaptado de <http://www.cibmtr.org>.

4. ESTUDO ANALÍTICO NO PRÉ-TRANSPLANTE

O estudo analítico no pré-transplante hematopoiético inclui análises ao doente e seus familiares diretos, podendo alargar-se o estudo a dadores voluntários de medula óssea e unidades de sangue de cordão umbilical (UCB) nos casos em que não há familiares compatíveis.

4.1. FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

A fenotipagem eritrocitária é efetuada para os sistemas ABO e Rhesus por hema-aglutinação, pois está descrito que o transplante isogrupal é de melhor prognóstico⁴⁵.

Para isso, são colhidas por punção venosa amostras de sangue de sangue periférico, com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para o estudo do sistema ABO efetua-se a prova celular ou direta (testes de hema-aglutinação com soros anti-A, anti-B e anti-AB) e a prova serológica ou reversa (testes de hema-aglutinação usando células dos grupos A e B). As unidades de sangue de cordão umbilical são uma exceção, pois não é efetuada a prova reversa, uma vez que a criança ainda não desenvolveu anticorpos anti-A e anti-B (Figura 5).

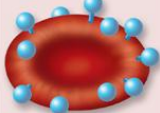
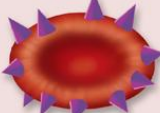
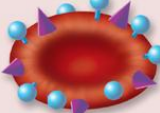
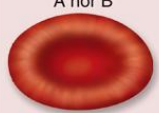



	Antigen A	Antigen B	Antigens A and B	Neither antigen A nor B
Erythrocytes				
Plasma	Anti-B antibodies 	Anti-A antibodies 	Neither anti-A nor anti-B antibodies	Both anti-A and anti-B antibodies 
Blood type	Type A Erythrocytes with type A surface antigens and plasma with anti-B antibodies	Type B Erythrocytes with type B surface antigens and plasma with anti-A antibodies	Type AB Erythrocytes with both type A and type B surface antigens, and plasma with neither anti-A nor anti-B antibodies	Type O Erythrocytes with neither type A nor type B surface antigens, but plasma with both anti-A and anti-B antibodies

Figura 5 - Grupos sanguíneos do sistema ABO. Adaptado de MacGraw-Hill, Inc.

Para o estudo do sistema Rhesus é efetuada a prova direta com o soro anti-D. Em caso de resultado negativo nas unidades de cordão umbilical, esta prova é complementada com o teste de expressão fraca do antígeno D (D-fraco). No caso do teste D-fraco ser positivo, deve ser efetuada o teste de antiglobulina directo (DAT), de forma a eliminar possíveis falsos positivos.

4.2. MARCADORES VÍRICOS

A pesquisa de marcadores dos vírus da hepatite B (VHB), hepatite C (VHC) e vírus da imunodeficiência humana I/II (VHI I/II) é efetuada a todas as amostras de doadores de medula óssea, antes da sua inscrição nos registos nacional e internacional. No caso de seleção de um dador para transplante, este painel é alargado, incluindo também a pesquisa do marcador de citomegalovírus (CMV), vírus linfotrópico humano I/II (HTLV I/II) e o despiste de sífilis com um teste treponémico. No caso de colheita das unidades de cordão umbilical, a pesquisa destes marcadores é efetuada no sangue materno, colhido no dia do parto ou até 7 dias após.

No Registo Português de Dadores (CEDACE), a deteção de antígenos e anticorpos, em amostras de soro ou plasma, é efetuada por imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência (CMIA). A CMIA consiste numa tecnologia que utiliza micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura específica (antígeno, anticorpo ou partícula viral), com um conjugado marcado com acridínio, uma solução pré-ativadora e uma solução ativadora. A reação inicia-se com a adição das micropartículas à amostra, na cuvete de reação, formando o complexo imunitário. Posteriormente, um íman atrai as micropartículas para uma parede da cuvete de reação permitindo efetuar uma lavagem eficiente que remove todas as partículas não ligadas. Seguidamente é adicionado o conjugado marcado com acridínio quimioluminescente, que se liga ao complexo imunitário durante a incubação. Uma nova lavagem remove todas as partículas não ligadas (Figura 6).

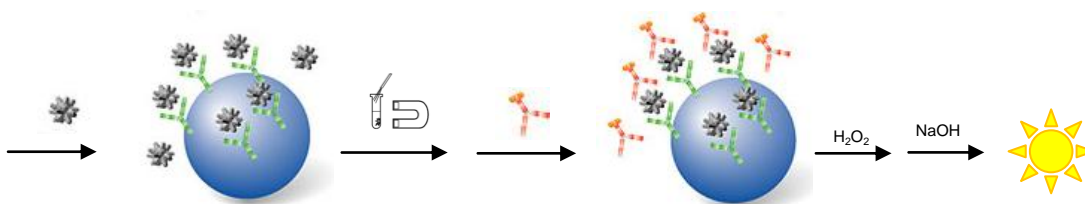


Figura 6 – Esquema de imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência (CMIA).

A adição da solução pré-ativadora (peróxido de hidrogénio 1,32%) cria um ambiente ácido, prevenindo a libertação prematura de energia e emissão de luz, evita a aglomeração das micropartículas e elimina a matéria corante do acridínio do conjugado ligado ao imunocomplexo. Após a sua adição, o sistema ótico efetua uma leitura de *background*.

A solução ativadora adicionada de seguida (hidróxido de sódio 0,35N) oxida o acridínio, ocorrendo a reação de quimioluminescência. Forma-se N-metilacridona à medida que o acridínio volta ao seu estado primário, com libertação de energia e emissão de luz, medida pelo sistema ótico.

No caso das UCB, é ainda incluída o teste de ácidos nucleicos (TAN) dos vírus da hepatite B e C e vírus HIVI/II, de forma a diminuir o período de janela imunológica. No banco de células estaminais público, LusoCord, esta pesquisa é efetuada em amostras de plasma, por PCR em tempo Real multiplex, com o teste Cobas® TaqScreen MPX no sistema Cobas® S201 (Roche). É um teste qualitativo para a deteção direta simultânea do RNA do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (grupo M e grupo O), RNA do vírus de imunodeficiência humana tipo 2, RNA do vírus da hepatite C e DNA do vírus da hepatite B. O teste inclui um controlo interno (*Quality Standard* - QS) que é processado simultaneamente, controlando o desempenho da extração, amplificação e deteção de cada amostra ou *pool* de amostras (Figura 7).

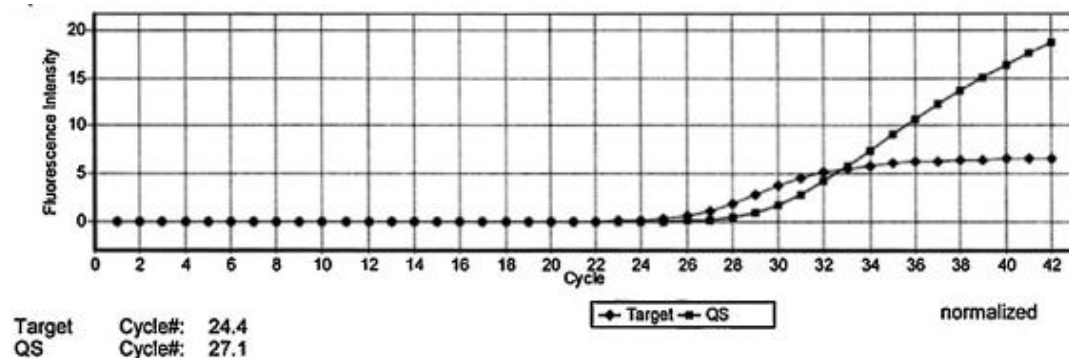


Figura 7 - Pesquisa de ácidos nucleicos virais pelo teste Cobas@s201.

4.3. HEMOGRAMA

Em todas as amostras de células estaminais destinadas a transplante de medula é efetuado um hemograma completo, pois a determinação do número total de células nucleadas é determinante para o sucesso do transplante.

Nas UCB o hemograma deve avaliar o valor de glóbulos vermelhos nucleados (NRBCs), pois a sua presença está associada a pior qualidade das amostras de células estaminais e a pior prognóstico^{46,47}.

4.4. IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS CD34+

A imunofenotipagem de células que expressam à superfície o antígeno CD34 (CD34+) é determinante para o transplante hematopoiético^{48,49}. Por este motivo, é efetuada a todas as fontes de células estaminais previamente à sua congelação ou infusão⁵⁰.

Esta determinação é efetuada por citometria de fluxo, existindo dois métodos diferentes para a marcação e contagem destas células: i) o protocolo de Milão/Mulhouse que se baseia apenas na marcação simples com o anticorpo CD34 marcado com um fluorocromo⁵¹; ii) o protocolo recomendado pela Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia de tecidos (ISHAGE) que se baseia nos quatro parâmetros *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC), CD34-PE e CD45-FITC, e sua análise multiparamétrica (Figura 8). O protocolo ISHAGE pode ser efetuado em plataforma dupla, em que a contagem absoluta de células CD34+ é conseguida pela incorporação nos cálculos da contagem leucocitária de um contador hematológico automático, ou plataforma única, em que a contagem absoluta de células CD34+ é efetuada diretamente no citómetro de fluxo pelo uso de tubos que possuem um número conhecido de microesferas fluorescentes. O método de plataforma única tem-se revelado como o método de eleição^{52,53,54}. Esta metodologia é efetuada sem lavagens após a lise, o que representa maior sensibilidade pela diminuição na perda do número de células^{55,56}.

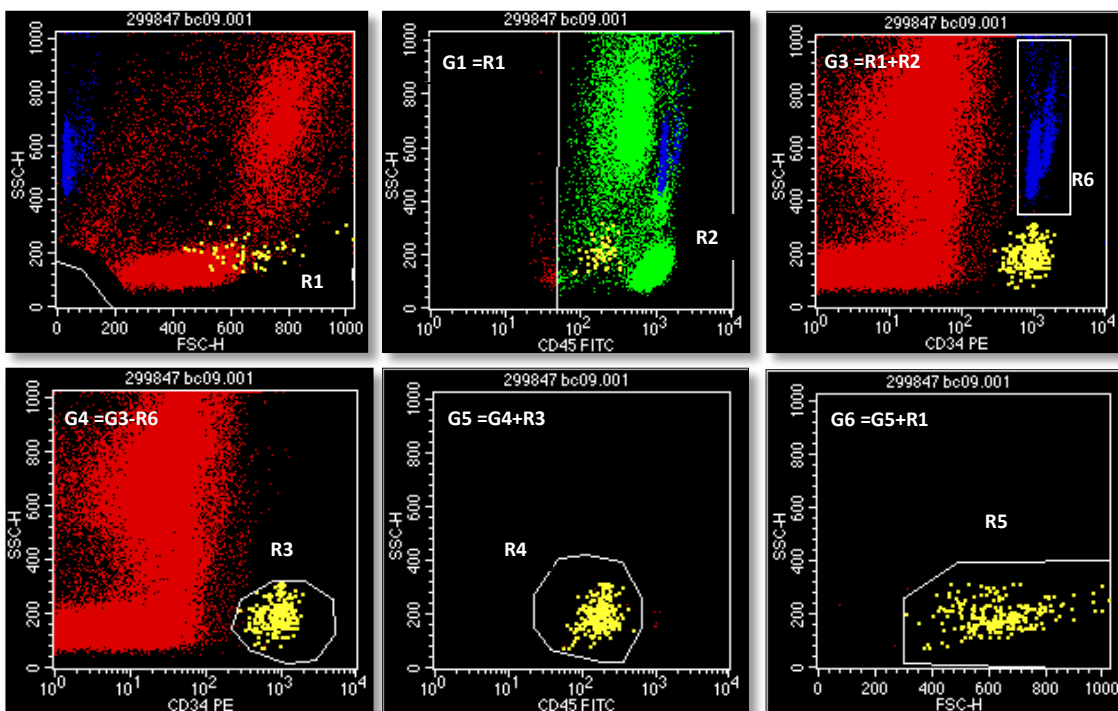


Figura 8 – Imunofenotipagem das células CD34+ por Citometria de Fluxo pelo método ISHAGE de plataforma única, estratégia de *gating*.

A concentração de células CD34+ é calculada considerando o fator de diluição inicial da amostra e o número de microesferas associado ao lote em uso:

$$[CD34 +]/\mu L = \frac{n^{\circ} \text{ eventos } CD34 (G6)}{n^{\circ} \text{ eventos beads } (R6)} \times \frac{n^{\circ} \text{ beads por tubo}}{\text{Volume de amostra}} \times \text{fator de diluição}$$

A adição do marcador nuclear 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) permite a identificação das células não viáveis⁵⁷. Recentemente, a marcação com Anexina V tem sido utilizada com o objetivo de detetar células em início do processo de apoptose, evidenciando uma melhor relação com ensaios funcionais⁵⁸.

4.5. ENSAIOS CLONOGÉNICOS

A análise do potencial clonogénico das células formadoras de colónias (CFC) é um ensaio funcional *in vitro*, que avalia a capacidade que as células terão *in vivo* para reconstituição hematológica⁵⁹. Este ensaio pode ser efetuado em amostras de medula óssea, amostras de células mobilizadas do sangue periférico e em unidades de sangue de cordão umbilical após descongelação, permitindo quantificar as linhas eritróide, mielóide, linfóide e megacariocítica⁶⁰.

O ensaio é realizado cultivando uma suspensão celular em meio de cultura semi-sólido, com uma concentração ideal de nutrientes, citocinas e outros suplementos que permitem o crescimento e diferenciação dos progenitores hematopoiéticos. Para isso, é efetuada a separação celular por método de gradiente de densidade a partir de um segmento do saco de criopreservação, obtendo-se uma suspensão celular que se ajusta à concentração de 2.0×10^5 células/mL. A suspensão é adicionada ao meio semi-sólido, cuja viscosidade permite a visualização dos resultados após 7 a 10 dias de incubação. (Figura 9). A identificação e contagem de colónias é efetuada com um microscópio invertido.



Figura 9 – Procedimento laboratorial de ensaios funcionais. Adaptado de <http://www.stemcell.com>.

Um precursor celular mielóide dá origem a unidades formadoras de colónias das linhagens Granulocítica, Eritróide, Monocítica e Megacariocítica (CFU-GEMM), linhagem multipotente que pode diferenciar-se em colónias Megacariocíticas (CFU-Mk), colónias bipotentes Granulocítica-Monocítica (CFU-GM) e colónias Eritróides (BFU-E). As colónias CFU-GM podem diferenciar-se em colónias Granulocíticas e Monocíticas (Figura 10).



Figura 10 – Exemplos de resultados de ensaios funcionais de células formadoras de colónias (CFC): CFU-GEMM (a), CFU-GM (b) e BFU-E (c). Adaptado de <http://www.stemcell.com>.

Este ensaio tem revelado grande correlação entre o número de CFC contadas após descongelação das unidades de cordão umbilical e o sucesso do enxerto neutrofílico e plaquetário^{61,62}. Por outro lado, é um teste valioso na análise dos métodos de processamento e criopreservação das unidades de sangue de cordão umbilical, sendo preditivo da qualidade da amostra após o descongelamento^{63,64}.

4.6. GENOTIPAGEM HLA

O complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p21.31) e está subdividido em três classes: classe I, classe II e classe III. Os genes que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA) localizam-se nas classes I e II do sistema MHC (Figura 11).

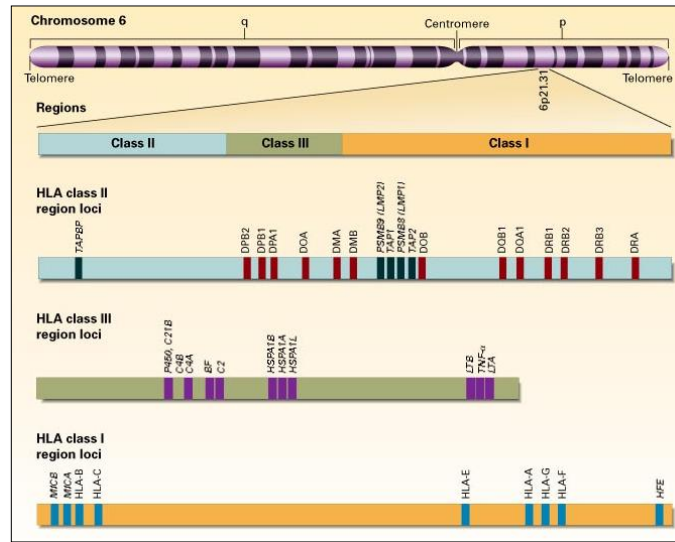


Figura 11 – Localização e organização do sistema MHC no cromossoma 6. Adaptado de Klein *et al*, 2000⁶⁵.

Os genes HLA classe I codificam a síntese da cadeia polipeptídica α da molécula HLA classe I, enquanto a síntese da cadeia polipeptídica β (β 2-microglobulina) é codificada por genes localizados no cromossoma 15. Os genes HLA classe II codificam a síntese das cadeias α e β da molécula HLA classe II (Figura 12).

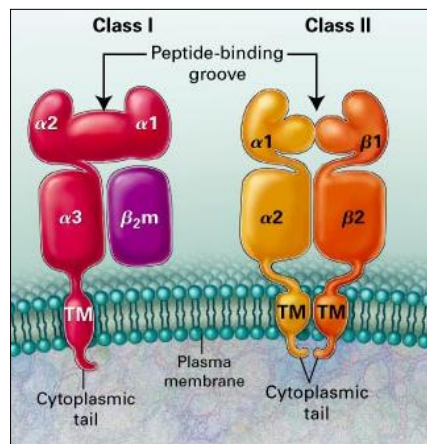


Figura 12 – Estrutura das moléculas HLA classe I e classe II. Adaptado de Klein *et al*, 2000.

As moléculas HLA classe I são expressas em todas as células somáticas e as moléculas HLA classe II são expressas em linfócitos B, linfócitos T ativados, células dendríticas, macrófagos e células epiteliais do timo. A função destas moléculas consiste na apresentação peptídica aos linfócitos T, sendo as moléculas HLA classe I reconhecidas pelo recetor da célula T CD8 (TCR-CD8) e as moléculas HLA classe II reconhecidas pelo TCR-CD4 (Figura 13)⁶⁶.

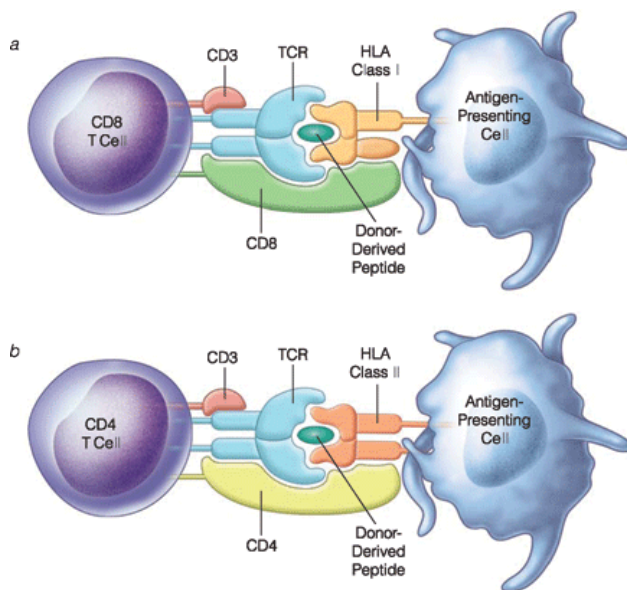


Figura 13 – Apresentação antigénica das moléculas classe I e classe II. Adaptado de <http://www.acssurgery.com>.

A compatibilidade HLA entre dador-recetor na transplantação hematopoiética demonstrou ser um fator essencial, pelo que é efetuada a genotipagem HLA classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e classe II (HLA-DRB1 e HLA-DQB1) a todos os doentes e potenciais dadores^{67,68}. As moléculas HLA possuem um elevado polimorfismo que, com a evolução dos métodos laboratoriais, se revela cada vez mais acentuado, nomeadamente para a classe I (Gráfico 5).

Com a genotipagem HLA de baixa resolução obtém-se compatibilidade antigénica e com a de alta resolução obtém-se a compatibilidade alélica (Figura 14). Para o transplante de células hematopoiéticas a compatibilidade exigida é de alta resolução, ou seja, genotipagem alélica.

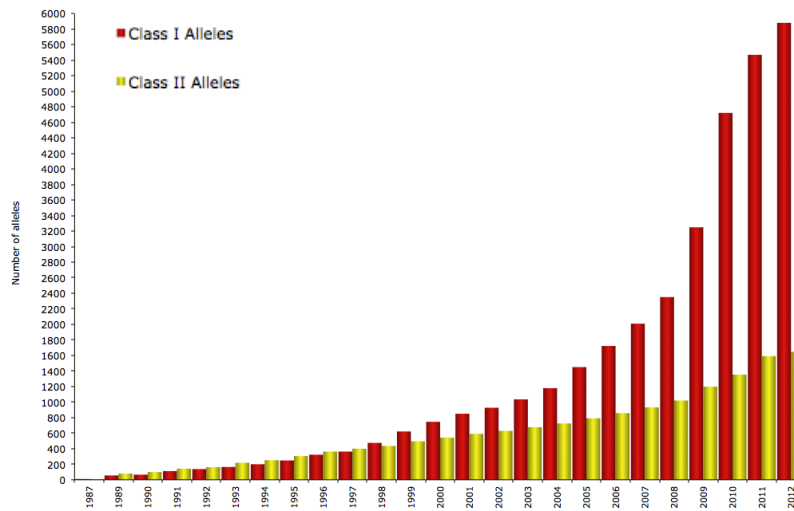


Gráfico 5 - Evolução do Polimorfismo dos alelos HLA. Adaptado de <http://hla.alleles.org>.

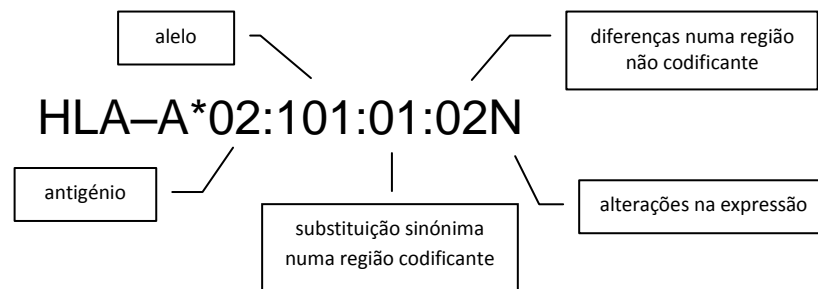


Figura 14 – Nomenclatura HLA. Adaptado de <http://hla.alleles.org>.

Dada a possibilidade de alterações sinónimas na região codificante e alterações em regiões não codificantes, não traduzem alterações na proteína, há alelos descritos que não correspondem a uma nova proteína (Gráfico 6). Os alelos nulos designam alelos não expressos.

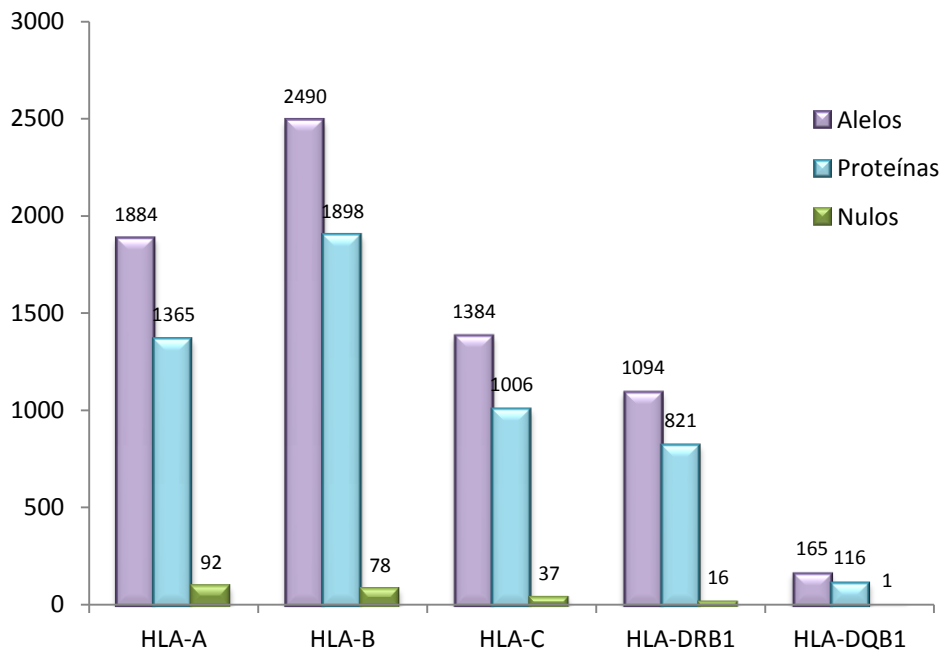


Gráfico 6 – Polimorfismo das moléculas HLA classe I e classe II. Adaptado de <http://hla.alleles.org>.

As técnicas de biologia molecular utilizadas para a genotipagem HLA Classe I/II são baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo usado o método de baixa resolução, a PCR-*Single Specific Oligonucleotide* (SSO), e o método de alta resolução a PCR-*Sequence Based Typing* (SBT). Alternativamente pode ser usado o método de PCR-*Single Specific Primer* (SSP) para a baixa ou alta resolução.

O método de PCR-SSO consiste na amplificação do locus HLA e posterior hibridização do produto amplificado, com oligonucleótidos. A hibridização varia consoante o suporte para os oligonucleótidos, que podem estar em tiras de nitrocelulose ou em esferas magnéticas. Cada esfera magnética possui um oligonucleótido diferente, marcado com um fluorocromo, e é distinguida pela sua cor no sistema Luminex® que possui dois lasers (Figura 15).

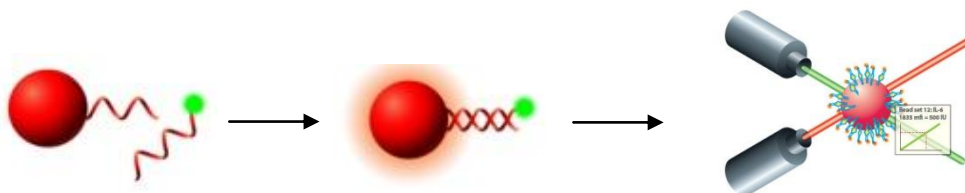


Figura 15 - Sistema Luminex para a Genotipagem HLA. Adaptado de <http://www.luminex.com>.

O método de PCR-SSP baseia-se na amplificação com posterior eletroforese em gel de agarose, de forma a avaliar quais os produtos amplificados (Figura 16). Como os *primers* colocados nos poços das placas são conhecidos, é possível concluir quais os alelos amplificados. Neste método todos os poços possuem uma sequência controlo que deve amplificar para validação do teste.

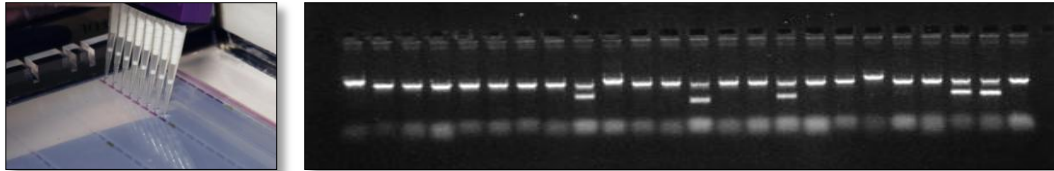


Figura 16 – Método de PCR-SSP para a genotipagem HLA.

Finalmente, o método de PCR-SBT consiste na amplificação por PCR com posterior sequenciação dos exões pretendidos e eletroforese capilar. É o método de alta resolução de eleição utilizado, sendo obrigatória a sequenciação dos exões dois e três para a classe I e do exão dois para a classe II, de acordo com as normas de Acreditação da Federação Europeia de Imunogenética (EFI). Após a amplificação e sequenciação são necessários passos de purificação, antes da eletroforese capilar. Os resultados são obtidos em eletroferogramas, cuja interpretação é efetuada com o auxílio de programas próprios (Figura 17).

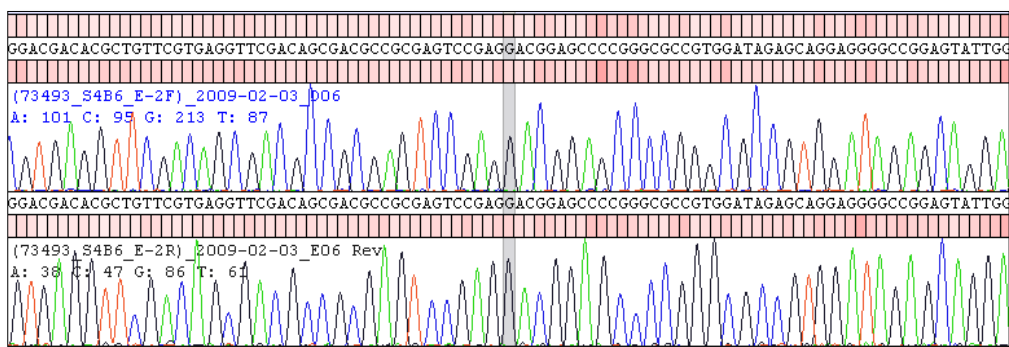


Figura 17 – Exemplo de eletroferogramas obtidos com o método de PCR-SBT para o *locus* HLA-DRB1.

5. PESQUISA DE DADOR COMPATÍVEL

Na transplantação hematopoiética é necessário que exista um mínimo de compatibilidade HLA entre dador e recetor⁶⁹. Por este motivo, a pesquisa de dador inicia-se entre os familiares diretos, nomeadamente irmãos, uma vez que existem 25% de hipóteses de serem HLA compatíveis.

5.1. ESTUDO FAMILIAR

No estudo familiar efetua-se a genotipagem HLA de baixa resolução, classe I: HLA-A, HLA-B e HLA-C, e classe II: HLA-DRB1 e HLA-DQB1, do doente, progenitores e irmãos. Com os resultados da genotipagem HLA de todos os familiares diretos é possível a determinação haplotípica e concluir se há familiares compatíveis (Figura 18).

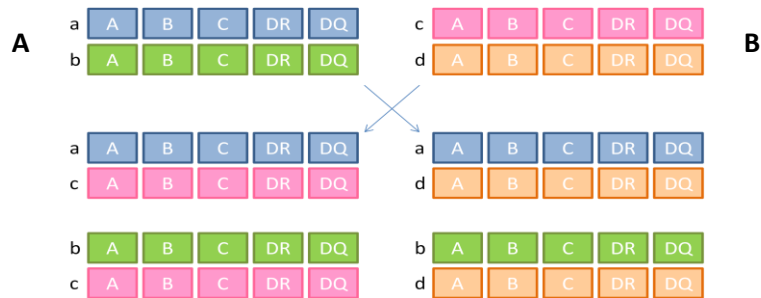


Figura 18 – Esquema ilustrativo das combinações possíveis entre os haplótipos dos progenitores A e B.

Nos casos em que não é possível a determinação dos haplótipos familiares, apenas é possível a conclusão de compatibilidade fenotípica (Figura 19). Nestes casos, é necessário efetuar a genotipagem HLA de alta resolução para determinar o grau de compatibilidade (Figura 20).

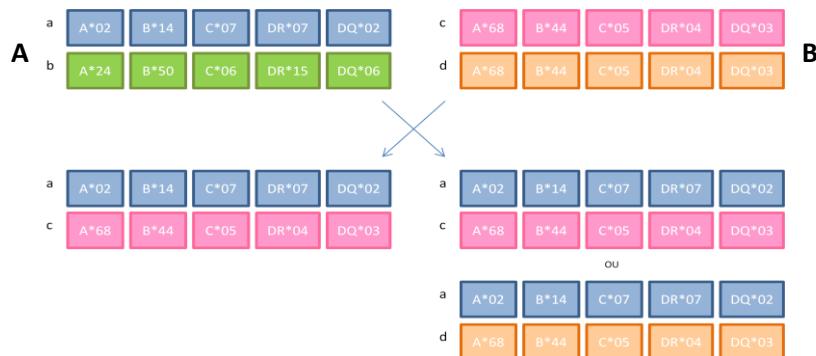


Figura 19 – Genotipagem HLA baixa resolução não permitindo a determinação haplotípica, considerando os progenitores A (ab) e B (cd). Sendo o doente ac, por convenção, o irmão fenotipicamente idêntico pode ser ac ou ad.

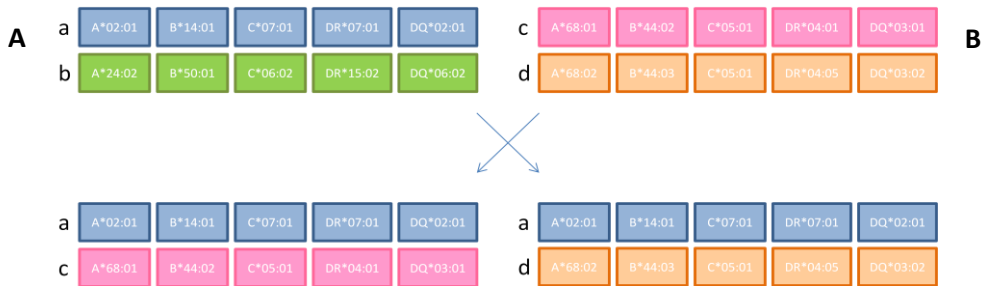


Figura 20 – Esquema exemplificativo de um caso de compatibilidade HLA fenotípica.

A existência de dador compatível entre os familiares é sempre uma melhor opção do que a de um dador não aparentado. Tal facto dever-se-á a compatibilidades não analisadas no sistema Minor de Histocompatibilidade⁷⁰. Os antígenos Minor de Histocompatibilidade (miHA) são polimorfismos celulares existentes em proteínas celulares que podem alterar a apresentação antigénica pelas moléculas HLA e, conseqüentemente, a sua capacidade para reconhecer as células T. Os miHA possuem um papel fundamental na rejeição do enxerto, na indução da doença enxerto-contrahospedeiro (GvHD) e o desenvolvimento do efeito benéfico de enxerto-contraleucemia (GvL)⁷¹.

5.2. PESQUISA DADOR NÃO APARENTADO

Sempre que não existam familiares compatíveis, ou não seja possível que o familiar compatível seja dador, é efetuada uma pesquisa de dador não aparentado ou de unidade de sangue de cordão umbilical, nas bases de dados nacional e internacional.

A listagem de potenciais dadores, para pesquisa preliminar, é fornecida por grau decrescente de compatibilidade. O médico avalia os dadores e seleciona o(s) dador(es) a estudar, considerando vários fatores, tais como a compatibilidade HLA, fiabilidade do banco, sexo, idade, fenotipagem eritrocitária, paridade, infeção por Citomegalovírus (CMV), e estatura (peso/altura) do dador. Preferencialmente, a opção recai em dadores masculinos, mais jovens, com compatibilidade no sistema ABO, sem infeção por CMV e maior estatura. Se a escolha for entre dadoras do sexo feminino, são escolhidas preferencialmente nulíparas. No caso da seleção de unidades de cordão umbilical, a seleção tem em consideração a contagem do número de células nucleadas totais e células CD34⁷².

Considerando todas estas abordagens, aproximadamente 80% dos doentes têm, pelo menos, um potencial dador compatível (em 1991 era de 41%). Esta percentagem subiu exponencialmente depois do esforço que foi feito mundialmente no recrutamento de dadores voluntários.

A pesquisa preliminar, na maioria dos casos, apenas fornece a genotipagem HLA em baixa resolução. Assim, após a seleção do dador é necessário efetuar a genotipagem HLA alta resolução classe I e classe II. Esta análise deve ser efetuada com uma nova amostra do dador, confirmando que não ocorreu troca de amostra e permitindo o contato com o dador, que deve avaliar a sua disponibilidade para a doação.

Por vezes são escolhidos mais de um dador na pesquisa preliminar, aumentando a probabilidade de encontrar um dador idêntico em alta resolução. Após a seleção do dador é efetuado novo contacto com o dador, que é sujeito a uma série de exames físicos, psicológicos e analíticos, no centro de transplantação da sua área de residência.

Finalmente, após o consentimento informado do dador, é marcada a data para a colheita de medula óssea ou células progenitoras periféricas (PBSCs). Esta colheita, idealmente deve ser efetuada no mesmo dia do transplante. No caso de amostras de sangue de cordão, estas são enviadas para o centro de transplantação em contentor criogénico, antes de dar início ao regime de acondicionamento do doente, para o transplante.

6. PROCESSO DE TRANSPLANTE

A transplantação hematopoiética consiste em transfundir ao doente células hematopoiéticas progenitoras saudáveis. Estas células saudáveis substituem as células doentes e asseguram a formação de mais células saudáveis.

O processo de transplante envolve várias fases, o condicionamento do recetor, a infusão de células estaminais, fase neutropénica, fase de enxerto e período pós-transplante.

6.1. CONDICIONAMENTO

O condicionamento tem a duração de 5 a 10 dias e consiste na eliminação das células malignas, criando espaço para as novas células. Os regimes de condicionamento podem ser mieloablativos e não-mieloablativos.

O condicionamento mieloablativo consiste numa combinação de agentes quimioterapêuticos, na dose máxima tolerada, e que determinam uma pancitopenia profunda. O regime de condicionamento mieloablativo pode incluir radioterapia ou apenas quimioterapia (sem radiação). A radiação total do corpo (TBI) foi usada, com dose única, desde o início da transplantação hematopoiética; atualmente ainda é aplicada em alguns casos, mas em doses parciais, o que diminui a toxicidade e aumenta a tolerância. A radioterapia é usada em combinação com ciclofosfamida. O regime de condicionamento baseado apenas em quimioterapia, combina habitualmente ciclofosfamida e busulfan.

Os regimes não-mieloablativos, menos agressivos para os doentes, não eliminam completamente as células malignas previamente ao transplante, usando combinações de fármacos quimioterapêuticos que podem incluir ou não radioterapia. Neste regime, são as células de origem linfóide do dador (células T) que têm o efeito GvL, eliminando as restantes células malignas⁷³. A crescente substituição do regime mieloablativo por este regime evidenciou resultados significativos, reduzindo a mortalidade em doentes mais velhos^{74,75,76} e diminuindo a mortalidade dos doentes em geral, frequentemente associada a infeções pós-transplante⁷⁷.

6.2. INFUSÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS

A infusão de células estaminais é efetuada com um cateter central, tal como numa transfusão de sangue (Figura 21). O tempo de infusão varia de acordo com o volume a infundir.

No caso da infusão de células criopreservadas é necessário um procedimento prévio de lavagens, de forma a reduzir a quantidade de dimetilsulfóxido (DMSO) usado como criopreservante, com efeitos deletérios descritos^{78,79,80}.

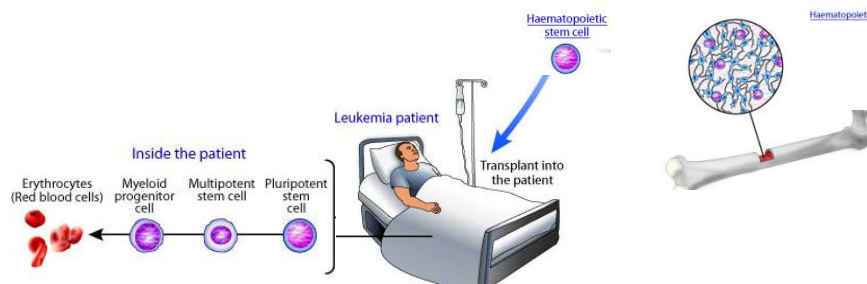


Figura 21 – Esquema ilustrativo da Infusão de células estaminais. Adaptado de <http://stemcelltreatments.org>.

6.3. FASE NEUTROPÉNICA

Durante a fase neutropénica, duas a quatro semanas pós-infusão das células estaminais, há uma diminuição do número absoluto e relativo de neutrófilos circulantes. Por este motivo, é uma fase em que o doente está suscetível a infeções, nomeadamente infeções oportunistas.

De forma a minimizar infeções, que seriam prejudiciais na evolução do transplante, os doentes devem ser isolados^{81,82}. Alguns doentes desenvolvem infeções da mucosa intestinal, mucosite, sendo necessária nutrição parenteral total^{83,84}.

6.4. FASE DE ENXERTO

Durante a fase de enxerto inicia-se o processo de recuperação, com aumento do número de neutrófilos e resolução das infeções adquiridas na fase neutropénica. Nesta fase, a maior preocupação recai na doença enxerto-contra-hospedeiro, quando o sistema imunitário transplantado reage contra as células do próprio.

6.5. FASE PÓS-TRANSPLANTE

A fase pós-transplante é muito longa, entre meses a anos, e inclui o desenvolvimento gradual da tolerância ao transplante com reconstituição imunológica, a libertação da imunossupressão e manuseamento da doença enxerto-contra-hospedeiro. A compatibilidade HLA, regime de condicionamento, a fonte de células estaminais e a idade do recetor são fatores importantes na reconstituição imunológica⁸⁵.

6.5.1. DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO

A doença enxerto-contra-hospedeiro (GvHD) ocorre em cerca de 50% dos transplantes alogénicos realizados. É uma doença mediada pelos linfócitos T do dador contra as células do doente que persistiram, resultando numa série de manifestações clínicas, sendo aguda (aGvHD) ou crónica (cGvHD).

A doença aguda surge nos primeiros três meses pós-transplante e atinge principalmente a pele, o fígado e tubo digestivo. Geralmente a doença limita-se à pele, causando rubor e sensação de calor nas palmas das mãos e dos pés. Nas formas mais graves observa-se também icterícia, quando atinge o fígado, e náuseas, vômitos e diarreia, se atingir o trato intestinal.

A doença crónica surge depois dos 3 meses, atingindo cerca de um terço dos doentes submetidos a transplante alogénico, sendo mais frequente em doentes mais velhos.

A compatibilidade HLA permitiu diminuir a percentagem desta doença, mas ela ocorre mesmo entre transplante com dador aparentado. Um elevado número de células nucleadas é um fator importante para o sucesso do transplante, mas também está associado à GvHD. Outros fatores de risco incluem o *timing* do transplante no decurso da doença, a ocorrência de infeção por citomegalovírus e a fonte de células estaminais⁸⁶.

A ocorrência de algum grau de GvHD pode ser vantajosa devido ao efeito GvL, que permite que o enxerto destrua as células malignas do recetor que permaneceram⁸⁷.

6.5.2. FALÊNCIA DO ENXERTO

Quando o enxerto não consegue reconstituir a medula óssea no doente diz-se que ocorreu falência do enxerto. Ocorre em menos de 5% dos casos de transplante alogénico, estando relacionado com o tipo de transplante e de células estaminais usadas. Quando ocorre o doente deve ser submetido a novo transplante.

7. ESTUDO ANALÍTICO NO PÓS-TRANSPLANTE

Os doentes submetidos a transplantação hematopoiética atravessam uma fase de imunodeficiência prolongada. A reconstituição imunológica após um transplante depende de vários fatores⁸⁶ e é gradual, ou seja, os neutrófilos e as células *natural killer* (NK) recuperam nos primeiros dois meses pós-transplante e a reconstituição das imunidades humoral e celular é significativamente mais lenta⁸⁸.

A análise do quimerismo e deteção da doença residual mínima (DRM) no pós-transplante permite analisar a persistência de células do hospedeiro e células malignas, respetivamente.

7.1. RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA

7.1.1. HEMOGRAMA

O controlo hematológico do recetor imunodeprimido com a análise do hemograma, nomeadamente a contagem diferencial absoluta e relativa dos neutrófilos, é muito importante no pós-transplante hematopoiético. Desta forma, periodicamente é efetuado um hemograma completo (Figura 22).

Para este estudo é efetuada uma colheita com anticoagulante (EDTA) e as contagens são efetuadas através de sistemas automatizados que baseiam a sua tecnologia em citometria de fluxo. Durante a fase neutropénica, dado o baixo número destas células, a contagem é confirmada manualmente em câmara de *Neubauer*.

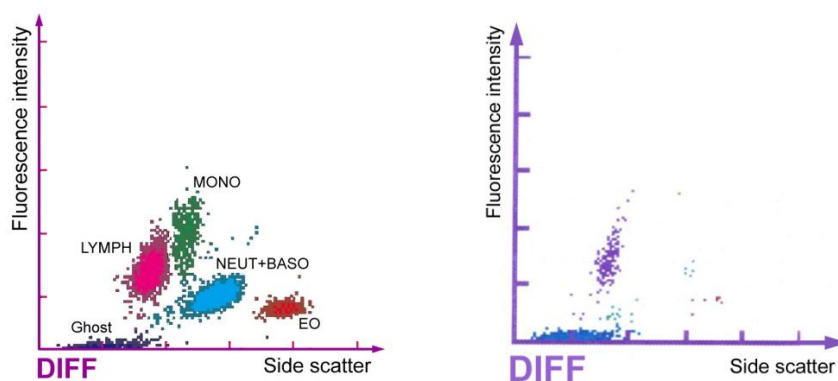


Figura 22 – Esquema representativo de contagens diferencial: A) Gráfico referência, B) Granulocitopenia. Adaptado de <http://www.sysmex.co.za>.

7.1.2. IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem permite a avaliação da reconstituição imunológica pós-transplante hematopoiético pela caracterização da população celular em amostras de sangue periférico ou de medula óssea⁸⁹. Para isso são usados anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, dirigidos contra antígenos à superfície das células, o que permite a análise por citometria de fluxo (Figura 23).

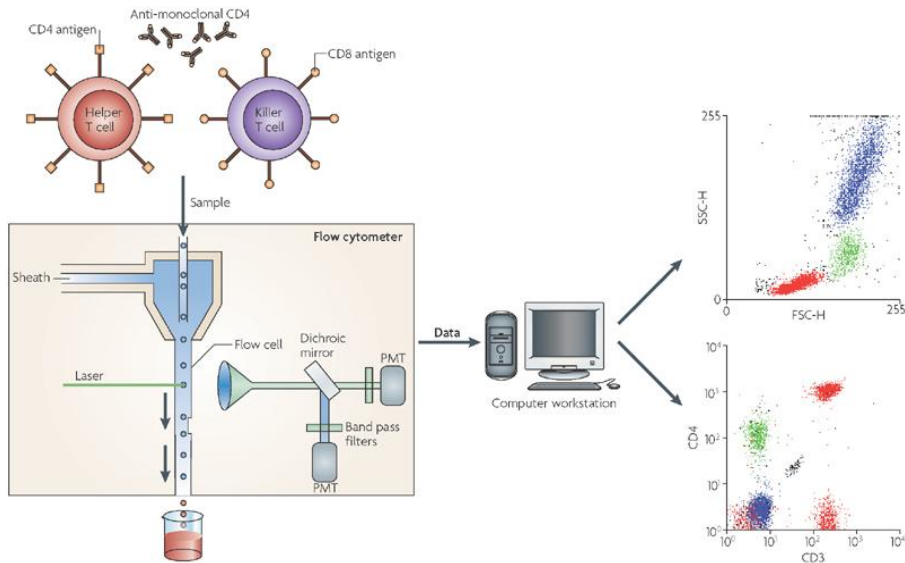


Figura 23 – Esquema representativo do procedimento de Imunofenotipagem. Adaptado de <http://www.nature.com>.

7.2. QUIMERISMO

O quimerismo designa um organismo que possui duas ou mais populações genéticas distintas, provenientes de zigotos diferentes. No transplante hematopoiético alogénico em que ocorre substituição hematopoiética completa com as células do dador, o quimerismo é completo ou total. No caso em que há persistência de células do recetor, com coexistência de células do dador e recetor, o quimerismo designa-se misto⁹⁰.

A determinação da percentagem de quimerismo permite avaliar o sucesso do transplante e a probabilidade da ocorrência de GvHD^{91,92}. A existência de quimerismo misto estável tem sido associada a tolerância, importante para o sucesso do transplante^{93,94}. A análise do quimerismo pode ser efetuada por citogenética ou pela análise de marcadores genéticos informativos, como microssatélites⁹⁵ (STR) ou polimorfismos genéticos (SNPs).

7.2.1. ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética consiste na determinação do cariótipo que refere o número total de cromossomas e identifica os cromossomas sexuais. Esta metodologia pode ser usada na análise do quimerismo em casos de transplante com um dador do sexo oposto, calculando a percentagem de metáfases XX e XY.

7.2.2. ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

A análise de microsatélites (STR) consiste na amplificação de marcadores genéticos informativos, permitindo avaliar a percentagem de quimerismo mesmo quando o dador é do mesmo sexo que o recetor. Esta análise deve ser efetuada na amostra do dador e recetor antes do transplante, determinando quais os marcadores informativos a usar na análise pós-transplante (Figura 24).

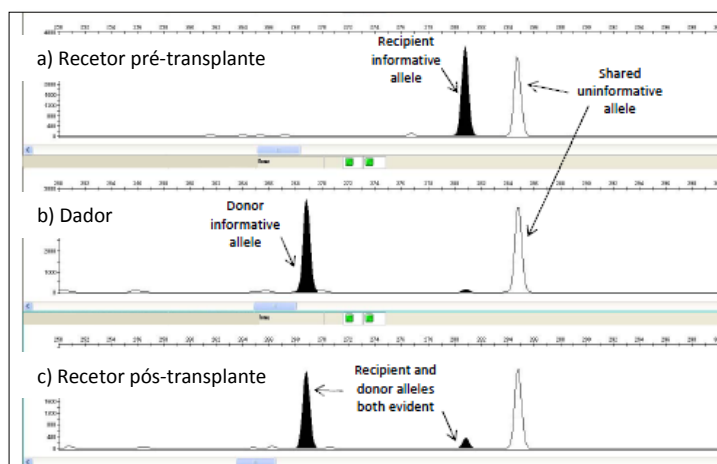


Figura 24 - Marcadores STR no recetor pré-transplante(a), no dador (b) e recetor pós-transplante (c). Adaptado de <http://www.nhsbt.nhs.uk>.

Esta determinação é efetuada em sangue total ou em subpopulações celulares, com o auxílio de separação celular efetuada por citometria de fluxo. A análise do quimerismo nas diferentes subpopulações permite determinar a correta percentagem de quimerismo para as diferentes linhagens celulares (Figura 25). Esta abordagem possui maior sensibilidade que a análise em sangue total, permitindo visualizar quimerismo misto, não visível em sangue total⁹⁶.

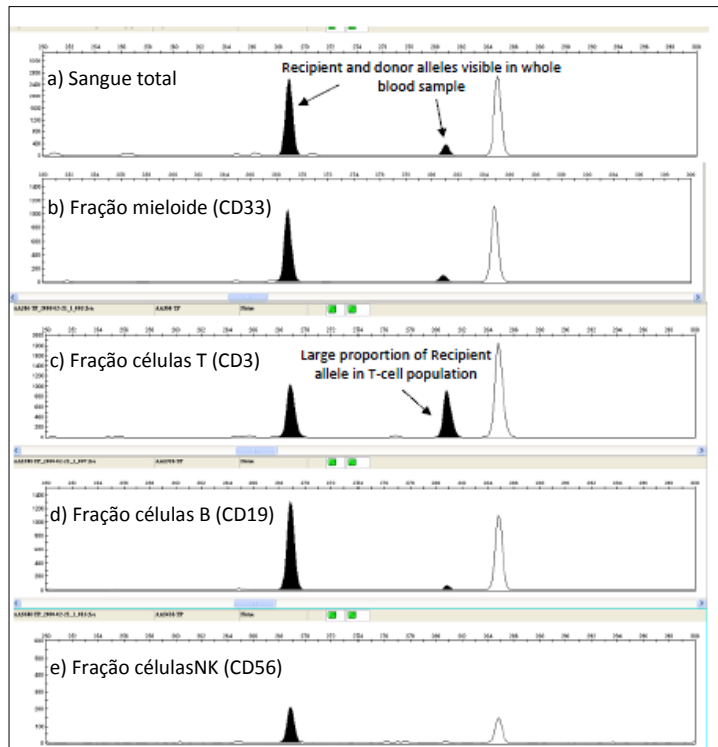


Figura 25 – Análise do Quimerismo pós-transplante em diferentes linhagens celulares: sangue total e frações mielóide (CD33) e linfóide, células T (CD3), células B (CD19) e células NK (CD56). Adaptado de <http://www.nhsbt.nhs.uk>.

7.2.3. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

A análise de quimerismo pela determinação de polimorfismos genéticos (SNP) por PCR em tempo real tem sido uma metodologia alternativa utilizada^{97,98}. Esta metodologia possui uma sensibilidade superior na deteção de recaídas pós-transplante^{99,100}.

Para esta análise são efetuadas sucessivas diluições do DNA do recetor com o DNA do dador e são determinadas as curvas padrão. A percentagem de quimerismo é determinada por comparação com as curvas padrão efetuadas (Figura 26).

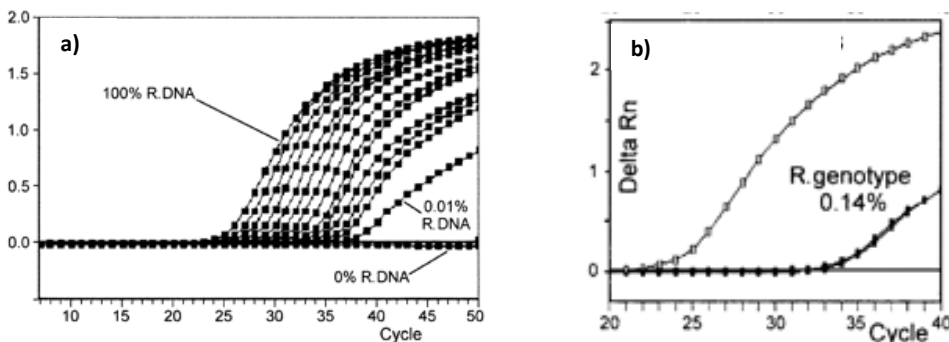


Figura 26 – Análise do quimerismo por SNP-PCR. Adaptado de Alizadeh *et al* 2002.

7.3. DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

A doença residual mínima corresponde no número de células neoplásicas detetáveis, durante ou após o tratamento da doença. A percentagem destas células está associada com a recaída da doença.

7.3.1. ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de neoplasias pela análise do cariógrama, detetando anomalias primárias e secundárias. As anomalias primárias são as primeiras alterações em células neoplásicas e são frequentemente encontradas como anomalias cariotípicas únicas e específicas da patologia. As anomalias secundárias nunca, ou raramente, são encontradas sozinhas, pois desenvolvem-se em células que já possuem anomalias primárias. Em estadios avançados de doença as anomalias podem ser tão numerosas que dominam completamente o cariótipo (Figura 27).

No pós-transplante hematopoiético, a análise citogenética de amostras de sangue periférico ou medula óssea permite avaliar a percentagem de metáfases que persistem com a anomalia primária inicial e o número de anomalias secundárias subsequentes.



Figura 27 - Exemplo de um cariógrama neoplásico. Adaptado de <http://www.upci.upmc.edu>.

7.3.2. HIBRIDIZAÇÃO *in situ* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Em alguns casos é útil a análise citogenética molecular em detrimento da análise citogenética convencional, com o uso de métodos como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)¹⁰¹. A grande vantagem desta metodologia é a possibilidade de visualização dos resultados em núcleos em interfase, o que permite maior rapidez na obtenção dos resultados.

As sondas FISH usadas no estudo de neoplasias incluem sondas de sequência única e sondas específicas para confirmação de translocações¹⁰², sondas de quebra¹⁰³ e de fusão (Figura 28).

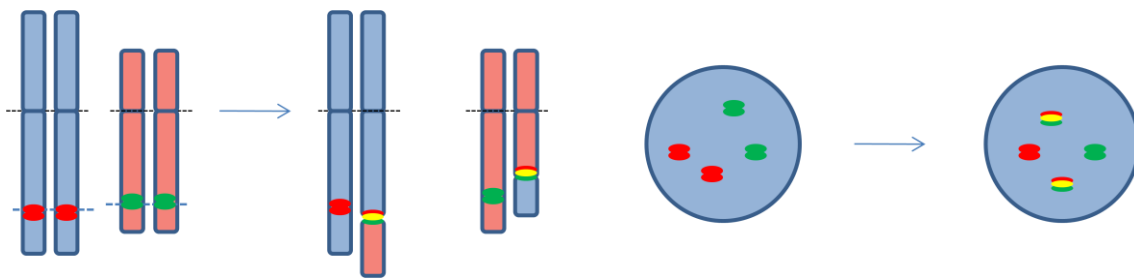


Figura 28 – Esquema representativo de sondas FISH de fusão, em cromossomas e núcleos em interfase.

7.3.3. IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem permite a deteção da DRM pela seleção de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos aberrantes, ou em percentagens alteradas, presentes em células neoplásicas. É uma metodologia sensível usada em várias patologias¹⁰⁴.

7.3.4. ANÁLISE QUANTITATIVA POR *Reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR)

O método de RT-PCR é muito sensível e permite a avaliação da DRM pela deteção e quantificação do nível de expressão de transcritos neoplásicos que resultam de rearranjos cromossómicos¹⁰⁵. É o caso da quantificação de transcritos BCR-ABL, resultantes da translocação t(9;22), na leucemia mieloide crónica^{106,107}.

8. TRANSPLANTAÇÃO EM PORTUGAL

A transplantação de medula óssea iniciou-se em Portugal em 1987, no IPO de Lisboa¹⁰⁸. Paralelamente, foi criada a Unidade de Transplante de Medula (UTM) do IPO do Porto, que iniciou a sua atividade em 1988. Realizou o primeiro transplante de medula óssea alogénico com dador aparentado, em 1989. Em 1996 realizou o primeiro transplante alogénico a partir de um enxerto de células do sangue de cordão umbilical e quatro anos mais tarde realizou o primeiro transplante de medula óssea alogénico com dador adulto não aparentado.

O processo que decorre até à realização do transplante de medula óssea é longo e em muitos casos envolve várias pesquisas preliminares e o estudo de vários potenciais dadores, até que se encontre um dador com a compatibilidade mínima necessária e seja proposto o transplante. O presente capítulo tem como objetivo a análise do processo de pesquisa e estudos dos dadores, realizados pelo Centro de Histocompatibilidade do Norte (CHN) no ano de 2010.

8.1. ESTUDOS FAMILIARES

No ano de 2010 foram propostos para transplante de medula óssea 136 doentes. A média de idades dos doentes foi de 40 anos, distribuindo-se por diferentes intervalos de idades (Gráfico 7). Os doentes eram maioritariamente do sexo masculino, representando 61% dos casos (Gráfico 8).

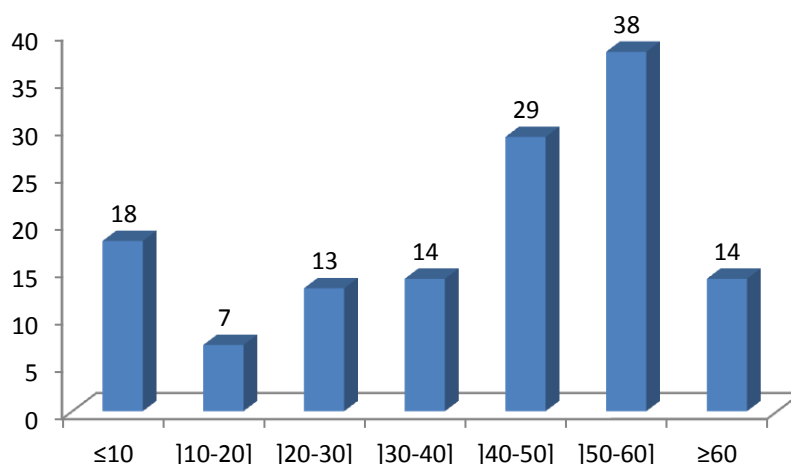


Gráfico 7 – Faixas etárias dos doentes propostos para transplante de medula óssea no ano de 2010, no CHN.

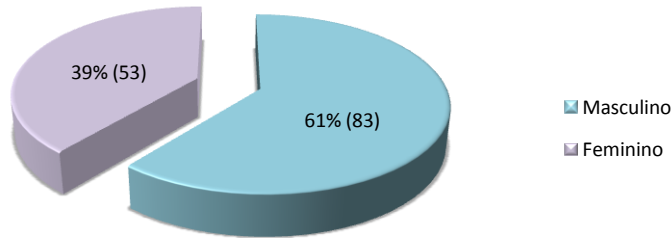


Gráfico 8 – Distribuição dos doentes, por sexo, propostos a transplante, em 2010, no CHN.

Foi efetuado o estudo familiar dos genótipos HLA a 135 dos 136 doentes, pois um dos doentes faleceu antes da sua realização. Foi identificado um dador familiar genotipicamente compatível, em 60 dos 135 doentes (Gráfico 9).

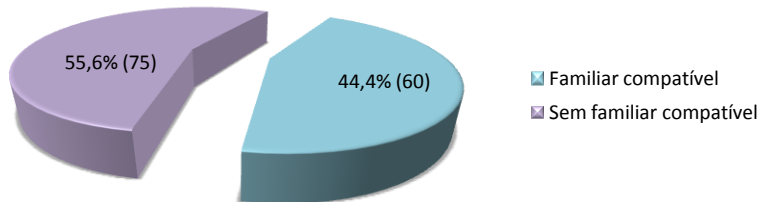


Gráfico 9 – Resultado dos 135 estudos familiares de genotipagem HLA, em 2010, no CHN.

8.2. PESQUISA DE DADOR NÃO APARENTADO

Apesar de 75 doentes não possuírem dador familiar compatível, apenas foi solicitada a pesquisa de dador não aparentado para 40 doentes (Gráfico 10). Tal facto deve-se à não recomendação deste tipo de transplante a todo o tipo de doentes.

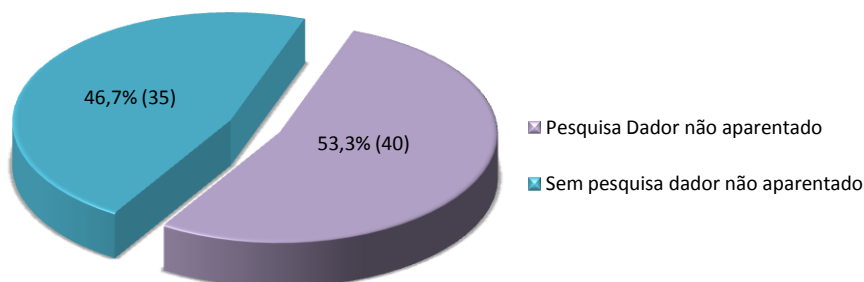


Gráfico 10 – Distribuição dos doentes propostos a transplante alogénico com dador não aparentado, em 2010, no CHN.

De forma a garantir que se encontra um dador compatível e, principalmente nos casos mais graves, em que tem de atuar-se rapidamente, são estudados mais de um dador para cada doente. Assim, para os 40 doentes foram estudados 98 dadores, entre dadores voluntários de medula óssea de registos nacional e internacional e de bancos públicos de unidades de sangues de cordão umbilical (Gráfico 11).

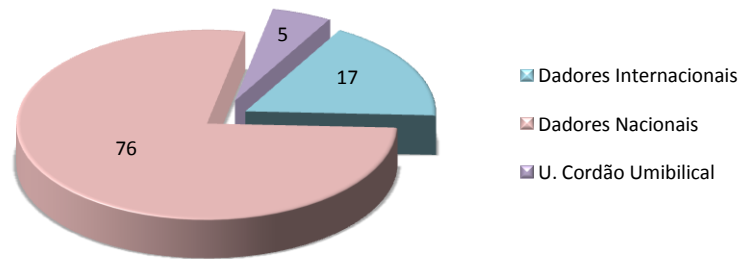


Gráfico 11 – Distribuição dos dadores não aparentados estudados em 2010, no CHN.

8.3. PEDIDOS DE ENXERTO PARA TRANSPLANTE

Apesar da pesquisa de dadores não aparentados para 40 doentes propostos para transplante, apenas foi pedido enxerto para a realização do transplante em 17 doentes (Gráfico 12). Dos restantes doentes, 18 ainda aguardam o pedido de enxerto, 4 faleceram e 1 recusou o transplante.

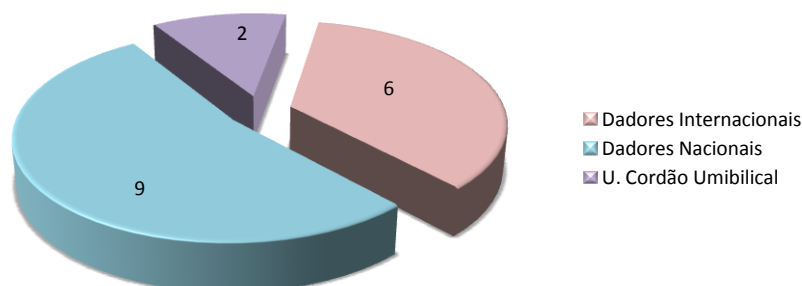


Gráfico 12 – Distribuição dos enxertos solicitados para transplante hematopoiético em 2010, no CHN.

Os dadores não aparentados escolhidos para transplante de medula óssea possuem mais de 8 em 10 compatibilidades HLA com o recetor (Gráfico 13). As incompatibilidades existentes são em baixa ou alta resolução, antigénicas ou alélicas respetivamente.

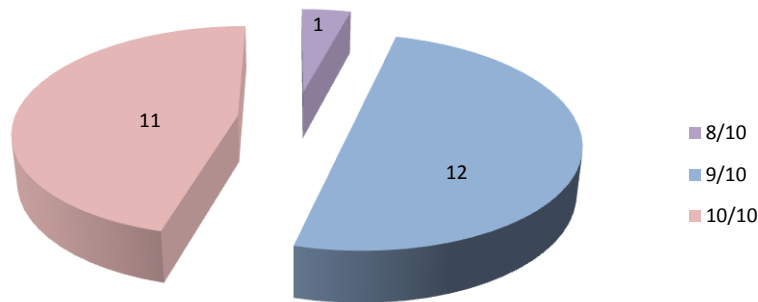


Gráfico 13 – Número de compatibilidades HLA dos enxertos solicitados para transplante em 2010, no CHN.

A avaliação do número de enxertos solicitados na região Norte em 2010, considerando apenas os estudos realizados em 2010, é muito baixo, pois são processos muito morosos, que poderão resultar em transplantes nos anos seguintes.

De acordo com os números disponibilizados pela Autoridade para os Serviços do Sangue e da Transplantação (ASST), foram realizados em Portugal 418 transplantes hematopoiéticos no ano de 2010 (Gráfico 14), dos quais 286 foram transplantes autólogos, 80 transplantes alogénicos com doadores aparentados e 52 com doadores não aparentados (Gráfico 15).

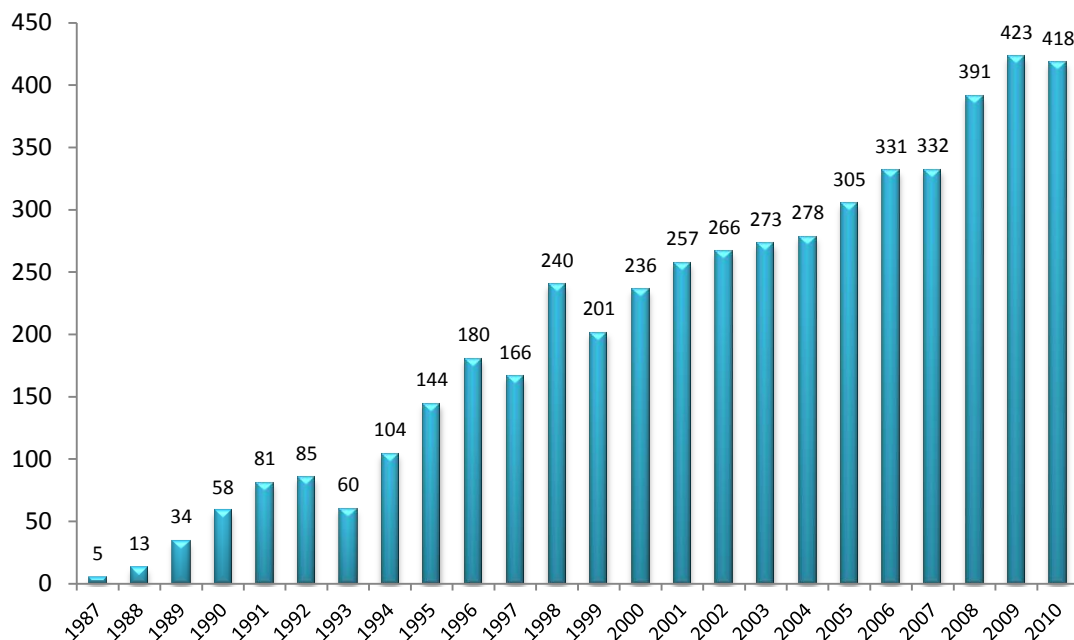


Gráfico 14 – Evolução da transplantação hematopoiética em Portugal. Adaptado do relatório estatístico 2010 da ASST.

A evolução da transplantação alogénica deve-se à evolução dos transplantes com dadores não aparentados de registos de dadores nacionais e internacionais (Gráfico 15).

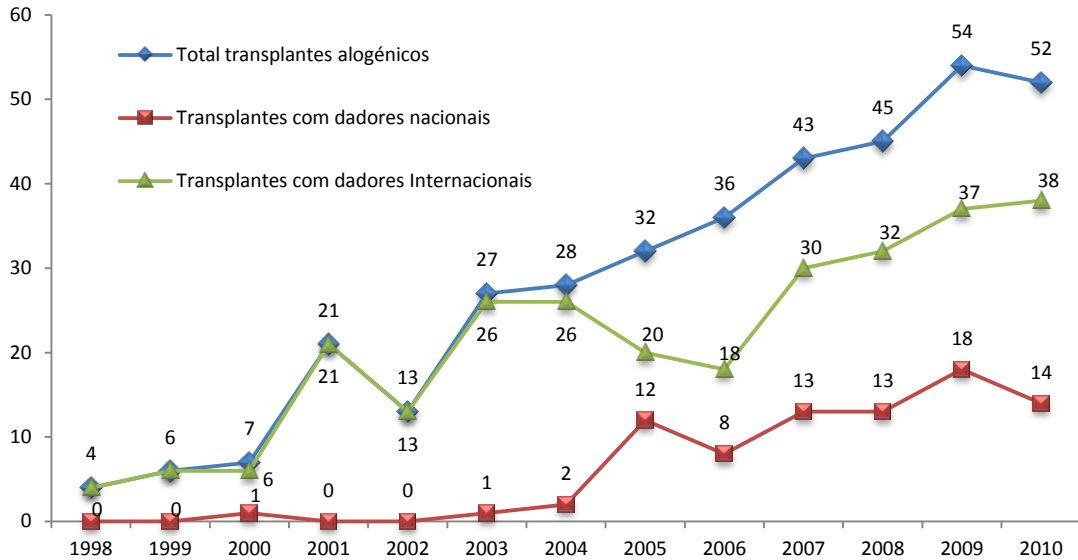


Gráfico 15 - Números de transplantes realizados em Portugal, com dadores não aparentados. Adaptado do relatório estatístico de 2010 da ASST.

A transplantação alogénica tem privilegiado o uso das células estaminais hematopoiéticas periféricas (Gráfico 16). É de salientar a baixa utilização das células do sangue de cordão umbilical na transplantação hematopoiética em Portugal.

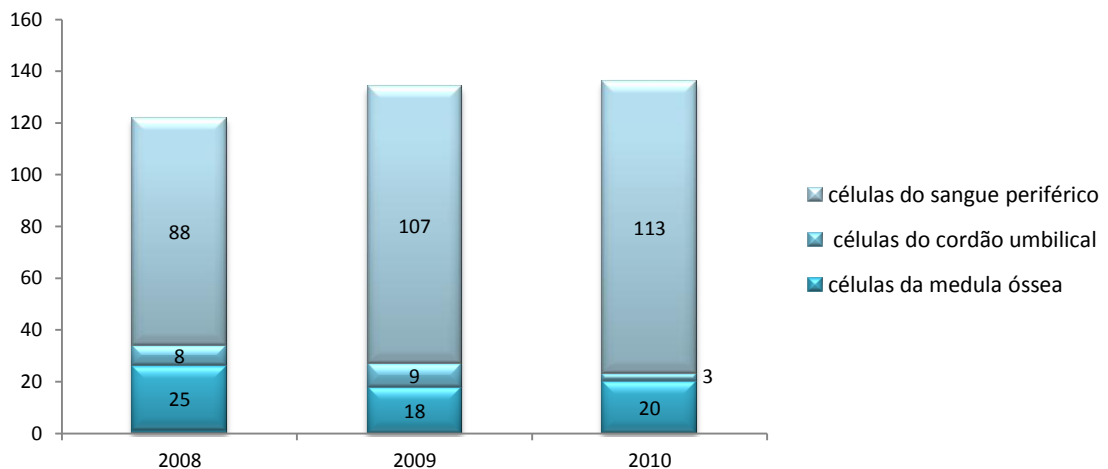


Gráfico 16 – Números de transplantes hematopoiéticos realizados nas três principais unidades de transplante (IPO Porto, IPO Lisboa e Hospital de Santa Marta) e as diferentes fontes de células estaminais. Adaptado do relatório estatístico de 2010 da ASST.

9. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

São vários os trabalhos de investigação na área da transplantação de progenitores hematopoiéticos e células estaminais hematopoiéticas.

A terapia genética é uma área de investigação muito promissora, em que há correção genética e infusão das células autólogas após correção¹⁰⁹. Este tipo de transplante diminuiria a necessidade de quimioterapia no condicionamento e os riscos de GvHD seriam mínimos¹¹⁰.

As células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) por estimulação da diferenciação celular de células adultas, são mais uma esperança para os doentes¹¹¹. Contudo, a indução de pluripotencia tem sido associada a elevado risco de mutações somáticas^{112,113}, sendo ainda necessária uma extensa avaliação genética destas células para que possam ser usadas no contexto clínico.

Por outro lado, a expansão *in vitro* de células estaminais¹¹⁴, a partir de unidades de sangue de cordão umbilical, tem sido largamente estudada com o objetivo de possibilitar o uso de amostras com baixo número de células e permitir a perpetuação de unidades com genotipagens HLA pouco frequentes. O uso destas células após expansão é ainda objeto de estudo no sentido de assegurar a segurança na aplicação destas células *in vivo*^{115,116}.

O tecido do cordão umbilical é também uma fonte de células estaminais mesenquimais ou mesenquimatosas (MSC)^{117,118}, células multipotentes do estroma, com elevado potencial regenerativo¹¹⁹. Podem ser isoladas de tecidos adultos, como tecido muscular, medula óssea, tecido adiposo, cartilagem, osso, e tecidos fetais tais como fígado fetal, líquido amniótico e cordão umbilical, com diferentes capacidades de diferenciação¹²⁰. Estas células possuem baixa imunogenicidade, permitindo o transplante sem compatibilidade, e apresentam elevada capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares, com elevado potencial na medicina regenerativa¹²¹. Apesar desta capacidade de diferenciação não abranger as células estaminais hematopoiéticas, potenciam a sua expansão¹²² e favorecem o sucesso do transplante hematopoiético pela diminuição da incidência da GvHD^{123,124}. A facilidade de isolamento, cultura e expansão destas células^{125,126}, aliada à segurança na sua utilização, abrem um novo caminho de esperança a cientistas e doentes.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Thomas ED, Lochte HJ Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257(11): 491-496.
- ² Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 2(7583): 1366-1369.
- ³ Lawley TJ, Peck GL, Moutsopoulos HM, Gratwohl AA, Deisseroth AB. Scleroderma, Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977; 87: 707-709.
- ⁴ Siimes MA, Johansson E, Rapola J. Scleroderma-like graft-versus host disease as late consequence of bone-marrow grafting. *Lancet* 1977; 2: 831-832.
- ⁵ Storb R, Thomas ED, Buckner CD, *et al.* Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia. *Blood* 1974; 43: 157-180.
- ⁶ Storb R, Prentice RL, Sullivan KM, *et al.* Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Ann Intern Med* 1983; 98: 461-466.
- ⁷ Goerner M, Gooley T, Flowers M, Sullivan KM, Kiem HP, Sanders JE, *et al.* Morbidity and mortality of chronic GvHD after hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings for patients with aplastic or refractory anemias. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 47-56.
- ⁸ Borel JF and Wiesinger D. Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Br J Pharmacol* 1979; 66(1): 66P-67P.
- ⁹ Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321(17): 1174-1178.
- ¹⁰ Rubenstein P, Carrier C, Scaradavou A, *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; 339: 1565-1577.
- ¹¹ Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, Chapuis B, *et al.* High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 87(10): 4455-4462.
- ¹² Vierbuchen T, Wernig M, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463 (7284): 1035-1041.
- ¹³ Seita J and Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews WIREs Syst Biol Med* 2010; 2(6): 640-653.
- ¹⁴ Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81:2844-2853.
- ¹⁵ Orkin SH, *et al.* Hematopoiesis and stem cells: plasticity *versus* developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 3: 323-328.
- ¹⁶ Wulf GG, *et al.* Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol*. 2001; 29: 1361-1370.
- ¹⁷ Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2804-2808.
- ¹⁸ D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1996; 81: 404-409.
- ¹⁹ Andrews RG, *et al.* CD34⁺ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* 1992; 80: 1693-1701.
- ²⁰ Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2010; 115: 957-964.

-
- ²¹ Hosoya N, Miyagawa K, Mimura T, Hoshide S, Akazawa H, Kanda Y, *et al.* Malignant hyperthermia induced by general anesthesia for bone marrow harvesting. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(5): 509-511.
- ²² Bosi A, Bartolozzi B. Safety of bone marrow stem cell donation: a review. *Transplant Proc* 2010; 42(6): 2192-2194.
- ²³ Couban S, Messner HA, Andreou P, Egan B, Price S, Tinker L, *et al.* Bone marrow mobilized with granulocyte colony-stimulating factor in related allogeneic transplant recipients: A study of 29 Patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 422-427.
- ²⁴ Gutierrez-Delgado F, Bensinger W. Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Curr Opin Hematol* 2001; 8(3): 155-160.
- ²⁵ Martino M, Fedele R, Massara E, Recchia AG, Irrera G, Morabito F. Long-term safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors: is it all clear? *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(5): 609-621.
- ²⁶ Körbling M, and Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117 (24): 6411-6416.
- ²⁷ Majhail NS, Brunstein CG, Wagner JE. Double umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(5): 571-575.
- ²⁸ Rocha V, Crotta A, Ruggeri A, Purtill D, Boudjedir K, Herr AL, *et al.* Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 223–229.
- ²⁹ Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002; 100(5): 1611-1618.
- ³⁰ Reboredo N, Díaz A, Castro A and Villaescusa RG. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2000; 26: 1263–1270.
- ³¹ Solves P, Mirabet V, Blanquer A, Delgado-Rosas F, Planelles D, Andrade M, *et al.* A new automatic device for routine cord blood banking: critical analysis of different volume reduction methodologies. *Cytotherapy*. 2009; 11(8): 1101-1107.
- ³² Solves P, Mirabet V, Roig R. Volume reduction in routine cord blood banking. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5(4): 362-366.
- ³³ Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(2): 503-509.
- ³⁴ Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, Malerba C, Suppo G, Lasorella R, *et al.* Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant Proc* 2006; 38(4): 1174-1176.
- ³⁵ Harris DT, Wang J, He X, Brett SC, Moore ME, Brown H. Studies on practical issues for cord blood banking: effects of ionizing radiation and cryopreservation variables. *The Open Stem Cell Journal* 2010; 2: 37-44.
- ³⁶ Prat-Arrojo I, Ponce-Verdugo L, Hernández-Lamas MC, Rodríguez-Pena R, Antúnez C, Sánchez-Gordo F, *et al.* Influence on time to cryopreservation in umbilical cord blood units. *Int J Clin Med* 2011; 2: 399-403.
- ³⁷ Armitage S. Cord blood processing: volume reduction. *Cell Preserv Technol* 2006, 4(1): 9-16.
- ³⁸ Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3: 229-236.
- ³⁹ Miller JP, Perry EH, Price TH, Bolan CD Jr, Karanes C, Boyd TM, *et al.* Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(9 Suppl): 29-36.

-
- ⁴⁰ Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8: 257-260.
- ⁴¹ Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, *et al*. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344(14): 1031–1037.
- ⁴² Bachanova V, Weisdorf D. Unrelated donor allogeneic transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: a review. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 455–464.
- ⁴³ Tyndall A, Saccardi R. Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. *Clin Exp Immunol*. 2005; 141(1): 1-9.
- ⁴⁴ Hügler T, Daikeler T. Stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Haematol* 2010; 95(2): 185-188.
- ⁴⁵ Benjamin RJ, McGurk S, Ralston MS, Churchill WH, Antin JH. ABO incompatibility as an adverse risk factor for survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion* 1999; 39(2): 179-187.
- ⁴⁶ Stevens CE, Gladstone J, Taylor PE, Scaradavou A, Migliaccio AR, Visser J, *et al*. Placental/umbilical cord blood for unrelated-donor bone marrow reconstitution: relevance of nucleated red blood cells. *Blood* 2002; 100(7):2662-2664.
- ⁴⁷ Larghero J, Rea D, Brossard Y, Van Niftrik J, Delasse V, Robert I, *et al*. Prospective flow cytometric evaluation of nucleated red blood cells in cord blood units and relationship with nucleated and CD34(+) cell quantification. *Transfusion* 2006; 46(3): 403-406.
- ⁴⁸ Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, *et al*. Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:967–972.
- ⁴⁹ Heimfeld S. Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell transplantation? *Leukemia* 2003; 17: 856–858.
- ⁵⁰ Van Epps DE, Bender J, Lee W, Schilling M, Smith A, Smith S, *et al*. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells*. 1994; 20(2-3): 411-423.
- ⁵¹ Siena S, Bregni M, Di Nicola M *et al*. Milan protocol for clinical CD34+cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer; in: Wunder E, Sovalat H, Henon PR *et al* (eds): *Hematopoietic stem cells: The Mulhouse manual*. Dayton, AlphaMed Press, 1994: 23-30.
- ⁵² Barnett D, Granger V, Whitby L, Storie I and Reilly JT. Absolute CD4 T-lymphocyte and CD34 stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward. *Br J Haematol* 1999; 106: 1059-1062.
- ⁵³ Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R and Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*. 1998; 34: 61–70.
- ⁵⁴ Moretti S, Dabusti M, Castagnari B, Tieghi A, Ferrari L, Campioni D, *et al*. Comparison of single and dual platform methodologies for the estimation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: correlation with colony assay. *Int J Biol Markers* 2002; 17(4): 259-267.
- ⁵⁵ Menéndez P, Redondo O, Rodríguez A, Lopez-Berges MC, Ercilla G, López A, *et al*. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* 1998; 34(6): 264-271.
- ⁵⁶ Gratama JW, Menéndez P, Kraan J, Orfao A. Loss of CD34(+) hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. *J Immunol Methods* 2000; 239(1-2): 13-23.

-
- ⁵⁷ Sartor M, Antonenas V, Garvin F, Webb M, Bradstock KF. Recovery of viable CD34 cells from cryopreserved hematopoietic progenitor cell products. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 199–204.
- ⁵⁸ Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB, *et al.* Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion* 2012; 52(3): 549-559.
- ⁵⁹ Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000; 96: 2717-2722.
- ⁶⁰ Pereira C, Clarke E, Damen J. Hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol* 2007; 407: 177-208.
- ⁶¹ Prasad VK, Mendizabal A, Parikh SH, Szabolcs P, Driscoll TA, Page K, *et al.* Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood* 2008; 112: 2979-2989.
- ⁶² Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, *et al.* Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1362-1374.
- ⁶³ Rodríguez L, García J, Querol S. Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 247-251.
- ⁶⁴ Spellman S, Hurley CK, Brady C, Phillips-Johnson L, Chow R, *et al.* Guidelines for the development and validation of new potency assays for the evaluation of umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2011; 13: 848-855.
- ⁶⁵ Klein J, Sato A. The HLA system, First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343(10): 702-709.
- ⁶⁶ Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. New York: John Wiley, 1986.
- ⁶⁷ Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, *et al.* Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320(4): 197-204.
- ⁶⁸ Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, *et al.* High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; 110(13): 4576-4583.
- ⁶⁹ Hurley CK, Baxter-Lowe LA, Logan B, Karanes C, Anasetti C, Weisdorf D, Confer DL. National marrow donor program HLA-matching guidelines for unrelated marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 610-615.
- ⁷⁰ Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg F, Vossen J, *et al.* Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 281-285.
- ⁷¹ Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003; 31(9): 743-751.
- ⁷² Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Mouldrem J, Carter C, *et al.* CD34 cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996; 88: 3223-3229.
- ⁷³ Antin JH. Stem cell transplantation, harnessing of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Hematol* 2003; 10(6): 440-444.
- ⁷⁴ Couriel DR, Saliba RM, Giral S, *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10(3): 178-185.

-
- ⁷⁵ Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 2005; 24(3): 444-453.
- ⁷⁶ Corradini P, Zallio F, Mariotti J, et al. Effect of age and previous autologous transplantation on nonrelapse mortality and survival in patients treated with reduced-intensity conditioning and allografting for advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005; 23(27): 6690-6698.
- ⁷⁷ Bachanova V, Brunstein CG, Burns LJ, et al. Fewer infections and lower infection-related mortality following non-myeloablative versus myeloablative conditioning for allotransplantation of patients with lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43(3): 237-244.
- ⁷⁸ Rowley SD, MacLeod B, Heimfeld S, Holmberg L, Bensinger W. Severe central nervous system toxicity associated with the infusion of cryopreserved peripheral blood stem cell components. *Cytotherapy* 1999; 1: 311-317.
- ⁷⁹ López-Jiménez J, Cerveró C, Muñoz A, Hernández-Madrid A, Fernández Pineda J, García Laraña J et al. Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 789-793.
- ⁸⁰ Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L, MacLeod B, Heimfeld S. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade. *Cytotherapy* 1999; 1: 439-446.
- ⁸¹ Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17(1): 53-80.
- ⁸² Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. Recommendations and Reports. 2000; 49: 1-128.
- ⁸³ Rodgers C and Walsh T. Nutritional issues in adolescents after bone marrow transplant: A Literature Review *Journal of Pediatric Oncology Nursing*. 2008; 25(5): 254-264.
- ⁸⁴ Muscaritoli M, Grieco G, Capria S, Iori AP and Fanelli FR. Nutritional and metabolic support in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 2002; 75(2): 183-190.
- ⁸⁵ Ball LM, Lankester AC, Bredius RGM, Fibbe WE, Van Tol MJD and Egeler RM. Graft dysfunction and delayed immune reconstitution following haploidentical peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: S35-S38.
- ⁸⁶ Dominiotto A, Raiola AM, van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Berisso G, Bregante S, Frasconi F, Casarino L, Verdiani S, Bacigalupo A. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haemopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose. *Br J Haematol*. 2001; 112(1):219.
- ⁸⁷ Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008; 112: 4371-4383.
- ⁸⁸ Lacerda J. Reconstituição imunológica após transplante alogénico de células estaminais. *Acta Méd Port* 2004; 17: 471-480.
- ⁸⁹ Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H and Ishigatsubo Y. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1275-1281.
- ⁹⁰ Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473-485.
- ⁹¹ Talwar S, Khan F, Nityanand S and Agrawal S. Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39:529-535.
- ⁹² Moscardó F, Sanz J, Senent L, Cantero S, Rubia J, Montesinos P, et al. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica* 2009; 94(6): 827-832.
- ⁹³ Sachs DH. Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Clin Immunol* 2000; 95: S63-S68.

- ⁹⁴ Luo B, Chan WF, Shapiro AM, Anderson CC. Non-myeloablative mixed chimerism approaches and tolerance, a split decision. *Eur J Immunol* 2007; 37(5): 1233-1242.
- ⁹⁵ Fernández-Avilés F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colomer D, Rovira M, Martinez C, *et al.* Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34⁺ selected cells from peripheral blood. *Leukemia* 2003; 17: 613–620.
- ⁹⁶ Goh RY, Kim SH, Han JY. Lineage-specific chimerism analysis in nucleated cells, T cells and natural killer cells after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol.* 2011; 46(1): 18–23.
- ⁹⁷ Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4(3): 177-187.
- ⁹⁸ Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002 15; 99(12): 4618-4625.
- ⁹⁹ Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006; 81(10): 735-746.
- ¹⁰⁰ Eshel R, Vainas O, Shpringer M, Naparstek E. Highly sensitive patient-specific real-time PCR SNP assay for chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation. *Lab Hematol* 2006; 12(1): 39-46.
- ¹⁰¹ Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 131(2):125-134.
- ¹⁰² Cuthbert G, Thompson K, Breese G, McCullough S, Bown N. Sensitivity of FISH in detection of MLL translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29(2): 180-185.
- ¹⁰³ Rijk A, Mason D, Jones M, Cabeçadas J, Crespo M, Cigudosa JC, *et al.* Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J Hematop.* 2008 September; 1(2): 119–126.
- ¹⁰⁴ Orfao A, Ortuño F, Santiago M, Lopez A and San-Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2004; 58A: 62–71.
- ¹⁰⁵ Elmaagacli AH. Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation. *Int J Hematol.* 2002; 76 (2): 204-205.
- ¹⁰⁶ Lee WI, Kantarjian H, Glassman A, Talpaz M and Lee MS. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. *Ann Oncol* 2002; 13 (5): 781-788.
- ¹⁰⁷ Jones CD, Yeung C, and Zehnder JL. Comprehensive validation of a real-time quantitative bcr-abl assay for clinical laboratory use. *Am J Clin Pathol* 2003;120:42-48.
- ¹⁰⁸ Abecasis MM. Bone marrow transplant: current perspectives. *Acta Med Port* 1989; Suppl 2: S16-20.
- ¹⁰⁹ Bank A. Hematopoietic stem cell gene therapy: selecting only the best. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1478–1480.
- ¹¹⁰ Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, *et al.* Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004; 364: 2181–2187.
- ¹¹¹ Rao M, Ahrlund-Richter L, Kaufman DS. Concise review: cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities. *Stem Cells* 2012; 30: 55–60.

-
- ¹¹² Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 63-67.
- ¹¹³ Ji J, Ng SH, Sharma V, Neculai D, Hussein S, Sam M, *et al.* Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(3): 435-440.
- ¹¹⁴ Tung SS, Parmar S, Robinson SN, Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23(2): 245–257
- ¹¹⁵ Chou S, Chu P, Hwang W, Lodish H. Expansion of human cord blood hematopoietic stem cells for transplantation. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 427-428.
- ¹¹⁶ Sauvageau G, Humphries RK. The blood stem cell, Holy Grail? *Science* 2010; 329(5997): 1291-1292.
- ¹¹⁷ Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5): 1669-1675.
- ¹¹⁸ Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, *et al.* Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2012; 14(4): 441-450.
- ¹¹⁹ Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2896-2902.
- ¹²⁰ Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-1301.
- ¹²¹ Rodríguez R, García-Castro J, Trigueros C, García Arranz M, Menéndez P. Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. *Adv Exp Med Biol* 2012; 741: 187-205.
- ¹²² Fong CY, Gauthaman K, Cheyyatraivendran S, Lin HD, Biswas A, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. *J Cell Biochem* 2012; 113(2): 658-668.
- ¹²³ Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(6): 358-363.
- ¹²⁴ Toubai T, Paczesny S, Shono Y, Tanaka J, Lowler KP, Malter CT, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4: 252-259.
- ¹²⁵ Majd H, Wipff PJ, Buscemi L, Bueno M, Vonwil D, Quinn TM, Hinz B. A novel method of dynamic culture surface expansion improves mesenchymal stem cell proliferation and phenotype. *Stem Cells* 2009; 27(1): 200-209.
- ¹²⁶ Majd H, Quinn TM, Wipff PJ, Hinz B. Dynamic expansion culture for mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 2011; 698: 175-188.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL DO 2º CICLO DE ESTUDOS CONDUCENTE AO GRAU DE MESTRE EM ANÁLISES CLÍNICAS

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DA DRA. MANUELA
RIBEIRO NO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DO CENTRO
HOSPITALAR DE SÃO JOÃO (CHSJ)

SANDRA CRISTINA RIBEIRO TAFULO

SETEMBRO, 2012

DECLARAÇÃO

AUTORIZADO A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Porto, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A realização deste estágio apenas foi possível com o apoio e dedicação de várias pessoas, às quais quero deixar a minha profunda e sentida gratidão:

Ao Prof. Tiago Guimarães, por me conceder a possibilidade da realização do estágio no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João.

A todos os profissionais que me acompanharam durante os sete meses de estágio no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João, muito especialmente à minha orientadora Dra. Manuela Ribeiro, pelo seu apoio e orientação.

À Dra. Helena Alves, diretora do Centro de Histocompatibilidade do Norte, pelo apoio constante do serviço à formação contínua.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xxvii
ÍNDICE DE TABELAS	xxix
ABREVIATURAS.....	xxxii
1. LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA.....	59
1.1. HEMOGRAMA COM PLAQUETAS	60
1.1.1. LEUCOGRAMA	60
1.1.2. ERITROGRAMA	63
1.1.3. ANÁLISE PLAQUETÁRIA.....	65
1.1.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	65
1.2. CONTAGENS CELULARES EM LÍQUIDOS BIOLÓGICOS	67
1.3. PESQUISA DE EOSINÓFILOS NA URINA	67
1.4. PESQUISA DE LEUCÓCITOS NAS FEZES	67
1.5. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO ERITROCITÁRIA	68
1.6. HEMOGLOBINA GLICOSILADA	69
2. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	71
2.1. BACTERIOLOGIA E MICOLOGIA	71
2.1.1. EXAME DIRETO	71
2.1.1.1. Coloração pelo método de Gram	72
2.1.1.2. Coloração negativa com Tinta-da-China	73
2.1.2. EXAME CULTURAL	75
2.1.2.1. Seleção de Meios de Cultura	75
2.1.2.2. Sementeira.....	77
2.1.2.3. Análise Macroscópica de Crescimento Microbiológico	78
2.1.2.4. Análise Automática de Crescimento Microbiológico	84
2.1.3. PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO	85
2.1.3.1. Prova da Catalase	85
2.1.3.2. Prova da Coagulase	85
2.1.3.3. Prova da Oxidase	86
2.1.3.4. Teste da Optoquina	87
2.1.3.5. Teste dos Fatores X (Hemina) e V (NAD)	87
2.1.3.6. Prova da Ureia	88
2.1.3.7. Meio Kligler-Iron agar	88
2.1.3.8. Prova de utilização do Citrato.....	89
2.1.3.9. Prova da Filamentação	90

2.1.3.10. Sistema de identificação automático	91
2.1.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS, ANTIBIOGRAMAS.....	92
2.1.4.1. Teste de Suscetibilidade a antibióticos por difusão	92
2.1.4.2. Teste de Suscetibilidade com determinação da CMI.....	93
2.1.4.3. Sistema automático de determinação de suscetibilidade	94
2.1.5. TESTES IMUNOLÓGICOS	95
2.1.5.1. Pesquisa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> na urina.....	95
2.1.5.2. Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i> na urina	95
2.1.5.3. Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i> nas fezes	96
2.1.5.4. Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus nas fezes	96
2.1.5.5. Pesquisa de <i>Cryptosporidium parvum</i>	96
2.2. MICOBACTERIOLOGIA.....	97
2.2.1. PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	97
2.2.2. EXAME DIRETO	98
2.2.2.1. Coloração pelo método de Auramina	98
2.2.2.2. Coloração pelo método de Kinyoun	98
2.2.2.3. Coloração pelo método de Kinyoun modificado	99
2.2.3. EXAME CULTURAL.....	101
2.2.4. PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS.....	103
2.2.4.1. Identificação de micobactérias.....	103
2.2.4.2. Identificação de micobactérias.....	104
2.2.5. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	107
2.3. SEROLOGIA.....	109
2.3.1. PESQUISA DE ANTIGÉNIOS DE <i>Aspergillus spp.</i>	109
2.3.2. PESQUISA DE ANTIGÉNIOS DE <i>Criptococcus neoformans</i>	111
2.3.3. PESQUISA DE ANTICORPOS <i>anti-Salmonella</i> – REAÇÃO DE WIDAL	112
2.3.4. PESQUISA DE ANTICORPOS <i>anti-brucella</i>	113
2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS <i>anti-brucella</i>	114
2.3.6. PESQUISA DE ANTICORPOS HETERÓFILOS.....	115
2.3.7. PESQUISA DE ANTICORPOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA	116
2.3.8. PESQUISA DE ANTICORPOS POR FLUORIMETRIA	118
2.3.8.1. Anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> , IgG e IgM	118
2.3.8.2. Anticorpos anti-toxoplasma IgM.....	119
2.3.8.3. Anticorpos anti-varicela zóster, IgG	119
2.3.9. DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS anti-CMV IgG	120
2.3.10. PESQUISA DE TOXINAS DE <i>Clostridium difficile</i>	121
2.3.11. PESQUISA DE ANTICORPOS <i>anti-toxoplasma</i> IgA	122
2.3.12. PESQUISA DE ANTICORPOS POR ELISA	123

2.3.13. PESQUISA DE ANTICORPOS POR <i>Western-blot</i>	125
2.4. VIROLOGIA.....	127
2.4.1. PESQUISA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS.....	127
2.4.2. PESQUISA DE CITOMEGALOVÍRUS	129
2.4.3. PESQUISA ANTIGÉNICA DE VÍRUS <i>Herpes simplex</i> 1 e 2	130
2.4.4. PESQUISA ANTIGÉNICA DE <i>Legionella pneumophila</i>	131
2.4.5. PESQUISA ANTIGÉNICA DE <i>Pneumocystis jiroveci</i>	132
2.5. PARASITOLOGIA	133
2.5.1. Exame parasitológico de sangue.....	133
2.5.2. Exame parasitológico de fezes	133
2.6. BIOLOGIA MOLECULAR.....	135
2.6.1. Pré-tratamento das amostras	135
2.6.1.1. Amostras do trato respiratório	135
2.6.1.2. Urina	135
2.6.1.3. Biópsias	136
2.6.1.4. Zaragatoas.....	136
2.6.1.5. Sangue.....	136
2.6.1.6. Líquido amniótico.....	136
2.6.1.7. Blocos de parafina	137
2.6.1.8. Produtos com pedidos de pesquisa de Micobactérias	137
2.6.1.9. Produtos com pedidos de pesquisa de fungos.....	137
2.6.2. Extração de ácidos nucleicos	138
2.6.3. Amplificação e deteção de ácidos nucleicos	139
2.6.3.1. SYBR® Green I	139
2.6.3.2. Sondas <i>Taqman</i> ®.....	139
2.6.3.3. Sondas Beacon	140
2.6.3.4. Sondas <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (FRET).....	140
3. LABORATÓRIO DE QUÍMICA CLÍNICA.....	143
3.1. QUÍMICA GERAL.....	143
3.1.1. ENSAIOS DE FOTOMETRIA - OLYMPUS AU5400	143
3.1.2. ENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA - ARCHITECT®	145
3.1.3. ANÁLISE DE ELETRÓLITOS	146
3.1.4. DETERMINAÇÃO DA OSMOLARIDADE SÉRICA E URINÁRIA.....	147
3.1.5. GASIMETRIA	147
3.1.6. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS.....	148
3.1.6.1. Doseamento de Metotrexato	149
3.1.6.2. Doseamento de Acetaminofeno, Benzodiazepinas, Salicilatos e Antidepressivos tricíclicos	149

3.2. URIANÁLISE	150
3.2.1. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	150
3.2.2. URIANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	151
3.2.3. SEDIMENTO URINÁRIO	151
3.2.4. ANÁLISE TOXICOLÓGICA - PESQUISA DE DROGAS DE ABUSO.....	153
3.3. ANÁLISE ÀS FEZES	154
3.3.1. PESQUISA DE SANGUE OCULTO.....	154
3.3.2. PESQUISA DA MÁ ABSORÇÃO INTESTINAL	154
3.4. CROMATOGRÁFIA LÍQUICA A ELEVADA PRESSÃO	155
3.4.1. DOSEAMENTO DE CATECOLAMINAS	155
3.4.2. DOSEAMENTO URINÁRIO DE VMA/HVA/5-HIAA	156
3.4.3. DOSEAMENTO SÉRICO DE VITAMINA A E VITAMINA E	157
3.4.4. PESQUISA DE VARIANTES DE HEMOGLOBINA.....	158
3.5. DOSEAMENTO DE METAIS POR ABSORÇÃO ATÓMICA.....	159
3.6. RASTREIO BIOQUÍMICO PRÉ-NATAL 1ºTRIMESTRE.....	160
3.7. ENDOCRINOLOGIA.....	163
3.7.1. IMUNOENSAIOS DE ELECTROQUIMIOLUMINESCÊNCIA	163
3.7.2. IMUNOENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA	164
3.7.3. DOSEAMENTO DE FÁRMACOS IMUNOSSUPRESSORES	165
3.7.3.1. Doseamento da Ciclosporina	165
3.7.3.2. Doseamento de Tacrolimus	165
3.7.3.3. Doseamento de Sirolimus	165
3.7.4. RADIOIMUNOENSAIOS	166
3.7.4.1. Doseamento de Renina	166
3.7.4.2. Doseamento de Aldosterona.....	166
3.7.5. TESTE DE SUOR	167
4. LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA.....	169
4.1. AUTOIMUNIDADE.....	169
4.1.1. ENSAIOS DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA.....	169
4.1.2. ENSAIOS QUANTITATIVOS POR ELISA	171
4.1.3. ENSAIOS DE IMUNO <i>Blotting</i>	172
4.2. IMUNOALERGOLOGIA.....	173
4.2.1. DOSEAMENTO DE IgE, TOTAL E ESPECÍFICA.....	173
4.2.2. DOSEAMENTO DE IgG ESPECÍFICO	174
4.2.3. DOSEAMENTO DE IgA ESPECÍFICO	175
4.2.4. DOSEAMENTO DE TRIPTICASE.....	175
4.2.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CATIONICA EOSINÓFILA.....	176

4.2.6. DOSEAMENTO DE ANTICORPOS	176
4.2.7. ALERGOLOGIA MOLECULAR.....	177
4.3. IMUNOQUÍMICA.....	179
4.3.1. IMUNONEFELOMETRIA.....	179
4.3.2. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS	179
4.3.3. IMUNOFIXAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS	180
4.3.4. PESQUISA DE MARCADORES TUMORAIS.....	181
4.4. CITOMETRIA DE FLUXO	183
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Organização laboratorial no Laboratório de Hematologia.....	59
Figura 2 – Princípio ótico de analisadores hematológicos.....	60
Figura 3 – Exemplo de um hemograma obtido no equipamento Sysmex XE2100.	61
Figura 4 – Diagramas de dispersão do canal DIFF..	62
Figura 5 – Diagrama de dispersão do canal IMI..	62
Figura 6 – Sinal elétrico à passagem de uma célula pela luz laser.....	63
Figura 7 – Método colorimétrico para a determinação da Hemoglobina.	63
Figura 8 – Diagramas obtidos nos canais nos canais NRBC e RET.	64
Figura 9 – Histograma plaquetário com indicação dos índices PDW e P-LCR.....	65
Figura 10 – Exemplos de alterações morfológicas nos eritrócitos..	66
Figura 11 – Determinação de Hemoglobina glicosilada no equipamento BioRad D10.....	69
Figura 12 - Esquema ilustrativo da Coloração pelo método de Gram.....	72
Figura 13 – Coloração negativa pela tinta-da-china..	73
Figura 14 – Tipos de Sementeira.....	77
Figura 15 – Tipos de sementeira em meio sólido..	77
Figura 16 – Tipos de hemólise em meio de gelose de sangue.	79
Figura 17 – Meio de cultura MacConkey (MAC).....	80
Figura 18 – Meio de cultura CLED.....	80
Figura 19 – Crescimento invasor em meio de gelose de sangue.....	81
Figura 20 – Meio de cultura Manitol Sal agar.	81
Figura 21 – Meio de Sabouraud Dextrose agar (SGC2).....	81
Figura 22 – Meio de cultura Salmonella-Shigella (SS)..	82
Figura 23 – Meios de cultura Yersinia agar, D-coccosel agar e Campyloset agar.	83
Figura 24 – Meio GBS.....	83
Figura 25 – Meios de cultura líquidos com sensores de crescimento por fluorescência	84
Figura 26 - Prova da Catalase..	85
Figura 27 – Procedimento do teste da Coagulase.....	85
Figura 28 – Prova da Oxidase.	86
Figura 29 – Teste da Optoquina (P).....	87
Figura 30 – Teste dos fatores X (Hemina) e V (NAD).	87
Figura 31 – Prova da Ureia.	88
Figura 32 – Resultados possíveis no meio de Kligler-Iron agar (KIA).	88
Figura 33 – Meio Citrato.....	89
Figura 34 – Prova da filamentação..	90
Figura 35 – Carta vitek, sistema periférico e Equipamento Vitek®2.	91
Figura 36 – Teste de suscetibilidade a antibióticos.	92
Figura 37 – Exemplos de testes de suscetibilidade a antibióticos.....	92
Figura 38 – Antibiógramas. a) Sinergismo e b) Antagonismo entre antibacterianos.	93
Figura 39 – Esquema ilustrativo de um ϵ -teste®.....	93
Figura 40 - Pesquisa de <i>S. pneumoniae</i> na urina.....	95
Figura 41 - Esquema representativo da execução do teste ImmunoCard STAT!HpSA.....	96
Figura 42 – Colorações álcool-ácido para pesquisa de Micobactérias.	98
Figura 43 - Coloração pelo método Kinyoun modificado.	99
Figura 44 – Crescimento microbiano em Meio de Middlebrook 7H9.	101
Figura 45 - Micobactérias em meio Lowenstein-jensen, colónias rugosas.	102

Figura 46 – Técnica de hibridização de ácidos nucleicos.....	103
Figura 47 – Procedimento de identificação de Micobactérias pelo teste GenoType®.	104
Figura 48 – Padrões de positividade para a identificação de Micobactérias	105
Figura 49 – Detecção da suscetibilidade a antibióticos de Micobactérias	107
Figura 50 – Representação esquemática tridimensional da parede celular do <i>A. fumigatus</i> ..	109
Figura 51 – Esquema do teste de pesquisa de antigénios galactomannan no soro.	110
Figura 52 – Pesquisa de <i>Cryptococcus neoformans</i>	111
Figura 53 – Teste de aglutinação Rosa Bengala..	113
Figura 54 – Microplaca do teste Brucellacapt®	114
Figura 55 – Pesquisa de anticorpos heterófilos IgM por imunocromatografia.	115
Figura 56 – Esquema do ensaio de CMIa.....	116
Figura 57 – Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema Vidas®.	118
Figura 58 – Esquema ilustrativo da reação de ELISA em microplaca.	123
Figura 59 – Esquema ilustrativo da reação de Western-blot.	125
Figura 60 – Exemplo de um controlo positivo para o teste anti- <i>Helicobacter pylori</i>	126
Figura 61 – Painel de vírus respiratórios.....	127
Figura 62 – Resultados positivos para vírus respiratórios.	128
Figura 63 – Detecção de antigénio de citomegalovírus por imunofluorescência.....	129
Figura 64 – Detecção antigénica de <i>Herpes simplex 1</i> por imunofluorescência direta.	130
Figura 65 – Bacilos de <i>Legionella pneumophila</i> detetados por imunofluorescência direta.	131
Figura 66 – <i>Pneumocystis jiroveci</i> detetados por imunofluorescência indireta.....	132
Figura 67 – Exame parasitológico de esfregaços sanguíneos.....	133
Figura 68 – Exame parasitológico de fezes.	134
Figura 69 – Esquema ilustrativo do princípio dos métodos de extração de ácidos nucleicos. .	138
Figura 70 - Princípio de funcionamento de A) SyberGreen® e B) Sondas <i>Taqman</i>	139
Figura 71 – Ensaio de PCR em tempo real com SYBR® Green I.	140
Figura 72 – Sondas Beacon.	140
Figura 73 – Sondas FRET.	140
Figura 74 – Resultado de um ensaio de PCR em tempo real.....	141
Figura 75 – Quantificação com PCR em tempo real.....	141
Figura 76 – Imunoensaio por Fluorescência Polarizada.....	148
Figura 77 - Imagens de Sedimentos Urinários.....	152
Figura 78 – Teste rápido para pesquisa de drogas na urina.....	153
Figura 79 – Procedimento do teste para pesquisa de sangue oculto nas fezes.....	154
Figura 80 – Análise de má absorção intestinal.	154
Figura 81 – Doseamento cromatográfico de catecolaminas urinárias.	156
Figura 82 – Doseamento cromatográfico da Vitamina A e Vitamina E.	157
Figura 83 – Ensaio Cromatográfico das Hemoglobinas.....	158
Figura 84 – Ensaio bioquímico DELFIA ® Xpress para a deteção de PAPP-A e β -hCG.	160
Figura 85 – Princípio do ensaio de eletroquimioluminescência (ECL).....	163
Figura 86 – Prova de suor Macroduct®.	167
Figura 87 – Princípio do método de imunofluorescência indireta.	170
Figura 88 – Imunoblot para pesquisa de anticorpos anti-neuronais.	172
Figura 89 – Princípio do imunoensaio para a determinação da IgE total.	173
Figura 90 - Princípio do imunoensaio para a determinação da IgE total.	174
Figura 91 – Imunoalergologia molecular.	177
Figura 92 – Esquema representativo do imunoensaio immunoCAP ISAC®.	177
Figura 93 – Esquema representativo do perfil eletroforético proteico normal.....	180
Figura 94 – Exemplo de um resultado de Imunofixação.	180
Figura 95 – Associação Clínica de alguns marcadores tumorais.	181
Figura 96 – Contagem absoluta das populações linfocitárias.....	183

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Meios de cultura a inocular e condições de incubação por tipo de produto.....	76
Tabela 2 – Características seletivas e diferenciais de meios de cultura.	79
Tabela 3 – Reações em meio KIA.	89
Tabela 5 – Pesquisa de Anticorpos efetuadas com o teste CMIÁ.....	117
Tabela 6 – Resultados VIDAS Lyme.....	119
Tabela 7 – Resultados VIDAS®TOXO IgM	119
Tabela 8 – Resultados VIDAS®Varicella-Zoster IgG.....	120
Tabela 9 – Resultados VIDAS®CMV IgG avidity.....	120
Tabela 10 – Resultados VIDAS® <i>C. difficile</i> toxin A&B, nas fezes.....	121
Tabela 11 – Pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG por ELISA.	124
Tabela 12 – Pesquisa de anticorpos por Western- <i>blot</i>	126
Tabela 13 – Lista das análises de Química Clínica.	144
Tabela 14 – Efeito do índice HIL nos parâmetros de Química Clínica.	145
Tabela 15 – Padrões de Fluorescência de autoanticorpos e patologias associadas.	170

ABREVIATURAS

γ GT	<i>Gama Glutamil Transferase</i>
5-HIAA	<i>5-Hydroxyindoleacetic acid</i>
ACA	<i>Anti-cardiolipin antibodies</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADA	<i>Adenosina desaminase</i>
AFP	<i>Alfa-fetoproteína</i>
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
AMA	<i>Anti-mitochondrial antibodies</i>
ANA	<i>Anti-nuclear antibodies</i>
ANCA	<i>Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
APCA	<i>Antiparietal cells antibodies</i>
APO	<i>Apolipoproteína</i>
ASMA	<i>Anti-Smooth Muscle Antibody</i>
BAAR	<i>Bacilos álcool-ácido resistentes</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
CAM	<i>Campyloset agar</i>
CC	<i>Caldo de chocolate</i>
CCP	<i>Cyclic citrullinated protein</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CHSJ	<i>Centro Hospitalar de São João</i>
CLED	<i>Cystine lactose eletrolyte deficient</i>
CMHG	<i>Concentração média de hemoglobina globular</i>
CMI	<i>Concentração mínima inibitória</i>
CMIA	<i>Chemiluminescence microparticle immuno assay</i>
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
cpm	<i>contagens por minuto</i>
DCO	<i>D-Coccosel agar</i>
DELFLIA	<i>Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay</i>
DHEA	<i>Dehydroepiandrosterone</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	<i>Densidade ótica</i>
EAA	<i>Espectrometria de absorção atómica</i>
EBV	<i>Epstein-barr virus</i>
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMB	<i>Ethambutol</i>
ENA	<i>Extractable Nuclear Antigens</i>

EPO	<i>Erythropoietin</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FSC	<i>Foward scatter</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
FPIA	<i>Fluorescence Polarization. Immunoassay</i>
GBM	<i>Glomerular basement membrane</i>
GBS	<i>Grupo B Streptococcus</i>
GC	<i>Gelose de Chocolate</i>
GOT	<i>Glutamic-oxaloacetic transaminase</i>
GRH	<i>Growth hormone (GH)-releasing hormone</i>
GS	<i>Gelose de Sangue</i>
GTP	<i>Glutamic-pyruvic transaminase</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
HbA1c	<i>Hemoglobina glicosilada</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HGM	<i>Hemoglobina globular média</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
Ht	<i>Hematócrito</i>
HTM	<i>Haemophilus test medium</i>
HVA	<i>Homovanillic acid</i>
IA	<i>Índice de avidéz</i>
IFI	<i>Imunofluorescência indireta</i>
INH	<i>Isoniazid; Isonicotinylhydrazine</i>
IRF	<i>Immature reticulocyte fraction</i>
ISE	<i>Ion-selective electrode</i>
ISU	<i>ISAC standard unit</i>
ISAGA	<i>Immunsorbent agglutination assay</i>
KIA	<i>Kligler-iron-agar</i>
LCR	<i>Líquido Cefalorraquidiano</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	<i>Lutein hormone</i>
LJ	<i>Lowenstein-jensen</i>
LKM	<i>Liver-kidney microsomal</i>
Lpa	<i>Lipoproteína a</i>
MAC	<i>MacConkey</i>
McF	<i>MacFarland</i>
MEIA	<i>Microparticle enzyme immunoassay</i>
MGIT	<i>Mycobacteria growth indicator tube</i>
MN	<i>Mononucleares</i>
MPV	<i>Mean platelet volume</i>
MSA	<i>Mannitol salt agar</i>
MTX	<i>Metotrexato</i>

HIL	Hemólise, icterícia e lipémia
NRBC	<i>Nucleated red blood cell</i>
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i>
NTC	<i>No template control</i>
PAPP-A	<i>Pregnancy associated plasma protein A</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PDW	<i>Platelet distribution width</i>
PK	Proteinase K
P-LCR	<i>Platelet large cell ratio</i>
PMN	Polimorfonucleares
PRL	Prolactina
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
PZA	<i>Pyrazinamide</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
REA	<i>Radiative energy attenuation</i>
RFV	<i>Relative fluorescence value</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RMP	<i>Rifampicin</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
RPR	<i>Rapid reagin test</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
SGC2	<i>Sabouraud dextrose cloranfenicol agar</i>
SLS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SM	<i>Streptomycin</i>
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TASO	<i>Título de antiestreptolisina O</i>
tTG	<i>Tissue transglutaminase</i>
TMPD	<i>Tetramethylphenylenediamine</i>
TN	Translucência da nuca
TPA	<i>Tripropylamine</i>
TSB	<i>Tryptic Soy broth</i>
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory Test</i>
VGM	Volume globular médio
VMA	<i>Vanillyl mandelic acid</i>
VS	Velocidade de sedimentação
VZV	<i>Varicela-zoster virus</i>
WBC	<i>White blood cells</i>
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i>

1. LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA

O estágio no laboratório de Hematologia, do serviço de Patologia Clínica no Centro Hospitalar de São João (CHSJ), decorreu entre 02 e 30 de Dezembro de 2011. O principal objetivo deste estágio foi a aplicação da formação lecionada nas unidades curriculares de Hematologia, num laboratório hospitalar.

No laboratório de Hematologia do CHSJ é efetuada a análise quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue, a determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária e a quantificação de hemoglobina glicosilada. Para isso, dispõe de três autoanalisadores hematológicos, dois Sysmex XE-2100 e um Sysmex XE5000, um equipamento automático para a realização de esfregaços sanguíneos Sysmex sp1000i, dois equipamentos para a determinação da velocidade de sedimentação, VESmatic200 e VESmatic60, e um equipamento automático para a determinação da hemoglobina glicosilada por cromatografia líquida de alta pressão (HLPC) de troca iónica, BioRad D10 (Figura 1).

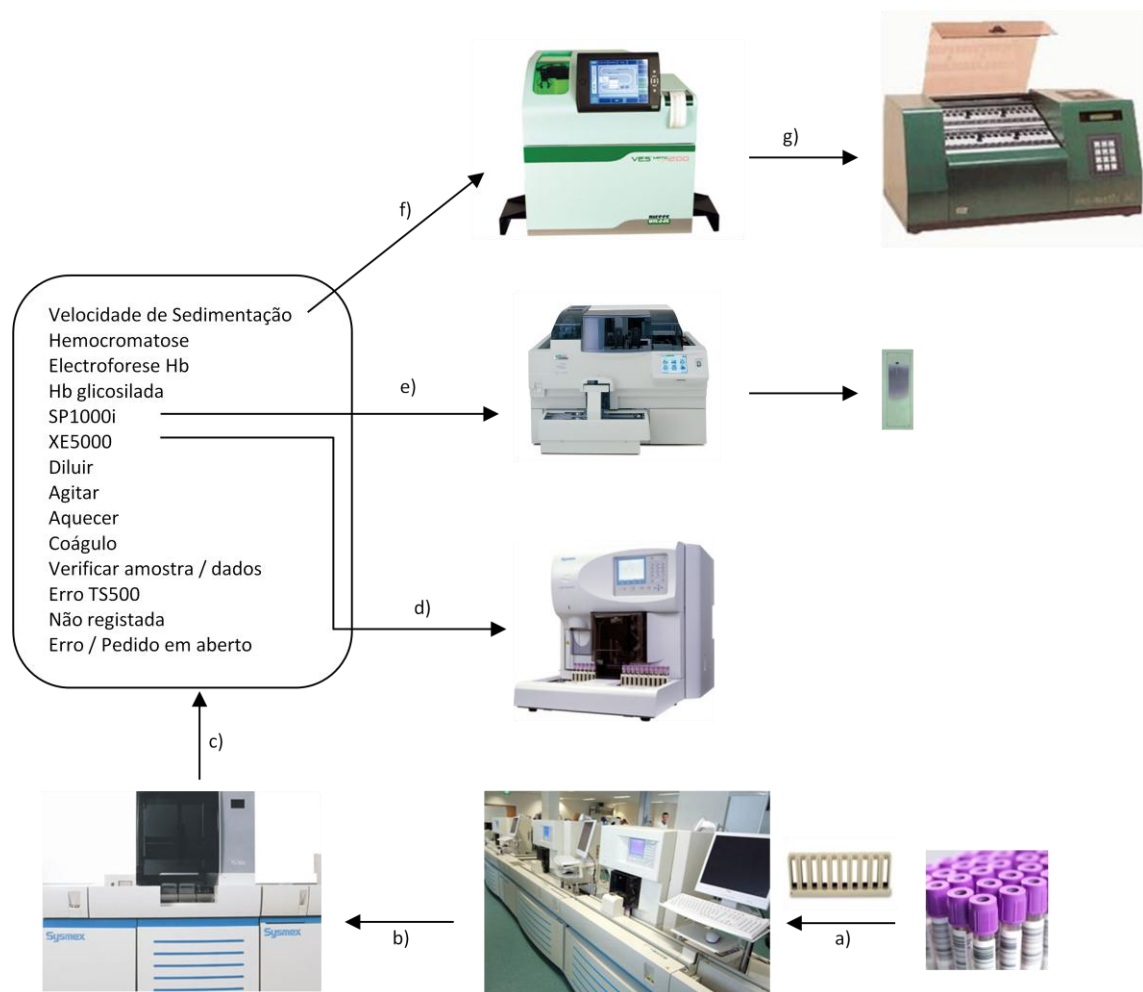


Figura 1 - Organização laboratorial no Laboratório de Hematologia: a) cadeia central com dois analisadores Sysmex XE2100™, b) Equipamento TS500 para a distribuição das amostras consoante os pedidos de c), d) analisador hematológico Sysmex XE5100™, e) equipamento para a realização de esfregaços sanguíneos Sysmex sp1000i™, f) equipamento para a determinação da velocidade de sedimentação VESmatic200 e g) VESmatic60.

1.1. HEMOGRAMA COM PLAQUETAS

O hemograma permite a quantificação dos elementos celulares no sangue, leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Para a sua execução são colhidas amostras de sangue periférico, por venipunctura em tubos com anticoagulante ácido etileno-diamina-tetracético tripotássico (EDTA-K3). A análise é efetuada nos equipamentos Sysmex XE2100^{1,2}, acoplados a uma cadeia central automatizada HST-N *expertline*, e Sysmex XE5000³. À cadeia central encontra-se inserido o equipamento TS500 que arquiva as amostras ou procede à sua distribuição, no caso existirem pedidos não satisfeitos.

Os analisadores hematológicos utilizados são analisadores de fluxo cujo princípio é comum aos citómetros de fluxo, método ótico de dispersão de luz (Figura 2). As células suspensas num líquido passam, uma a uma, através de uma câmara que possui duas janelas, onde são iluminadas por um feixe laser. A dispersão de luz permite contar e avaliar o tamanho e complexidade da célula. A luz dispersa frontalmente (FSC - *forward scatter*) permite concluir o tamanho da célula e a luz dispersa lateralmente (SSC - *side scatter*) é indicativa da sua complexidade.

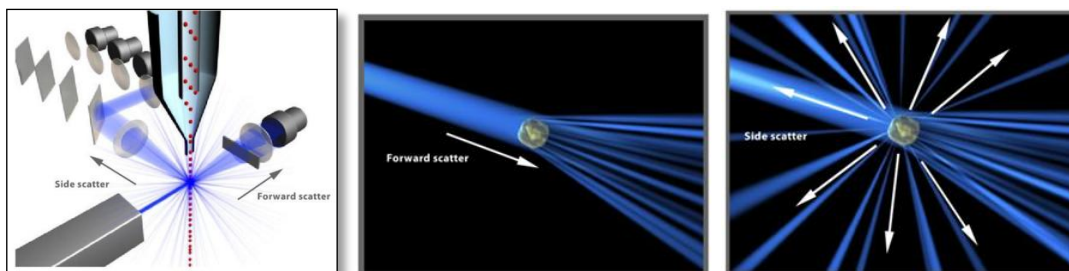


Figura 2 – Princípio ótico de analisadores hematológicos. Dispersão de luz FSC e SSC. Adaptado de <http://probes.invitrogen.com>.

1.1.1. LEUCOGRAMA

A análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos no sangue designa-se por leucograma. Os leucócitos, com diferentes funções no sistema imunitário, incluem cinco tipos de células com funções e morfologias específicas: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, pelo que o leucograma consiste na determinação do número total de leucócitos e na contagem diferencial, percentual e absoluta, dos diferentes tipos de células.

Os dados analíticos no hemograma são acompanhados por diagramas de dispersão e histogramas, muito úteis na interpretação dos resultados (Figura 3).

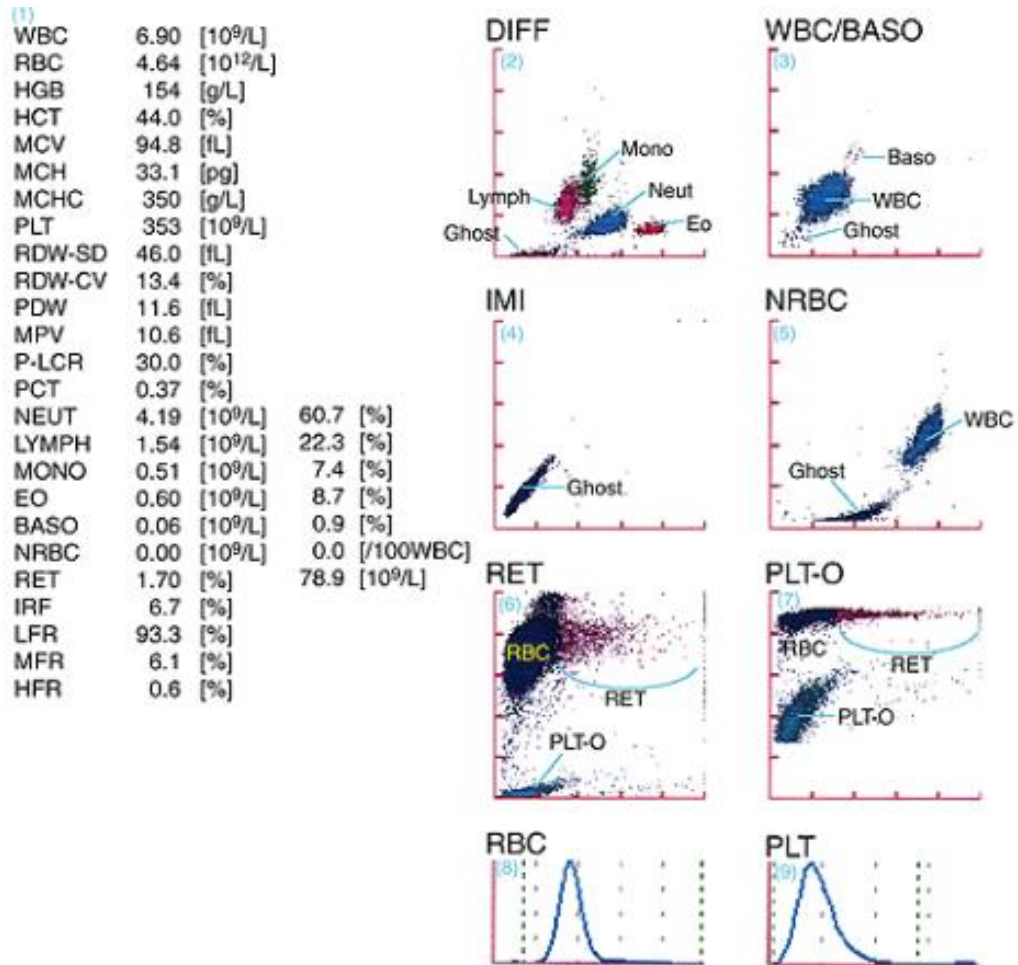


Figura 3 – Exemplo de um hemograma obtido no equipamento Sysmex XE2100, sendo 1-dados analíticos, 2-canal DIFF, 3-canal WBC/BASO, 4-canal IMI, 5-canal NRBC, 6-canal RET, 7-canal PLT-O, 8-histograma eritrócitos e 9-histograma de plaquetas.

A quantificação de leucócitos é efetuada no canal WBO/BASO, canal que utiliza os sinais FSC e SSC (Figura 3-3). Neste canal, um reagente ácido (Stromatolyser-FB II) lisa os glóbulos vermelhos (RBC), plaquetas e glóbulos brancos, com exceção dos basófilos.

A contagem diferencial dos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos é efetuada no canal DIFF (Figura 3-2). Para isso, o sangue é diluído com uma solução surfactante (Stromatolyser-4DL) que lisa completamente os eritrócitos e plaquetas e permeabiliza a membrana dos leucócitos. Esta permeabilização permite a entrada de um segundo reagente (Stromatolyser-4DS), que se liga aos ácidos nucleicos e organelos dos glóbulos brancos. Desta forma, ao serem expostos a um laser de 633nm, emitem fluorescência de intensidade proporcional ao seu conteúdo em ácidos nucleicos. O diagrama de dispersão DIFF permite uma rápida avaliação em casos de leucocitose ou leucopenia, aumento ou redução dos valores de leucócitos respetivamente (Figura 4).

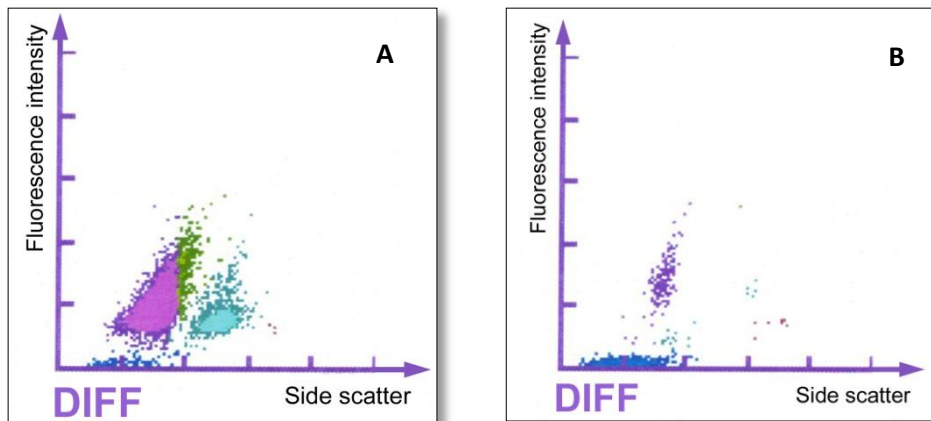


Figura 4 – Diagramas de dispersão do canal DIFF: A) Leucocitose, linfocitose e B) Leucopenia.

O canal IMI (*immature myeloid information*) deteta células imaturas da linhagem granulocítica. Os granulócitos imaturos possuem um conteúdo de colesterol superior às células maduras e apresentam uma composição fosfolipídica diferente, ou seja, maior percentagem de fosfatidilcolina e menor percentagem de esfingomiéline. Este canal permite a distinção destas células pelo uso de um reagente complexo (Stromatolyser-IM), que danifica a membrana dos granulócitos maduros, com a exposição do núcleo e eluição dos componentes intracelulares (Figura 5). A deteção destas células é sempre confirmada por contagem manual no esfregaço sanguíneo.

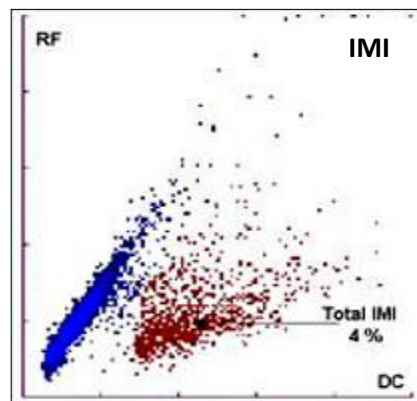


Figura 5 – Diagrama de dispersão do canal IMI, com deteção de 4% de células granulocíticas imaturas.

1.1.2. ERITROGRAMA

O estudo dos glóbulos vermelhos designa-se eritrograma e consiste na análise quantitativa e qualitativa do número de eritrócitos (RBC), na determinação dos valores de hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), e índices hematimétricos.

A contagem de glóbulos vermelhos baseia-se no princípio de focagem hidrodinâmica. Este método consiste na passagem da amostra diluída por uma abertura (*nozzle*) com líquido (tampão) a passar em redor. As células passam pela abertura, uma a uma, sendo possível determinar as diferenças na corrente elétrica à sua passagem. A intensidade do pulso elétrico de cada célula analisada é proporcional ao seu volume (Figura 6).

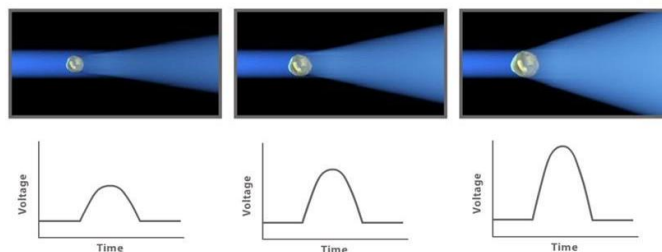


Figura 6 – Sinal elétrico à passagem de uma célula pela luz laser. Adaptado de <http://probes.invitrogen.com>.

O hematócrito (Ht) é o volume ocupado pelos eritrócitos em 1000mL de sangue total, expresso em Litro/Litro. É determinado diretamente pela deteção precisa da contagem e volume de eritrócitos.

A determinação da concentração de Hemoglobina (Hb) é efetuada por um método colorimétrico, método livre de cianeto, baseado na baixa toxicidade do composto lauril sulfato de sódio (SLS). O SLS reage com a membrana do eritrócito, causando a sua disrupção, com conseqüente alteração da conformação da molécula de hemoglobina. Esta alteração conformacional provoca a oxidação do ião Ferro pelo oxigénio ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) formando uma molécula estável de SLS-Hb (Figura 7).

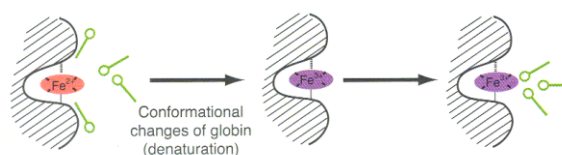


Figura 7 – Método colorimétrico para a determinação da Hemoglobina.

Os índices hematimétricos determinados no eritograma são o volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração média de hemoglobina globular (CMHG). O VGM, expresso em fentolitros (fL), é determinado pelos sistemas automáticos ou calculado pelo quociente entre o valor de hematócrito e o número de eritrócitos. É útil na classificação de anemias em normocíticas, macrocíticas ou microcíticas consoante os valores estão dentro, acima ou abaixo dos valores de referência, respetivamente. Esta variação, bem como a presença de anisocitose eritrocitária (RDW - red cell distribution width), é facilmente visualizada pelo histograma de eritrócitos (Figura 3-8). A HGM é indicativa do conteúdo de hemoglobina por glóbulos vermelhos, sendo expressa em picogramas (pg), e a CMHG é a concentração média de hemoglobina por glóbulo vermelho, expressa em percentagem ou g/dL. A CMHG permite a classificação das anemias por cromia, ou seja, pela coloração dos eritrócitos. Assim, as anemias podem ser normocrómicas ou hipocrómicas, consoante os valores de CMHG estão em níveis normais ou inferiores relativamente aos valores de referência, respetivamente.

A contagem de eritroblastos, importante indicador da atividade eritrocitária pela medula óssea, consiste na contagem de glóbulos vermelhos nucleados e reticulócitos, efetuada nos canais NRBC e RET respetivamente (Figura 8).

No canal NRBC é provocada a contração de glóbulos vermelhos e plaquetas pela ação de lise do reagente (Stromatolyser-NR), que simultaneamente efetua a marcação de ácidos nucleicos de glóbulos brancos (DNA) e NRBC (RNA).

A contagem de reticulócitos é efetuada no canal de reticulócitos (RET), após marcação dos ácidos nucleicos existentes nos glóbulos brancos e NRBC. Os reticulócitos são divididos em três categorias de acordo com a intensidade de fluorescência (*low*, *medium* e *high fluorescence range*). A soma das categorias MFR e HFR correspondem ao valor da fração de reticulócitos imaturos (IRF).

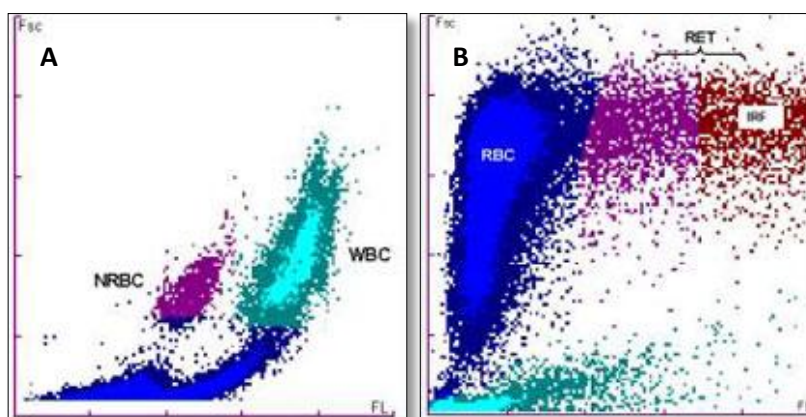


Figura 8 – Diagramas obtidos nos canais nos canais NRBC e RET. Adaptado de <http://www.sysmex.com>.

1.1.3. ANÁLISE PLAQUETÁRIA

A contagem de plaquetas é efetuada de acordo com o princípio de focagem hidrodinâmica, tal como a contagem eritrocitária. Nos casos de distribuição anormal ou resultados fora dos limites de referência, é visualizado um esfregaço sanguíneo que permite avaliar a morfologia plaquetária e excluir casos de agregação. Por outro lado, no caso da distribuição das plaquetas, apesar de normal, não atingir a linha de base é efetuada a contagem ótica de plaquetas pois a contagem poderá estar errónea, pseudotrombocitose, devido à presença de fragmentos de eritrócitos (esquizócitos) ou microcitose extrema.

A morfologia das plaquetas é efetuada pela análise do histograma plaquetário (Figura 9), bem como pelos índices plaquetários de variação de volume (PDW - platelet distribution width), volume médio (MPV - mean platelet volume) e percentagem de plaquetas gigantes (P-LCR - platelet large cell ratio).

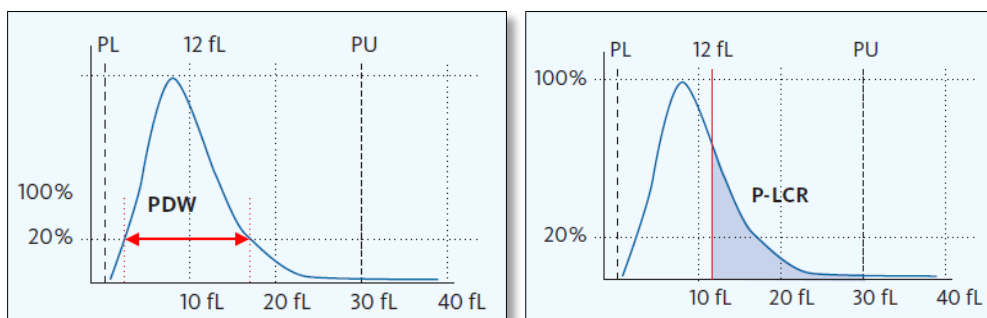


Figura 9 – Histograma plaquetário com indicação dos índices PDW e P-LCR.

1.1.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA

O estudo de um esfregaço sanguíneo permite confirmar os resultados do estudo quantitativo prévio e analisar a morfologia dos componentes sanguíneos.

No laboratório de hematologia os esfregaços sanguíneos são preparados e corados de forma automática no equipamento SP1000i⁴. A coloração é efetuada pelo método de *Wright* com corantes do tipo *Romanovsky*, um corante ácido (eosina), que cora os componentes básicos ou acidófilos da célula de laranja, e um corante básico (azul de metileno), que cora os componentes ácidos ou basófilos da célula de azul.

A análise do esfregaço inclui a contagem diferencial leucocitária e a análise morfológica de todos os tipos celulares. A contagem diferencial leucocitária consiste na contagem percentual e absoluta dos diferentes tipos de leucócitos, após contagem microscópica de 100 leucócitos. Todas as alterações morfológicas, tais como anisocitose (tamanho), poiquilocitose (forma) e anisocromia (cor), e formas atípicas visualizadas são reportadas no boletim analítico (Figura 10).

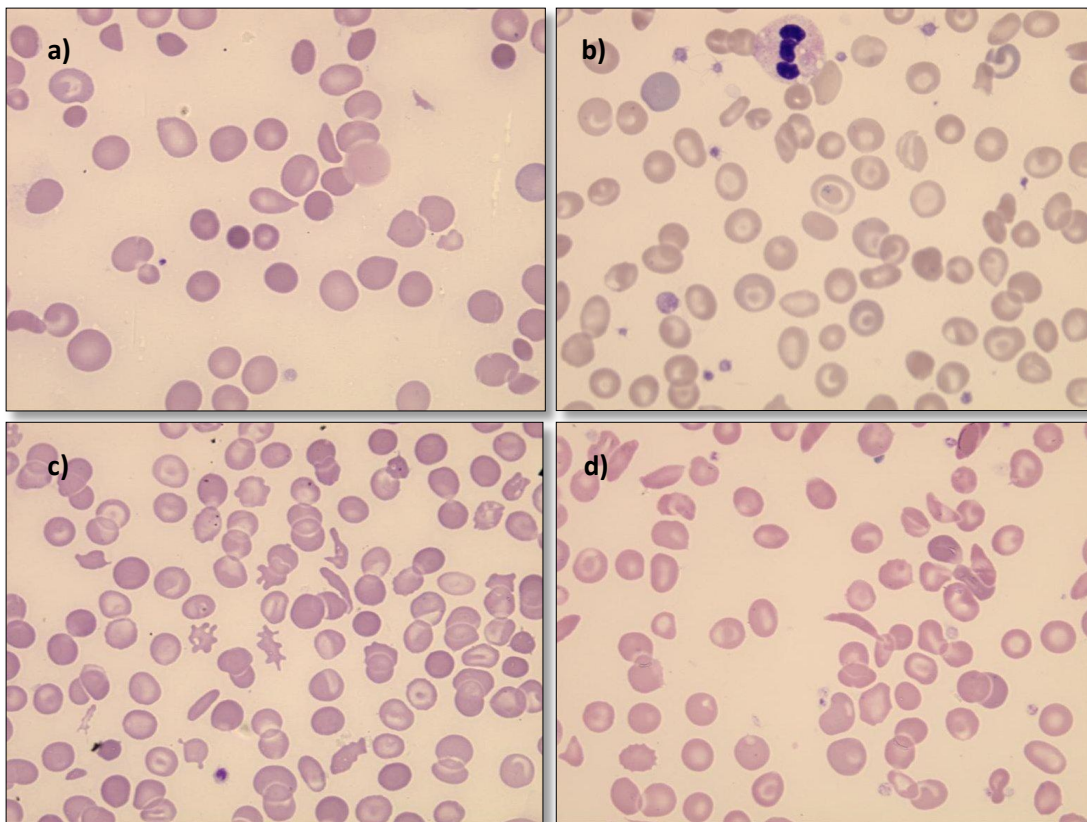


Figura 10 – Exemplos de alterações morfológicas nos eritrócitos, visualizadas no esfregaço sanguíneo. a) dacriócitos, b) células alvo, c) esquizócitos, d) drepanócitos. Adaptado de <http://www.cellavision.com>.

1.2. CONTAGENS CELULARES EM LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

As contagens celulares efetuadas em líquidos biológicos, tais como líquido pleural, líquido de diálise peritoneal, líquido ascítico, líquido pericárdico e líquido sinovial, são importantes em várias situações de diagnóstico como é o caso de meningite, hemorragias, doenças malignas, inflamação e infeções bacterianas e virais.

Estas contagens são executadas no equipamento Sysmex XE5000⁵, que utiliza o diagrama de dispersão DIFF e a distribuição de RBC para calcular as contagens de leucócitos (WBC-BF), de células mononucleares (MN# e MN%) e polimorfonucleares (PMN#, PMN%), e contagens de RBC nos fluídos corporais (RBC-BF). Contagens inferiores a 50 células por μL são confirmadas, após recontagem manual, em câmara de Neubauer adaptada.

1.3. PESQUISA DE EOSINÓFILOS NA URINA

A presença de eosinófilos na urina é efetuada como teste não invasivo para o diagnóstico de nefrite intersticial aguda. Para isso, as amostras de urina são concentradas por centrifugação de 9 mL durante 5 minutos a 1500 rpm. O sedimento obtido é citocentrifugado a 400 rpm durante 3 minutos, procedendo-se de seguida à sua extensão em lâmina e coloração de Wright.

A presença de uma percentagem de eosinófilos superior a 1%, eosinofília, é interpretado como um resultado positivo.

1.4. PESQUISA DE LEUCÓCITOS NAS FEZES

O exame microscópico de fezes, após coloração, é usado no diagnóstico para a deteção de inflamação intestinal⁶. Para isso, as fezes são diluídas em soro fisiológico, é efetuado o esfregaço que é corado pelo método de Wright.

1.5. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO ERITROCITÁRIA

A velocidade de sedimentação eritrocitária, velocidade de sedimentação globular (VSG) ou simplesmente velocidade de sedimentação (VS) é uma análise de rotina que se encontra alterada em processos infecciosos e inflamatórios. Consiste em determinar a velocidade de sedimentação ou de “queda” dos glóbulos, quando a amostra de sangue em pipetas ou em tubos de características especiais, é colocada em repouso durante um determinado período de tempo.

Os equipamentos VESmatic200 e VESmatic60 baseiam a sua determinação no método de Westergren modificado⁷. O equipamento VESmatic200 usa o sangue colhido com o anticoagulante EDTA e permite a determinação da VS na 1ª hora em 20 minutos. O equipamento VESmatic60 utiliza o citrato como anticoagulante e permite a diminuição do tempo de determinação da VS pela inclinação do tubo 18°, pelo que o resultado da 1ª hora é determinado aos 28 minutos e o valor de VS na 2ª hora é determinado aos 48 minutos.

1.6. HEMOGLOBINA GLICOSILADA

O doseamento de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) é um parâmetro útil na monitorização a longo prazo de doentes diabéticos⁸. Tal facto deve-se à não variação da HbA1c com a alteração do nível de glicose no sangue, permitindo obter uma retrospectiva a longo prazo dos níveis de glicose no sangue.

Este doseamento é efetuado por Cromatografia Líquida de Alta Pressão de troca iónica, no equipamento automático BioRad D10. Este equipamento proporciona um gradiente iónico ao longo da coluna, que separa as hemoglobinas pela sua diferente interação com a coluna. As hemoglobinas, com diferentes tempos de retenção, passam num fotómetro onde incide luz e é lida a absorvância a 415nm (Figura 11).

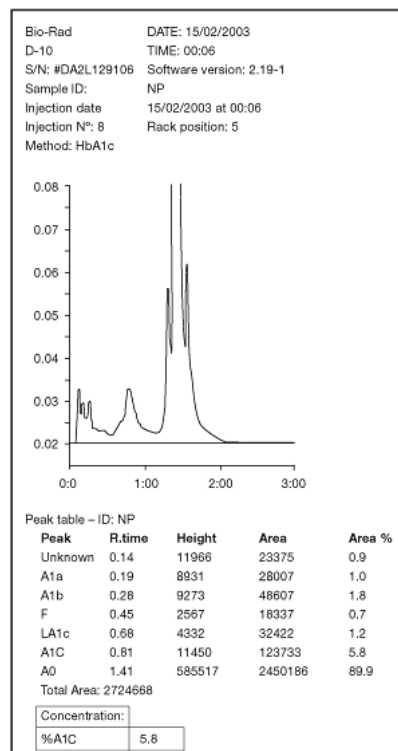


Figura 11 – Determinação de Hemoglobina glicosilada no equipamento BioRad D10.

2. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

O estágio no Laboratório de Microbiologia decorreu nos três primeiros meses de 2012 e revelou-se extremamente enriquecedor na consolidação dos conhecimentos teórico-práticos lecionados nas unidades curriculares de Bacteriologia, Micologia, Parasitologia e Virologia num laboratório hospitalar.

O laboratório de Microbiologia está dividido nos setores de trabalho: i) a execução técnica e ii) valorização e validação médica. A área técnica laboratorial receciona os produtos, colhidos em recipientes estéreis, e verifica os pedidos na requisição médica. Consoante os pedidos, é efetuada a distribuição dos produtos pelos diferentes setores:

- Bacteriologia e Micologia;
- Micobactérias;
- Virologia;
- Serologia;
- Parasitologia;
- Biologia Molecular.

2.1. BACTERIOLOGIA E MICOLOGIA

A pesquisa de bactérias e fungos é tratada de forma conjunta pelo laboratório, incluindo o exame direto, cultural e estudo imunológico dos produtos rececionados. O laboratório está equipado com uma câmara de fluxo laminar, onde são manipulados todos os produtos com maior risco biológico.

2.1.1. EXAME DIRETO

O exame direto é a primeira etapa no processamento laboratorial, com extrema importância na orientação terapêutica e na avaliação da qualidade da amostra. Contudo, a ausência de elementos bacterianos ou fúngicos num exame direto não indica ausência de infeção.

O exame direto é efetuado em produtos biológicos, tais como secreções brônquicas, lavados brônquicos e bronco-alveolares, pus, exsudados e líquidos biológicos. Para isso, uma porção representativa do produto biológico é colocado numa lâmina. No caso de produtos espessos o produto é espalhado num esfregaço fino.

O exame direto pode ser efetuado a fresco:

- Sem coloração (soro fisiológico ou água destilada estéril)
- Com coloração (tinta-da-china, lugol a 2% ou azul de lactofenol)

ou após clarificação (lactofenol, hidróxido de potássio e branco de calcofluor) ou fixação, usualmente pelo calor, seguida de coloração por métodos, tais como método de Gram, Ziehl-Neelsen e kinyoun.

Os métodos mais frequentemente utilizados no laboratório de bacteriologia/micologia são o método de Gram e a coloração com tinta-da-china.

2.1.1.1. Coloração pelo método de Gram

Para a coloração pelo método de Gram, o esfregaço é seco ao ar e fixado pelo calor. Após fixação, procede-se à coloração conforme descrito na Figura 12, permitindo a diferenciação de microorganismos Gram positivo e Gram negativo devido às diferenças nas propriedades químicas e físicas da parede celular.

Um microorganismo Gram negativo adquire a cor rosa-avermelhado após esta coloração, enquanto um microorganismo Gram positivo adquire a cor púrpura/azul (Figura 12). Apesar de ser uma coloração de elevado valor de diagnóstico, existem organismos não definidos por este método de coloração sendo Gram variáveis ou indeterminados.

O exame direto das secreções brônquicas, após coloração pelo método de Gram, é fundamental para determinar a qualidade do produto e representatividade do seu exame cultural. Por este motivo é fornecida a contagem de células epiteliais e leucócitos, e uma indicação dos microorganismos presentes (população escassa ou polimicrobiana).

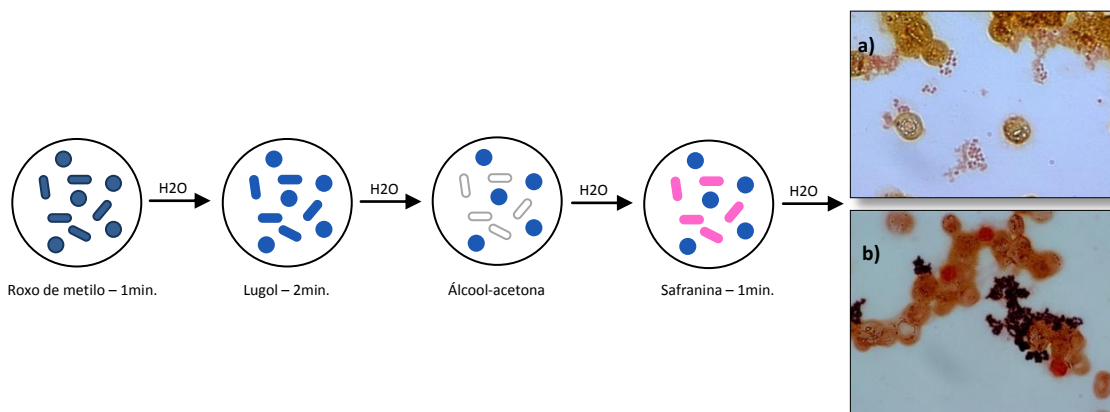


Figura 12 - Esquema ilustrativo da Coloração pelo método de Gram. Microorganismo Gram negativo (a) e Gram positivo (b).

2.1.1.2. Coloração negativa com Tinta-da-China

No caso de suspeita clínica de Criptococose é efetuado um exame direto com coloração com tinta-da-china. É um corante ácido carregado negativamente que não penetra a cápsula do microorganismo *Cryptococcus neoformans*, tornando-o facilmente distinguível do fundo negro (Figura 13). O procedimento é executado colocando uma gota de tinta-da-china na ponta de uma lâmina. Com uma ansa é colocado uma pequena porção de produto na gota, misturando.

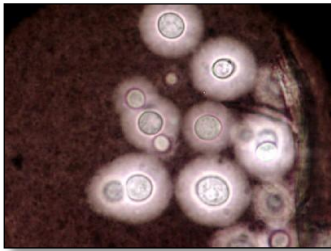


Figura 13 – Coloração negativa pela tinta-da-china, visualizando a cápsula do *C. neoformans*. Adaptado de <http://www.human-healths.com>.

2.1.2. EXAME CULTURAL

O exame cultural tem como objetivo permitir o crescimento e identificação de microorganismos presentes na amostra, podendo ser usados meios de cultura líquidos, ou caldos, e meios de cultura sólidos.

2.1.2.1. Seleção de Meios de Cultura

Os meios líquidos têm a vantagem de favorecer a difusão dos nutrientes no meio, que estão mais disponíveis aos organismos, e permitir a inoculação de maior quantidade de produto, aumentando a probabilidade de identificar o organismo causador de doença. Os meios sólidos têm a vantagem de permitirem a visualização macroscópica do crescimento microbiológico, permitindo a obtenção de colónias isoladas para posterior identificação.

No caso de suspeita de infeção fúngica é semeado um meio de cultura sólido micológico Sabouraud (SGC2). Por outro lado, se a suspeita recai numa infeção bacteriana, os tipos de meios a semear são escolhidos dependendo do produto rececionado de forma (Tabela 1).

No caso de produtos nobres, ou de colheita difícil, podem ser semeados meios adicionais de forma a assegurar o crescimento. É o caso de urina colhida por punção vesical ou nefrostomia, em que é semeado um meio CLED (agar de cistina, lactose, deficiente em eletrólitos) adicional e um meio Gelose de Sangue (GS).

Certos produtos especiais, como esperma e exsudado peniano ou uretral, são semeados adicionalmente os meios de Caldo de Chocolate (CC) e Gelose de Chocolate (GC) e no caso de líquido articular ou sinovial é semeado adicionalmente o meio de cultura GC. Em caso de pedidos específicos, tais como pedido de pesquisa de *Yersinia spp* em amostras de fezes, é também semeado um meio adicional Yersinia (YER).

Em algumas patologias também está indicada a inoculação de meios de cultura adicionais. É o caso de doentes com Fibrose Quística, em que é semeado adicionalmente o meio de *Mannitol Salt Agar* (MSA) para amostras de trato respiratório de forma a aumentar a probabilidade de deteção de microorganismos, ou em doentes neutropénicos, em que é semeado o meio *D-Coccosel agar* (DCO) para amostras de fezes de forma a detetar infeções precocemente.

São ainda inoculados meios adicionais como provas de esterilidade. É o caso da prova de esterilidade do caldo de chocolate (CC), utilizado para semear líquido cefalorraquidiano (LCR), que é inoculado em GS.

Tabela 1 – Meios de cultura a inocular e condições de incubação por tipo de produto. (→passagem)

Produtos	Meios a inocular		Incubação		
	Líquidos	Sólidos	Temperatura (°C)	%CO ₂ /O ₂	Tempo (dias)
Líquidos biológicos	Caldo Tioglicolato Caldo de Carne	GS, MAC	35±2	5% CO ₂ 0% O ₂ 5% CO ₂	1→GS 5→GS,SC 1
Secreções brônquicas Lavados brônquicos Lavados bronco-alveolares		GS, GC, MAC	35±2	5% CO ₂	1
Urina		CLED	35±2		1
Fezes	Caldo Tetrionato	MAC, SS CAM	35±2	5% CO ₂ 5% CO ₂ 5-10% O ₂	1→SS 1 3
Ponta de Catéter		GS	35±2	5% CO ₂	3
Drenos	Caldo Tioglicolato Caldo de Carne		35±2	5% CO ₂ 0% O ₂	1→GS 5→GS,SC
Líquido Cefalorraquidiano	Caldo de Chocolate	GS, GC	35±2	5% CO ₂	1→GS 1
Pus e exsudados	Caldo Tioglicolato Caldo de Carne	GS, MAC	35±2	5% CO ₂ 0% O ₂ 5% CO ₂	1→GS 5→GS,SC 1
Exsudado do Ouvido	Caldo Tioglicolato Caldo de Carne	GS, GC, MAC	35±2	5% CO ₂ 0% O ₂ 5% CO ₂	1→GS 5→GS,SC 1
Exsudado Ocular/Humor Vítreo/Líquido Córnea		GS, GC, BHI SCG2	35±2 25±2	5% CO ₂	1
Córneas e Lentes de Contacto	BHI		35±2	5% CO ₂	11→SCG2
Biópsias e Fragmentos	Caldo Tioglicolato Caldo de Carne BHI		35±2	5% CO ₂ 0% O ₂ 5% CO ₂	1→GS 5→GS,SC 11→ SCG2
Pele	BHI	SCG2	35±2 25±2	5% CO ₂	11→ SCG2 1
Cabelo, escamas, unhas, raspado couro cabeludo		SCG2	25±2		1
Placenta e Líquido amniótico	BHI Caldo Tioglicolato	GS GS	4±2 35±2	5% CO ₂	11→ SCG2 1 1→GS
Zaragatoas	Nasal	GS, MSA	35±2	5% CO ₂	1
	Orofaringe	GS	35±2	5% CO ₂	1
	Feridas e exsudados purulentos	GS, MAC, MSA	35±2	5% CO ₂	1
	Vaginal / Ocular	GS, GC SCG2	35±2 25±2	5% CO ₂	1
	Rectal	Caldo Tioglicolato MAC,SS	35±2	5% CO ₂	1→GS 1
	Uretral e Ouvido	GS, GC, MAC	35±2	5% CO ₂	1
	Endocolo/endocervical	GS, GC	35±2	5% CO ₂	1
	Exocolo/fundo do saco	GS SCG2	35±2 25±2	5% CO ₂	1
	Vaginal/Rectal para pesquisa de Streptococcus Grupo B	GBS	35±2	5% CO ₂	1
Sangue	BACTEC™Plus Aerobic e Anaerobic		35±2		5→GS
	BACTEC™Mycosis- IC/F		25±2		11→SCG2
	BACTEC™MicoF		35±2		42→GS,7H11

2.1.2.2. Sementeira

A sementeira é variável de acordo com o produto e tipo de meio, mas deve ser sempre inoculada uma porção representativa da amostra, ou seja, a porção mais purulenta, mucosa e/ou sanguinolenta da amostra. A inoculação é sempre efetuada dos meios menos seletivos para os meios mais seletivos, de forma a usar a mesma ansa para cada produto.

Para os meios sólidos o processamento pode ser efetuado em sementeira por esgotamento ou sementeira quantitativa (Figura 14).

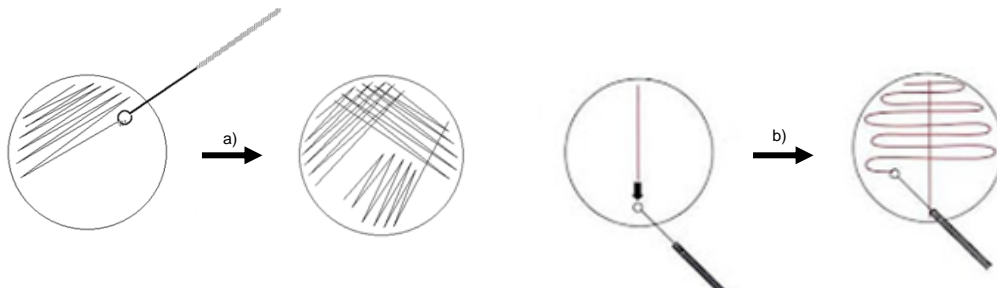


Figura 14 – Tipos de Sementeira: a) sementeira por esgotamento e b) sementeira quantitativa.

A sementeira por esgotamento é efetuada com ansa de 10 μ L e tem como objetivo a obtenção de colónias isoladas (Figura 15a). A sementeira quantitativa é usada em amostras de urinas e lavados brônquicos e bronco-alveolares, com ansas de 1 μ L e 10 μ L respetivamente (Figura 15b).

As pontas de cateter são uma exceção a estes dois tipos de sementeira, sendo semeados por rolamento 4 a 5 vezes, com o auxílio de uma ansa, garantindo um bom contacto do cateter com a superfície do meio (Figura 15c).



Figura 15 – Tipos de sementeira em meio sólido. Sementeira por: a) esgotamento, b) quantitativa e c) rolamento.

No caso de fezes sólidas, é necessário efetuar uma suspensão com água esterilizada, para que seja possível a sementeira por esgotamento. Para isso, dissolve-se uma ansa de 10 μ L de fezes em cerca de 3mL de água esterilizada.

As zaragatoas são processadas por inoculação no primeiro quadrante e estriamento por esgotamento. A única exceção são as zaragatoas vaginais e rectais para pesquisa de *Streptococcus* do grupo B em meio *Group B Streptococcus* (GBS), que é inoculada em toda a placa sem estriamento.

Para produtos como cabelo, escamas, unhas, raspado de cabelo e pele que são rececionados entre lâminas de vidro ou em recipiente estéril, a inoculação é efetuada com a ajuda de uma ansa colocando toda a amostra possível diretamente no meio de cultura Sabouraud, sem estriar.

A sementeira nos meios líquidos é efetuada adicionando cerca de 1mL de produto no meio. No caso do caldo de Tioglicolato, esta adição deve ser efetuada com extremo cuidado para não libertar ar no meio. No caso de produtos, tais como drenos, córneas, lentes de contacto, biopsias, fragmentos de tecidos e pele, a sementeira efetua-se apenas por submersão no meio líquido.

2.1.2.3. Análise Macroscópica de Crescimento Microbiológico

A análise dos meios de cultura, após incubação, é efetuada pela observação macroscópica da morfologia das colónias, a sua coloração, padrões de crescimento ou simplesmente o não crescimento. Esta valorização, efetuada pelos clínicos, permite dirigir o estudo para a identificação do microorganismo causador da patologia.

A qualidade inicial do produto, fator determinante no resultado final, também pode ser inferida por esta análise, especialmente no caso de urinas obtidas por micção e secreções brônquicas obtidas por emissão, em que a colheita é passível de contaminação. Por este motivo, nas amostras de urina com co-crescimento de mais de três tipos de colónias, habitualmente, não é efetuada a identificação dos microorganismos presentes. Contudo, há exceções a este procedimento, tais como a existência de um tipo de colónia inequivocamente predominante, existências de colónia com características típicas de um microorganismo patológico frequente ou ainda quando há indicação de presença de infeção na urianálise.

Nas sementeiras quantitativas é também efetuada a contagem, que é reportada no boletim analítico. Cada colónia (*Colony-forming unit*, CFU), num meio de cultura em que a amostra foi semeada com uma ansa de 1 μ L = 0.001mL, corresponde a 1 colónia = 10³ CFU/mL, 10 colónias = 10⁴ CFU/mL e 100 colónias = 10⁵ CFU/mL. Da mesma forma, se a

sementeira foi efetuada com uma ansa de $10\mu\text{L} = 0,01\text{ mL}$, cada colónia representa 100 CFU/mL , pelo que $1\text{ colónia} = 10^2$, $10\text{ colónias} = 10^3$ e $100\text{ colónias} = 10^4$. Os resultados são indicados como inferior a 10^3 , entre 10^3 a 10^4 ou superior a 10^5 .

O uso de meios seletivos e diferenciais são cruciais para o exame cultural. Os meios seletivos contêm ingredientes que inibem o crescimento de alguns organismos e permitem o crescimento de outros e os meios diferenciais contêm compostos que permitem a distinção de grupos de microorganismos pelas características das colónias e/ou meio envolvente (Tabela 2).

Tabela 2 – Características seletivas e diferenciais de meios de cultura.

Meios de Cultura	Seletivo	Diferencial	Figura
GS		x	16
GC			
MAC	x	x	17
CLED		x	18
MSA	x	x	20
SCG2	x		21
SS	x	x	22
YER	x	x	23a)
DCO	x	x	23b)
CAM	x	x	23c)
GBS	x	x	24
Middlebrook 7H9	x	x	44
LJ	x	x	45

O tipo de hemólise evidenciado no meio de gelose de sangue (GS) permite uma identificação preliminar da bactéria (Figura 16). Na alfa-hemólise há uma destruição parcial dos eritrócitos em torno da colónia, acompanhada por uma descoloração verde-acastanhada do meio. Na beta-hemólise a lise dos eritrócitos é completa e é visível um halo sem cor em torno da colónia. Finalmente, a gama-hemólise consiste na não capacidade hemolítica.

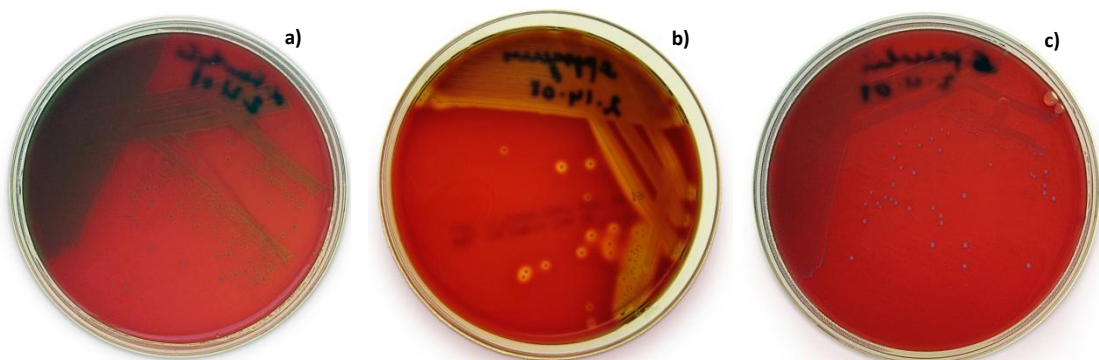


Figura 16 – Tipos de hemólise em meio de gelose de sangue: a) *S. pneumoniae*, organismo alfa-hemolítico, b) *S. pyogenes*, organismo beta-hemolítico e c) *E. coli*, organismo não hemolítico. Adaptado de <http://learn.chm.msu.edu>.

O meio de gelose de chocolate (GC) não é seletivo, nem diferencial, mas é útil pelo facto de existirem microorganismos fastidiosos, tais a *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.*, que apenas crescem neste meio.

O meio de cultura MacConkey (MAC) é seletivo, pela presença de sais biliares apenas permitindo o crescimento de microorganismos Gram negativos, e diferencial, pois permite a distinção de microorganismos fermentadores (colónias e meio rosa) e não fermentadores da lactose (colónias e meio amarelos), pela existência de cristais violeta no meio (Figura 17).

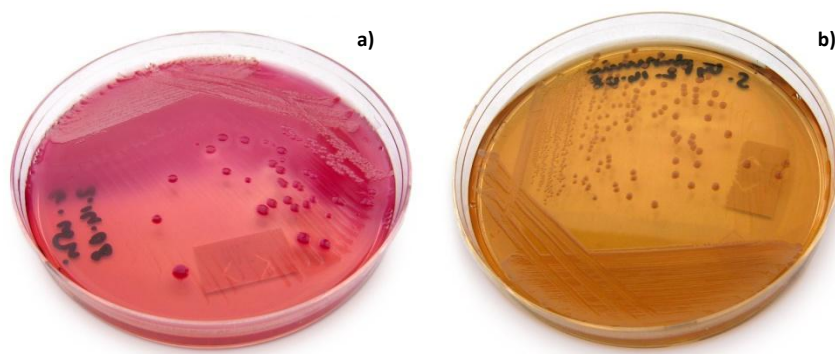


Figura 17 – Meio de cultura MacConkey (MAC): a) *E. coli*, organismo fermentador da lactose e b) *S. Enteritidis*, organismo não fermentador da lactose. Adaptado de <http://learn.chm.msu.edu>.

O agar de cistina, lactose, deficiente em eletrólitos (CLED) é um meio de cultura não seletivo, mas diferencial pela presença do indicador azul de bromotimol. Desta forma, permite a diferenciação em microorganismos fermentadores e não fermentadores de lactose, ou seja, os microorganismos que fermentam a lactose reduzem o pH alterando a cor do meio de verde para amarelo (Figura 18). O facto de ser deficiente em eletrólitos evita o crescimento invasor, *Swarming*, de espécies como o *Proteus mirabilis*, comum em infeções urinárias (Figura 19).

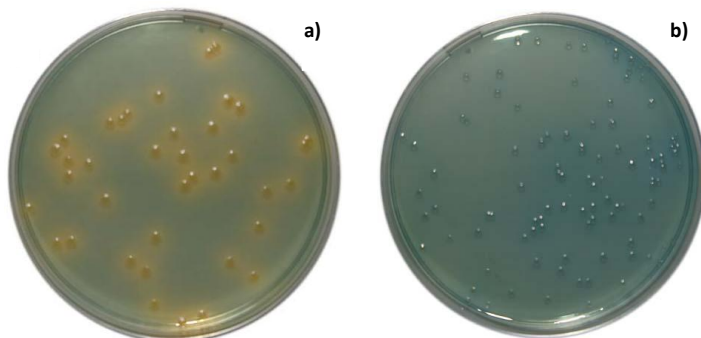


Figura 18 – Meio de cultura CLED: a) *E. coli*, organismo fermentador da lactose e b) *Proteus spp.*, organismo não fermentador da lactose. Adaptado de <http://www.eolabs.com>.



Figura 19 – Crescimento invasor em meio de gelose de sangue: *Proteus mirabilis*. Adaptado de <http://www.microbelibrary.com>.

O meio de *Manitol sal agar* (MSA) é um meio seletivo para o *Staphylococcus spp*, microorganismos com capacidade de crescer com elevadas concentrações de sal (7.5-10%). A presença do vermelho de fenol permite a distinção de microorganismos fermentadores e não fermentadores de manitol (Figura 20).

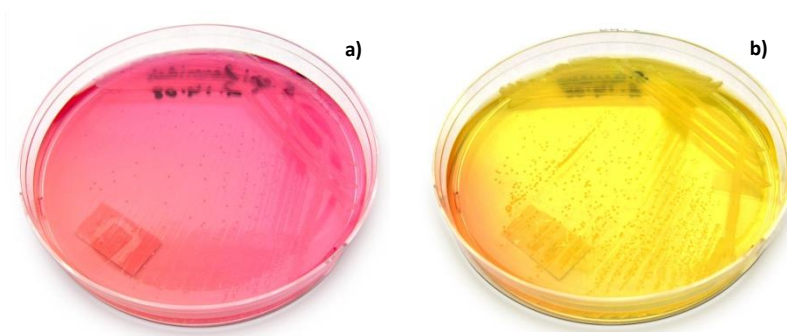


Figura 20 – Meio de cultura Manitol Sal agar: a) *S. epidermidis*, não fermentador do manitol e b) *S. aureus*, fermentador do manitol. Adaptado de <http://learn.chm.msu.edu>.

O meio seletivo para fungos utilizado é o meio de *Sabouraud dextrose cloranfenicol agar* (SGC2), meio que permite o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos (Figura 21). O crescimento bacteriano é prevenido pelo uso de antibióticos.

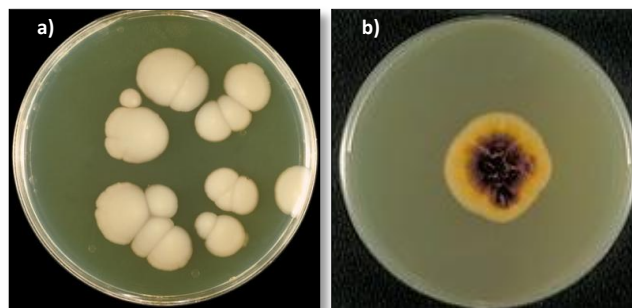


Figura 21 – Meio de Sabouraud dextrose cloranfenicol agar (SGC2): a) *Candida albicans* e b) *Trichophyton rubrum*. Adaptado de <http://www.wikipedia.com>.

O meio de Salmonella-Shigella é uma modificação do agar desoxicolato-citrato descrito por Leifson. É um meio seletivo e diferencial, utilizado no isolamento de bacilos entéricos patogénicos, especialmente os que pertencem ao género *Salmonella*. É seletivo por possuir sais biliares, inibindo o crescimento dos microrganismos gram-positivos e outras *Enterobacteriaceae*, que não as bactérias do género *Salmonella* e a *Shigella*. Permite a diferenciação de organismos fermentadores e não fermentadores da lactose, pela presença de indicador vermelho neutro no meio. Desta forma, os organismos fermentadores da lactose acidificam o meio e formam colónias vermelhas, e os organismos não fermentadores da lactose formam colónias incolores. A presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico no meio permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio, originando colónias com centros negros (Figura 22).



Figura 22 – Meio de cultura Salmonella-Shigella (SS): a) *E. coli*, fermentador da lactose, b) *Salmonella spp.*, organismo produtor de sulfureto de hidrogénio e c) *Shigella spp.*, organismo não fermentador da lactose e não produtor de sulfureto de hidrogénio. Adaptado de <http://iws2.collin.edu>.

O meio Yersinia (YER) é um meio de isolamento seletivo e diferencial, usado na deteção e diferenciação de espécies de *Yersinia spp.*, em amostras de fezes. As colónias de *Yersinia spp.* apresentam uma coloração rosa a vermelha (Figura 23a).

O meio D-coccosel agar (DCO) é um meio seletivo de bile-esculina. É usado para isolar e diferenciar *Enterococcus spp.* e *Streptococcus spp.* do grupo D, de espécies polimicrobianas. As colónias são incolores ou cinzentas rodeadas por um halo negro pela hidrólise da esculina (Figura 23b). A seletividade do meio para bactérias Gram-negativas é conseguida pela azida sódica, a bile inibe certas bactérias Gram-positivo.

O meio seletivo Campyloesel (CAM) é usado para isolar *Campylobacter spp.* intestinal (*C. jejuni* e *C. coli*) a partir de amostras de fezes. A presença de sangue de carneiro favorece o crescimento das espécies alvo e a capacidade nutritiva é potenciada pelo uso de agentes redutores. Uma boa seletividade é assegurada por antibióticos e antifúngicos que inibem a maioria de bactérias e fungos contaminantes. As colónias de *Campylobacter spp.* são características, pequenas e cinzentas (Figura 23c).

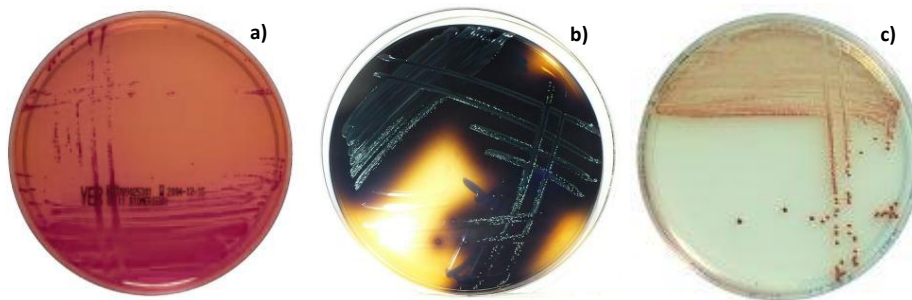


Figura 23 – Meios de cultura Yersinia agar (a), D-coccosel agar (b) e Campyloesel agar (c). Adaptado de <http://www.gefor.4t.com>.

O meio cromogénico GBS (Grupo B *Streptococcus* agar), seletivo e diferencial, é usado para o isolamento e identificação de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B) de amostras clínicas. Neste meio a estirpe *S. agalactiae* origina a formação de colónias de cor laranja-salmão devido à sua própria pigmentação específica (Figura 24).

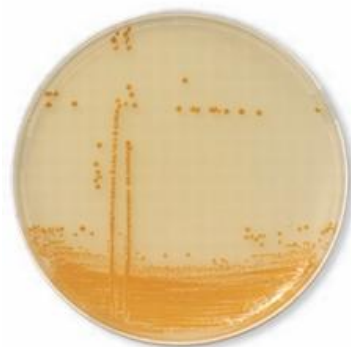


Figura 24 – *S. agalactiae* em meio GBS. Adaptado de <http://www.biomerieux.com>.

2.1.2.4. Análise Automática de Crescimento Microbiológico

Como já foi referido, nos meios de cultura líquidos é mais difícil a visualização do crescimento microbiológico. Para ultrapassar este facto, foram desenvolvidos meios comerciais com sensores que detetam o crescimento de microorganismos pelo aumento da fluorescência gerada pela produção de CO₂, produto do seu metabolismo (Figura 25). O aumento da fluorescência emitida pelos sensores é lida de 10 em 10 minutos em estufa própria, BD Bactec.

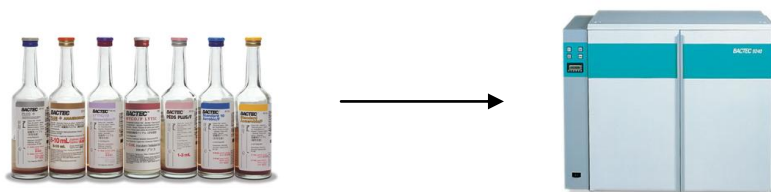


Figura 25 – Meios de cultura líquidos com sensores de crescimento por fluorescência e estufa Bactec®.

Estes meios são utilizados para inoculação de sangue, hemoculturas, e podem ser específicos para o crescimento de bactérias, aeróbias e anaeróbias, e fungos. A colheita deve ser efetuada usando técnicas estéreis, prevenindo a contaminação bacteriana, e inoculado 8 a 10mL na garrafa. O tempo de incubação máximo, para que se conclua que a amostra é negativa, difere para cada tipo de meio e/ou microorganismo a pesquisar.

Os meios BD Bactec™Plus Aerobic/F e BD Bactec™Plus Anaerobic/F são usados para detetar qualitativamente o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias, a partir do sangue. Consistem em meios líquidos de soja-caseína digerida (TSB), com extrato de levedura. O meio anaeróbio possui agentes redutores adicionais para garantir a ausência de ar. A hemocultura é inserida na estufa própria BD Bactec, incubando por um período máximo de 5 dias a 35±2°C.

O meio BD Bactec™Mycosis-IC/F é usado para detetar qualitativamente o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, a partir do sangue. O meio baseia-se em meio líquido *brain-heart infusion* (BHI) e soja-caseína digerida (TSB). A hemocultura é inserida na estufa própria BD Bactec, incubando por um período máximo de 11 dias a 25±2°C.

A deteção de positividade é a indicação presuntiva da presença de microorganismos viáveis, pelo que nestes casos deve ser feita a passagem a um meio sólido, gelose sangue ou sabouraud, para prosseguir com a sua identificação. Paralelamente, é efetuado um esfregaço em lâmina para coloração pelo método de Gram.

2.1.3. PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

Após a verificação de crescimento de microorganismos, nos meios de cultura líquidos e sólidos, são selecionadas as provas de identificação. Por vezes é necessária a execução de provas de identificação consecutivas até ser possível a identificação final do organismo causador de doença. Contudo, alguns testes permitem a identificação presuntiva imediata do microorganismo em causa.

2.1.3.1. Prova da Catalase

A prova da Catalase é realizada sempre que estamos perante um microorganismo Gram positivo. Para isso, é colocada numa lâmina de vidro uma porção de colónia isolada do organismo que pretendemos testar, e é adicionada uma gota de peróxido de hidrogénio. Um resultado positivo é visualizado pela libertação de gás (Figura 26).

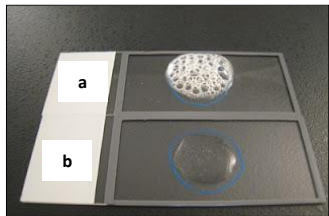


Figura 26 - Prova da Catalase. a) resultado positivo, b) resultado negativo.

2.1.3.2. Prova da Coagulase

A Prova da Coagulase é realizada sempre que estamos perante um microorganismo cocos Gram positivo, com prova da Catalase positiva. O teste é realizado com o kit Pastorex™ Staph-plus (Bio-Rad) que consiste num teste de aglutinação em látex para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*. O procedimento inicia-se pela colocação de uma gota de reagente, após agitação, no cartão de aglutinação. É selecionada uma colónia isolada do organismo que pretendemos testar, que é colocada com uma ansa em contacto com o reagente. A mistura é efetuada com um misturador de plástico fornecido pelo *kit* e o resultado visualizado em 30 segundos (Figura 27).

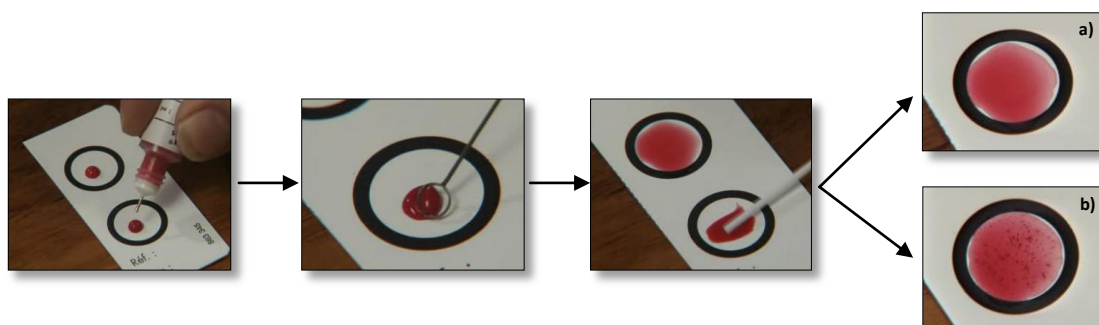


Figura 27 – Procedimento do teste da Coagulase: a) resultado negativo, b) resultado positivo.

Um resultado positivo é evidenciado pela formação de aglutinação, sendo uma identificação presuntiva de *S. aureus*. Um resultado negativo indica que se trata de um *Staphylococcus* coagulase negativo. Neste caso, o laboratório de microbiologia do CHSJ prossegue com a identificação do microorganismo em causa, e sua suscetibilidade a antibióticos, se a sua distinção for valorizável, como é o caso de uma amostra de urina ou duas hemoculturas. Pelo contrário, não são valorizáveis em produtos como o pus, caso em que não se prossegue com a identificação e o resultado é indicado como *Staphylococcus* coagulase negativo.

2.1.3.3. Prova da Oxidase

A prova da Oxidase é realizada sempre que estamos perante um organismo Gram negativo. É usado para distinguir os microorganismos que possuem a enzima citocromo oxidase, ou seja, distinguir os microorganismos oxidase negativos da família *Enterobacteriaceae* e oxidase positivos da família *Pseudomadaceae*, permitindo optar pelo conjunto de antibióticos mais adequados.

Há casos em que esta prova pode ser obviada pois colónias Lactose positivas são sempre oxidase negativas. Assim, o uso de meios como o CLED (colónias Lactose positivas possuem coloração amarela) e MacConkey (colónias Lactose positivas possuem coloração rósea) tornam possível a imediata escolha da carta de suscetibilidade.

O teste é realizado em papel de filtro colocando uma gota do reagente *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilenodiamina (TMPD). As bactérias que possuem a enzima citocromo oxidase oxidam este reagente, que se torna lilás vivo (Figura 28).

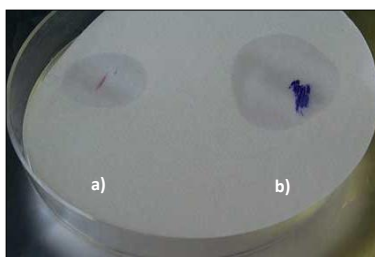


Figura 28 – Prova da Oxidase: a) resultado negativo, b) resultado positivo.
Adaptado de <http://www.uwo.edu>.

2.1.3.4. Teste da Optoquina

O microorganismo *Streptococcus pneumoniae* é sensível à Optoquina pelo que este teste permite a sua distinção de outros *Streptococcus spp.*, resistentes à Optoquina. O teste realiza-se em meio de gelose de sangue, que se divide em duas secções. São escolhidas duas colónias isoladas, uma colónia para cada secção da placa, que se estriam em três direções. É colocado um disco de Optoquina (P) em cada secção e a placa incuba durante 24 horas na estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A inibição de crescimento em torno do disco permite a identificação presuntiva de *S. pneumoniae* (Figura 29).

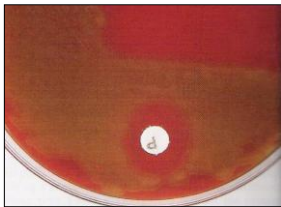


Figura 29 – Teste da Optoquina (P), com resultado positivo.

2.1.3.5. Teste dos Fatores X (Hemina) e V (NAD)

O microorganismo *Haemophilus influenzae* possui a particularidade de necessitar dos fatores X (hemina) e V (NAD) para crescer. Esta característica é utilizada para a sua identificação presuntiva. O teste realiza-se em meio de Muller-Hinton com sementeira em tapete, estriando em três direções com zaragatoa, a partir de uma suspensão com 0,5 McFarland (McF). Colocam-se três discos: fator X, fator V e um disco com os dois fatores X e V. O crescimento apenas em redor do disco com os dois fatores é indicativo da presença de *Haemophilus influenzae* (Figura 30).

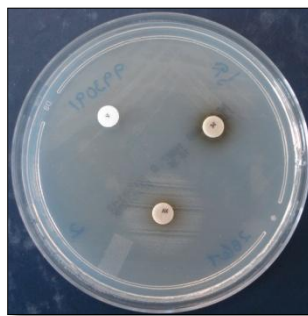


Figura 30 – Teste dos fatores X (Hemina) e V (NAD), com identificação presuntiva de *H. influenzae*.

2.1.3.6. Prova da Ureia

A prova da ureia permite identificar microorganismo que possuem urease, enzima que cataliza a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amónia: $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$.

A produção de urease é identificada pela alteração da cor do meio para rosa forte. Num resultado negativo o meio fica mais amarelo (Figura 31). Este teste é útil na identificação dos microorganismos *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, urease negativos. No caso da obtenção de um resultado negativo para o teste da ureia devemos inocular o organismo em meio *Kligler-iron agar* (KIA).

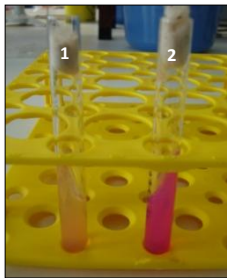


Figura 31 – Prova da Ureia: tubo 1 – negativo, tubo 2 – positivo.

2.1.3.7. Meio *Kligler-iron agar*

O meio de *Kligler-iron agar* é útil na diferenciação entre membros da família das *Enterobacteriaceae* e deve ser inoculado quando o teste da ureia é negativo. Permite obter informação simultânea da fermentação da glicose e lactose, produção de gás e a utilização de compostos orgânicos sulfurados existentes no meio.

A inoculação é feita em duplicado, por picada central e estria na rampa. Incuba durante 18-24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, devendo ser assegurada troca de ar. Os resultados possíveis estão descritos na Figura 32.

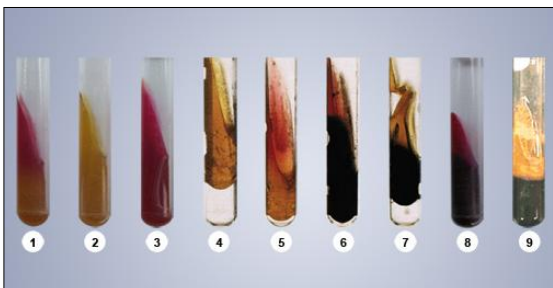


Figura 32 – Resultados possíveis no meio de Kligler-Iron agar (KIA): 1-fermentação da glicose, 2-fermentação da glicose e lactose, 3-sem fermentação, 4-fermentação da glicose e lactose com produção de gás, 5-fermentação da glicose e produção de gás, 6-fermentação da glicose, produção de gás e sulfito de hidrogénio, 7-fermentação da glicose e lactose com produção de gás e sulfito de hidrogénio, 8-fermentação da glicose e produção de sulfito de hidrogénio, 9-fermentação da glicose e lactose, com produção de sulfito de hidrogénio. Adaptado de <http://amrita.vlab.co.in>.

Os microorganismos *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* não fermentam a lactose pelo que, inicialmente, alteram a cor da rampa para amarelo devido ao ácido produzido na fermentação da glicose. Quando este açúcar se esgota, em aerobiose, a reação reverte para alcalina devido à oxidação dos ácidos (rampa vermelha), o que não ocorre em anaerobiose (fundo do tubo amarelo). Os organismos fermentadores de lactose produzem rampa e fundos amarelos porque produzem ácido suficiente para manter o pH ácido sob condições aeróbias. Por outro lado, organismos incapazes de fermentar glicose e lactose originam rampa e fundo vermelhos.

A produção de sulfito de hidrogénio é evidenciada pela produção de cor negra e a formação de gás pela presença de ar no tubo. As reações típicas dos membros das *Enterobacteriaceae* estão enumeradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Reações em meio KIA. O meio ácido torna-se amarelo e alcalino vermelho.

	Rampa	Fundo	Gás	H₂S
<i>Citrobacter</i>	alcalino	ácido	+	+/-
<i>Edwardsiella</i>	alcalino	ácido	+	+
<i>Escherichia coli</i>	ácido	ácido	+	-
<i>Enterobacter</i>	ácido	ácido	+	-
<i>Morganella</i>	alcalino	ácido	+/-	-
<i>Proteus</i>	alcalino	ácido	+	+
<i>Providencia</i>	alcalino	ácido	+/-	-
<i>Salmonella</i>	alcalino	ácido	+	+
<i>Shigella</i>	alcalino	ácido	-	-

2.1.3.8. Prova de utilização do Citrato

O meio citrato permite diferenciar microorganismos pela sua capacidade de utilizar o citrato como fonte de carbono, libertando CO₂ e tornando o meio alcalino, ou seja, azul forte (Figura 33).



Figura 33 – Meio Citrato: a) resultado positivo, b) resultado negativo.

2.1.3.9. Prova da Filamentação

No caso da visualização macroscópica de crescimento característico de *Candida spp.*, em meio de sabouraud, é feita a identificação presuntiva de *Candida albicans* pela prova de filamentação.

O procedimento é efetuado com um *pool* de soros humanos, onde é inoculada a cultura a testar com um inóculo reduzido (10^5 a 10^6 leveduras/mL). A mistura incuba durante 2 horas a 37°C em banho-maria ou durante 3 horas na estufa. Após incubação a mistura é visualizada ao microscópio ótico. A formação de tubo germinativo indica que estamos perante a levedura *Candida albicans* (Figura 34). Nesta prova o cumprimento do tempo de incubação é crucial pois após as 3 horas existem outras leveduras com esta capacidade, o que resultaria em resultados falsos positivos.

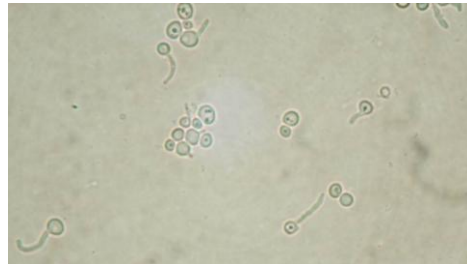


Figura 34 – Prova da filamentação com identificação presuntiva de *Candida albicans*. Adaptado de <http://www.med.ncku.edu.tw>.

2.1.3.10. Sistema de identificação automático Vitek®2

O sistema automático de identificação é efetuado sempre que não foi possível a identificação presuntiva do microorganismo por um dos testes anteriormente descritos. O sistema automático utilizado designa-se Vitek®2, sistema colorimétrico que usa diferentes cartas de identificação com provas bioquímicas liofilizadas.

Assim, a identificação automática é efetuada pelas cartas de identificação para microorganismos Gram negativo (GN ID Card, #21341) e Gram positivo (GP ID Card, #21342), consoante estamos perante um organismo Gram negativo ou Gram positivo, respetivamente. Se a suspeita recai num organismo fastidioso Gram negativo pode ainda ser utilizada a carta para Neisseria e Haemophilus (NH ID Card, #21346). No caso da presença de fungos leveduriformes é efetuada a identificação com o uso da carta de identificação para leveduras (YST ID Card, #21343).

Para a execução dos testes de identificação é realizada uma suspensão do microorganismo com uma solução salina (NaCl a 0.45%), que é ajustada a 0,5-0,6 McF para as bactérias Gram negativos e positivos, 3,0 McF para a carta NH e a 1,9-2,5 McF para a carta dos fungos YST. Diariamente, é efetuada uma prova de esterilidade à solução salina, por inoculação em meio de gelose de sangue. Os dados das cartas e a microorganismos são introduzidos em sistemas periféricos ao equipamento com o auxílio de códigos de barras (Figura 35).



Figura 35 – Carta vitek, sistema periférico e Equipamento Vitek®2. Adaptado de <http://www.biomerieux.com>

2.1.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS, ANTIBIOGRAMAS

Os testes de suscetibilidade a antibióticos podem ser efetuados manualmente ou de forma automática, conforme descrito em 2.1.3.10.

2.1.4.1. Teste de Suscetibilidade a antibióticos por difusão

O teste de suscetibilidade por difusão é efetuado em meio Muller-Hinton para a maioria dos microorganismos. No caso de *Streptococcus spp.* é efetuada em gelose de sangue Muller-Hinton (GSMH) e para o *Haemophilus spp.* em meio *Haemophilus test medium* (HTM). A sementeira do microorganismo é efetuada em tapete, estriando em três direções com zaragatoa, a partir de uma suspensão com 0.5 McF (Figura 36). Finalmente, são colocados os discos impregnados nos antibióticos que se pretendem testar. Numa placa colocam-se até 7 discos.

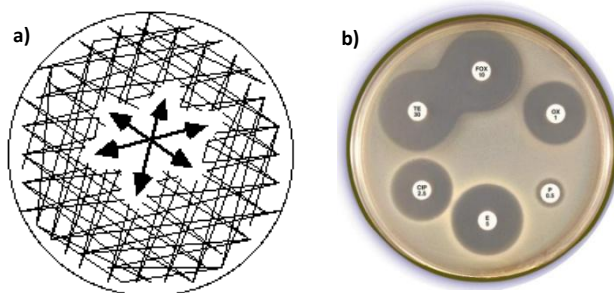


Figura 36 – Teste de suscetibilidade: a) esquema representativo da sementeira em tapete; b) exemplo de uma placa com seis discos.

Este procedimento é útil para acrescentar um antibiótico não incluído no teste automático, ou em casos em que é identificado um microorganismo altamente resistente aos antibióticos testados, de forma a fornecer uma alternativa ao clínico. O resultado é lido pela medição do halo de inibição, com o auxílio de uma craveira, concluindo se o organismo é resistente, intermédio ou sensível para cada antibiótico (Figura 37). Com este teste de suscetibilidade é possível também determinar sinergias e antagonismos entre antibióticos (Figura 38).

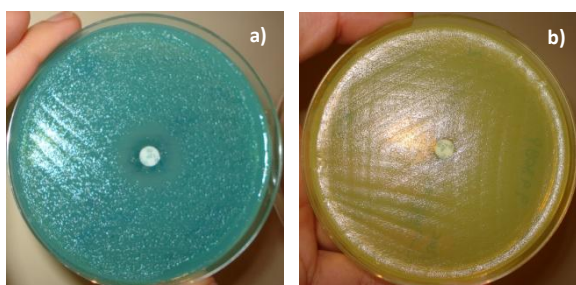


Figura 37 – Exemplos de testes de suscetibilidade para Piperacillin/Tazobactam (TZP) de duas estirpes de *P.aeruginosa*: a) sensível e b) resistente.

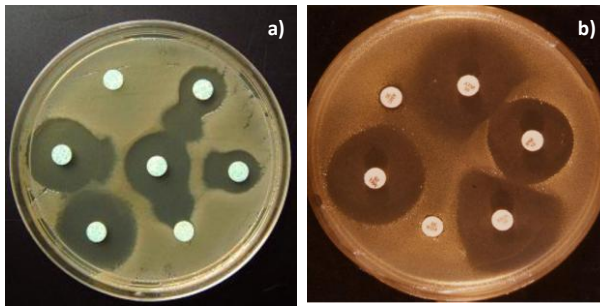


Figura 38 – Antibiogramas. a) Sinergismo e b) Antagonismo entre antibacterianos.

2.1.4.2. Teste de Suscetibilidade com determinação da concentração mínima inibitória, ϵ -teste®

O ϵ -teste® é um teste de suscetibilidade de difusão mas o disco é substituído pela tira de ϵ -teste® (Figura 39). Neste teste, há um gradiente de difusão do antibiótico ao longo da tira permitindo determinar a sua concentração mínima inibitória (CMI). Este valor corresponde à concentração mínima de antibiótico que é necessária para que ocorra inibição do crescimento do organismo em causa.

O número máximo de tiras ϵ -teste são três, por placa, devendo ser colocadas com as extremidades opostas para ser possível a leitura correta do halo de inibição.

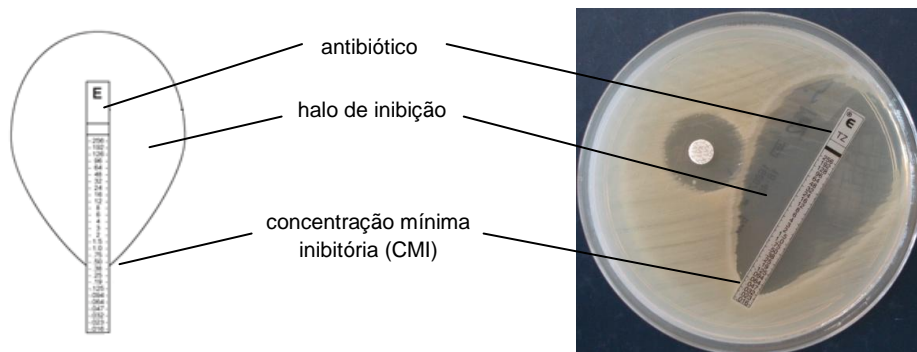


Figura 39 – Esquema ilustrativo de um ϵ -teste®, visualizando-se o halo de inibição e CMI.

2.1.4.3. Sistema automático de determinação de suscetibilidade Vitek®2

O sistema automático para a determinação do antibiograma utilizado é o equipamento Vitek®2, sistema colorimétrico que utiliza diferentes cartas com antibióticos liofilizados em poços.

Para cada tipo de microorganismo identificado é escolhido o conjunto de antibióticos mais adequados. Durante o estágio no laboratório de microbiologia a carta de suscetibilidade AST-619 era a utilizada para microorganismos Gram positivos - catalase positivos e a carta AST-586 para os microorganismos Gram positivos - catalase negativos.

Por outro lado, para microorganismos Gram negativos é a prova de oxidase que direciona para a melhor combinação de antibióticos a testar. Assim, no caso de estarmos perante um microorganismo oxidase negativo a carta de suscetibilidade da família das *Enterobacteriaceae* AST-192 era a carta utilizada e, para organismos oxidase positivo, a carta da família *Pseudomonaceae* AST-093.

2.1.5. TESTES IMUNOLÓGICOS

Há um conjunto de testes imunológicos que se executam diretamente do produto biológico colhido. Estes testes são úteis em casos de urgência, pela rapidez do teste.

2.1.5.1. Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* na urina

O teste BinaxNow® *S. pneumoniae* é um teste imunocromatográfico para a deteção de antigénio solúvel de *S. pneumoniae*, em amostras humanas de urina e LCR. Para isso, a linha de amostra possui adsorvido um anticorpo de coelho anti-*S. pneumoniae*.

Os resultados são interpretados pela presença ou ausência das linhas amostra e controlo. A ausência da linha controlo invalida o teste (Figura 40).

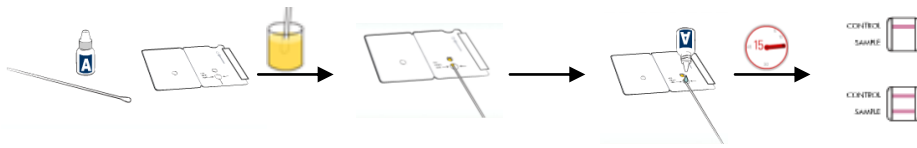


Figura 40 - Esquema ilustrativo do procedimento do teste para a pesquisa de *S. pneumoniae* na urina.

2.1.5.2. Pesquisa de *Legionella pneumophila* na urina

O teste BinaxNow® *L. pneumophila* é um teste imunocromatográfico para a deteção de antigénio solúvel de *L. pneumophila* serogrupo 1, em amostras humanas de urina. Para isso, a linha de amostra possui adsorvido um anticorpo de coelho *L. pneumophila* serogrupo 1. O procedimento e interpretação do teste são efetuados conforme descritos em 2.1.5.1.

2.1.5.3. Pesquisa de *Helicobacter pylori* nas fezes

A pesquisa de *Helicobacter pylori* é um imunoensaio cromatográfico que utiliza um anticorpo monoclonal para a deteção qualitativa de antígenos *Helicobacter pylori*, em fezes humanas.

A execução do teste inicia-se pela diluição das fezes a testar. Para isso, utiliza-se o aplicador para retirar uma pequena porção das fezes, que se insere de imediato no frasco que contém o diluente e agita-se em vórtex durante 15 segundos. De seguida parte-se a ponta do frasco que se torna num conta-gotas, permitindo a colocação de quatro gotas das fezes diluídas na janela indicada. Após uma incubação de 5 minutos é efetuada a leitura dos resultados devendo ser visualizada sempre a linha controlo (C) azul e no caso de resultado positivo é visualizada também a linha teste (T) rosa-avermelhada (Figura 41).

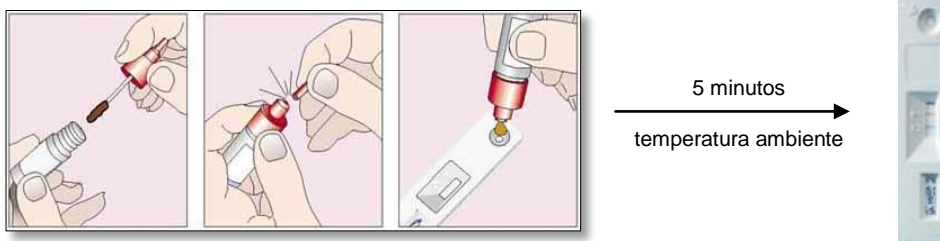


Figura 41 - Esquema representativo da execução do teste ImmunoCard STAT!HpSA.

2.1.5.4. Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus nas fezes

O teste para a pesquisa de Rotavírus e Adenovírus é efetuada por um teste imunocromatográfico para a determinação qualitativa simultânea destes dois tipos de vírus, em fezes humanas. Para isso, o teste engloba dois anticorpos monoclonais dirigidos contra o rotavírus e adenovírus. O procedimento do teste é idêntico ao descrito em 2.1.5.3.

2.1.5.5. Pesquisa de *Cryptosporidium parvum*

O teste RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium* é um teste imunocromatográfico para a determinação qualitativa de *Cryptosporidium parvum* em fezes humanas. Para isso, o teste engloba um anticorpo monoclonal dirigido contra o *Cryptosporidium parvum*.

O procedimento do teste é idêntico ao descrito em 2.1.5.3.

2.2. MICOBACTERIOLOGIA

As micobactérias, bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), são tratadas numa área independente do laboratório de Microbiologia, pois requerem um maior nível de segurança, dada a sua elevada patogenicidade. Por este motivo, o laboratório está equipado com duas câmaras de fluxo laminar, onde são manipulados todos os produtos. As boas práticas laboratoriais e o cumprimento das normas de segurança pelos profissionais de saúde são essenciais na prevenção e controlo desta doença.

2.2.1. PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Para pesquisa de Micobactérias são rececionadas amostras, de origem pulmonar e extra-pulmonar, passíveis de contaminação. Estas amostras, tais como as secreções brônquicas, lavados brônquicos e bronco-alveolares, urina, fezes, pele, devem ser descontaminadas previamente à inoculação de forma a eliminar a flora associada e otimizar a recuperação das micobactérias.

O protocolo de fluidificação e descontaminação é efetuado com o kit BD BBL™ MycoPrep, que consiste em hidróxido de sódio 2% (NaOH) e N-acetil-cisteína. Assim, adiciona-se igual volume de reagente BD BBL™ MycoPrep ao produto num tubo cónico de 50mL e agita-se em *vórtex* até liquidificar a mistura que incuba durante 15 minutos, agitando ocasionalmente. Adiciona-se tampão fosfato pH6.8 até cerca de 45-50mL e centrifuga-se durante 15 a 20 minutos a 3000g. Decanta-se o sobrenadante cuidadosamente e adiciona-se 1mL de tampão fosfato pH6.8 ressuspensando o sedimento. Esta suspensão, após acertar o pH a 6.8, é usada para inocular o meio de cultura e preparar duas lâminas para coloração álcool-ácida. As amostras de fezes são colocadas em meio líquido Middlebrook 7H9 antes de submetidas ao protocolo de descontaminação.

As amostras não contaminadas não necessitam de descontaminação, mas podem requerer um passo de concentração. É o caso de líquidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano, e sangue com volumes superiores 10mL. Para isso efetua-se uma centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos e decanta-se o sobrenadante.

2.2.2. EXAME DIRETO

Conforme referido anteriormente, após a descontaminação do produto, são preparadas duas lâminas para coloração álcool-ácida. Todas as amostras são coradas pelo método da Auramina, método de *screening* com elevada sensibilidade. Os resultados positivos por este método, são confirmados pelo método de Kinyoun, método mais específico.

2.2.2.1. Coloração pelo método de Auramina

A coloração álcool-ácida pelo método de Auramina está descrita na Figura 42a). As amostras são analisadas em microscópio de fluorescência, devendo ser analisados, no mínimo, 50 campos em objetiva de 40x para que o resultado seja considerado negativo.

2.2.2.2. Coloração pelo método de Kinyoun

O método de coloração de Kinyoun (Figura 42b), Ziehl Nielsen a frio, é um método de coloração de organismos álcool-ácido resistentes, especialmente micobactérias, com maior especificidade. Devem ser analisados entre 100 a 300 campos em objetiva de 100x, em microscópio de campo claro, para que o resultado possa ser considerado negativo.

No caso de visualização, na coloração pelo método de Kinyoun, organismos com aspecto característico de *Nocardia spp.*, é efetuada uma lâmina para coloração pelo método de Kinyoun modificado.

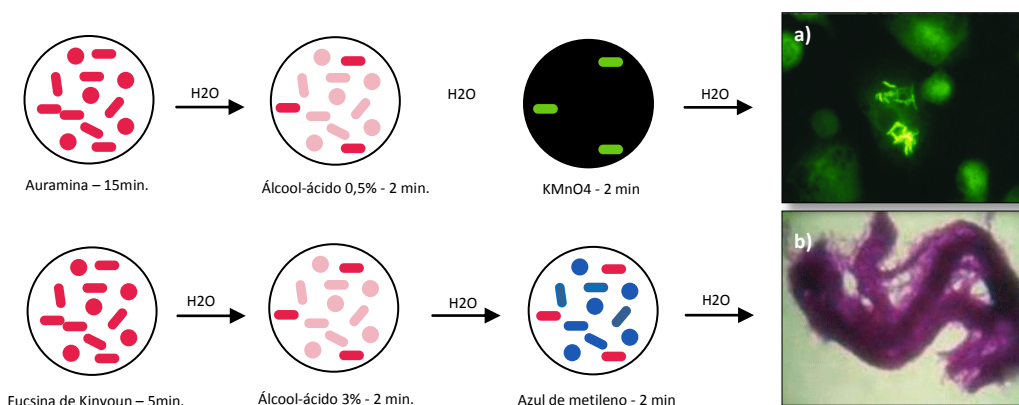


Figura 42 – Colorações álcool-ácido para pesquisa de Micobactérias: a) método da Auramina, (b) método de Kinyoun.

2.2.2.3. Coloração pelo método de Kinyoun modificado

O método de Kinyoun modificado difere do método clássico pela alteração do ácido hidroclorídrico por ácido sulfúrico. Este método de coloração álcool-ácido é usado para confirmar a presença de *Nocardia spp.* e na deteção de oocistos de coccídeos, em amostras de fezes (Figura 43).

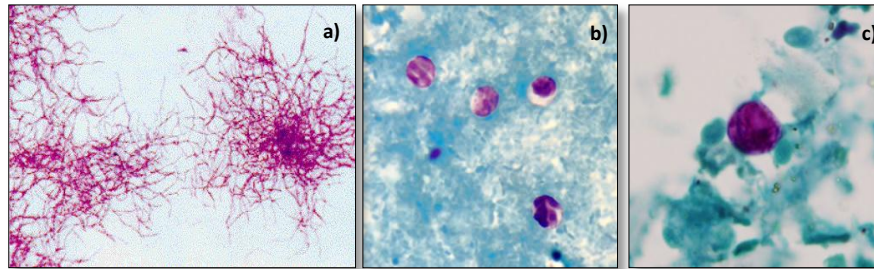


Figura 43 - Coloração pelo método Kinyoun modificado. a) *Nocardia spp.*, adaptado de <http://fundacionio.org>, b) oocistos de *Cyclosporidium parvum* e c) oocistos de *Cyclospora cayetanensis*. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>.

2.2.3. EXAME CULTURAL

Para a pesquisa de micobactérias é usado o meio de Middlebrook 7H9⁹. O crescimento é visível em colónias que se assemelham a flocos de algodão, esferas ou em tapete no fundo do tubo (Figura 44).

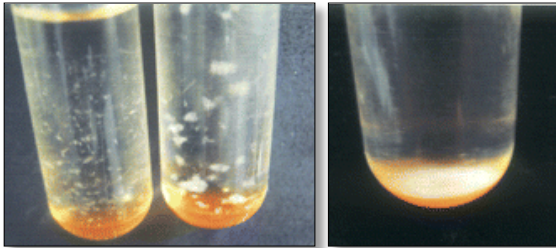


Figura 44 – Crescimento microbiano em meio Middlebrook 7H9.

As amostras para pesquisa de micobactérias são inoculadas em meio comercial *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT)TM, meio líquido Middlebrook 7H9 com um pool de antibióticos BBL MGIT PANTATM (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin).

Após inoculação, os meios incubam até 42 dias, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, na estufa Bactec MGIT960, que monitoriza o crescimento de forma automática. O crescimento é detetado com o aumento da fluorescência devido à diminuição da concentração de O_2 . A deteção de positividade é a indicação presuntiva da presença de microorganismos viáveis. Contudo, dado que o meio não é seletivo, poderá haver crescimento de outros microorganismos aeróbios. A observação de uma lâmina corada pelo método de Kinyoun permite a distinção de microorganismos álcool-ácido resistentes e outros microorganismos que possam ter proliferado. No caso de positividade por inquinação é efetuada uma segunda descontaminação e re-incubação.

As amostras positivas, após confirmação da presença de microorganismos álcool-ácido resistentes na coloração pelo método de Kinyoun, são retiradas da estufa e são efetuadas passagens para os meios GS, Middlebrook 7H11 e *Lowenstein-jensen* (LJ).

Como alternativa ao meio MGITTM pode ser efetuada a inoculação do produto descontaminado em meio BD BACTECTM MycoF. Este meio é usado em amostras de pele, líquido articular, líquido pleural e hemoculturas. No caso da pele e líquidos articular e pleural é efetuada a inoculação em duplicado, para incubação a duas temperaturas, $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A estufa a 25°C não possui detetor de crescimento, pelo que todas as amostras são coloradas pelo método de Kinyoun para avaliação verificar a presença de microorganismos álcool-ácido resistentes.

Para as hemoculturas, efetuadas usando técnicas estéreis de forma a prevenir contaminação bacteriana, são inoculados 1 a 5mL de sangue periférico em cada garrafa. A hemocultura é inserida na estufa própria BD Bactec, incubando por um período máximo de 42 dias a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Adicionalmente podem ser inoculados meios sólidos, como o meio de *Lowenstein-jensen* (Figura 45), no caso de produtos nobres, e os meios sólidos de *Middlebrook 7H11* e gelose de sangue, no caso de suspeita de *Nocardia spp.* O meio de *Lowenstein-jensen* é semeado colocando 0,5mL de produto na rampa e mexendo o tubo para que o produto seja absorvido pelo meio. Após inoculação, este meio deve permanecer inclinado e com a tampa semi-aberta durante 48 horas.

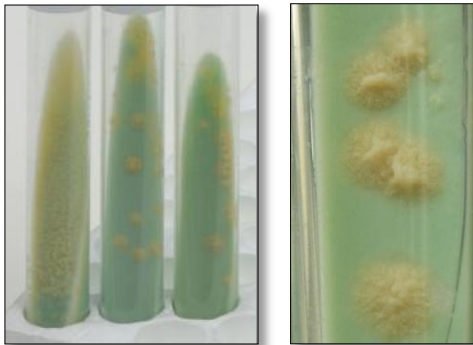


Figura 45 - Micobactérias em meio *Lowenstein-jensen*, colónias rugosas.

2.2.4. PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

2.2.4.1. Identificação de micobactérias - AccuProbe®

O método de identificação AccuProbe® é um teste de identificação rápido com sondas de DNA específicas, baseado na técnica de hibridização de ácidos nucleicos (Figura 46). As sondas de DNA são conjugadas com um marcador quimioluminescente complementar ao RNA ribossômico (rRNA) do organismo alvo. Após libertação do rRNA do organismo alvo, a sonda hibridiza com este, formando um complexo estável DNA-RNA. O reagente de seleção permite diferenciar as sondas hibridizadas e o luminómetro GenProbe Leader 50i mede o sinal luminoso (RLU) emitido.

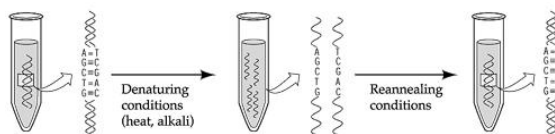


Figura 46 – Técnica de hibridização de ácidos nucleicos. Adaptado de <http://9e.devbio.com>.

O teste é efetuado a culturas positivas em meio de *Middlebrook* 7H9, após confirmação pela coloração de Kinyoun da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Para a execução do teste retiram-se 0,9 mL de cultura que se concentram por centrifugação. Rejeita-se o sobrenadante, assegurando que permanecem cerca de 200 µL de concentrado, que é homogeneizado. Adicionam-se 100 µL de solução de hibridização (solução tampão) a 100 µL da cultura concentrada, que se agitam em vórtex. A lise do organismo presente na cultura é conseguida por ultra-sons durante 15 minutos num banho-ultrasónico, seguida de uma incubação de 10 minutos em bloco de aquecimento a $95\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Após a lise é efetuada a hibridização com a sonda específica. Para isso, são colocados 100 µL de amostra lisada no tubo que contém a sonda ligada, que incuba a $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos em bloco de aquecimento. Seguidamente, adicionam-se 300µL de reagente de seleção agitando em vórtex. É efetuada nova incubação a $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de incubação entre 5 a 10 minutos, dependendo do microorganismo em causa. Após o arrefecimento, de pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente, é efetuada a leitura do luminómetro GenProbe Leader 50i durante a hora seguinte.

Os resultados são interpretados em função de um valor de *cut-off* de 30000 RLU. As amostras que emitem um sinal luminoso de valor igual ou superior a esse limiar são consideradas positivas. As amostras que emitirem um sinal luminoso na zona duvidosa, 20000 – 29999 RLU, são consideradas equívocas e o procedimento deve ser repetido. Valores inferiores a 20000 RLU são considerados negativos.

Neste laboratório são usadas sondas para a identificação de *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti* e *M. microti*), *Mycobacterium avium complex* (*M. avium*, *M. intracellulare* e outros), *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium kansasii*.

No caso da obtenção de um resultado positivo para o *Mycobacterium tuberculosis complex* ou *Mycobacterium avium complex*, a discriminação é efetuada pelo método Genotype®.

2.2.4.2. Identificação de micobactérias - Genotype®

Os testes Genotype® *Mycobacterium* permitem a identificação de micobactérias comuns (Genotype® *Mycobacterium* CM) e atípicas (Genotype® *Mycobacterium* AS).

O procedimento inclui a extração de DNA, a amplificação com *primers* biotinizados e uma hibridização reversa (Figura 47).

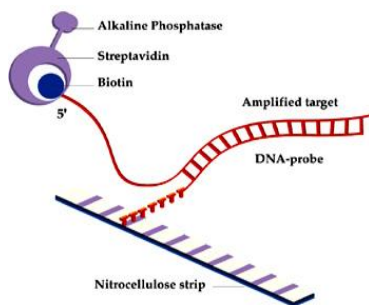


Figura 47 – Procedimento de identificação de Micobactérias pelo teste GenoType®. Adaptado de <http://www.microbe-edu.org>.

A extração de DNA é efetuada a partir de culturas de bactérias em meio *Middlebrook* 7H9. É retirado 1mL da cultura que se concentra por centrifugação a 10000g durante 15 minutos. O sobrenadante é descartado, as bactérias ressuspendidas em cerca de 200 µL e agitadas em vórtex. As bactérias são lisadas com uma incubação a 95°C durante 20 minutos e posterior incubação em banho-ultrasónico durante 15 minutos. Após uma centrifugação durante 5 minutos à velocidade máxima, obtém-se o DNA das bactérias no sobrenadante.

A amplificação é efetuada com 5 µL do sobrenadante obtido na extração, que se adiciona a 45µL mistura de amplificação (*primers*, MgCl₂, tampão, água e DNA polimerase). A amplificação do DNA é conseguida por um programa de amplificação, que consiste em ciclos de temperatura que permitem a desnaturação, o *annealing* dos *primers* biotinizados e posterior extensão pela DNA polimerase.

A deteção dos produtos amplificados é efetuada por hibridização no equipamento automático GT-Blot 20. É efetuada a desnaturação dos produtos amplificados adicionando a cada poço 20 µL de solução de desnaturação a igual volume de amplificado. É adicionado 1mL de tampão de hibridização e a tira de nitrocelulose com oligonucleótidos específicos imobilizados, que incubam 30 minutos a 45°C, com agitação. O tampão é aspirado e adiciona-se 1mL de solução adstringente, que incuba 15 minutos a 45°C, em agitação. A solução adstringente é aspirada e, após uma lavagem à temperatura ambiente, é adicionado 1mL de conjugado diluído (streptavidina), que incuba 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação são efetuadas duas lavagens, e é adicionado 1mL de substrato (fosfatase alcalina) que incuba no escuro, à temperatura ambiente, sem agitação. A reação é parada após duas lavagens com água e as tiras são secas ao ar.

A identificação final é efetuada pela leitura das bandas positivas, verificando a positividade das bandas controlo para a validação do teste (Figura 48).

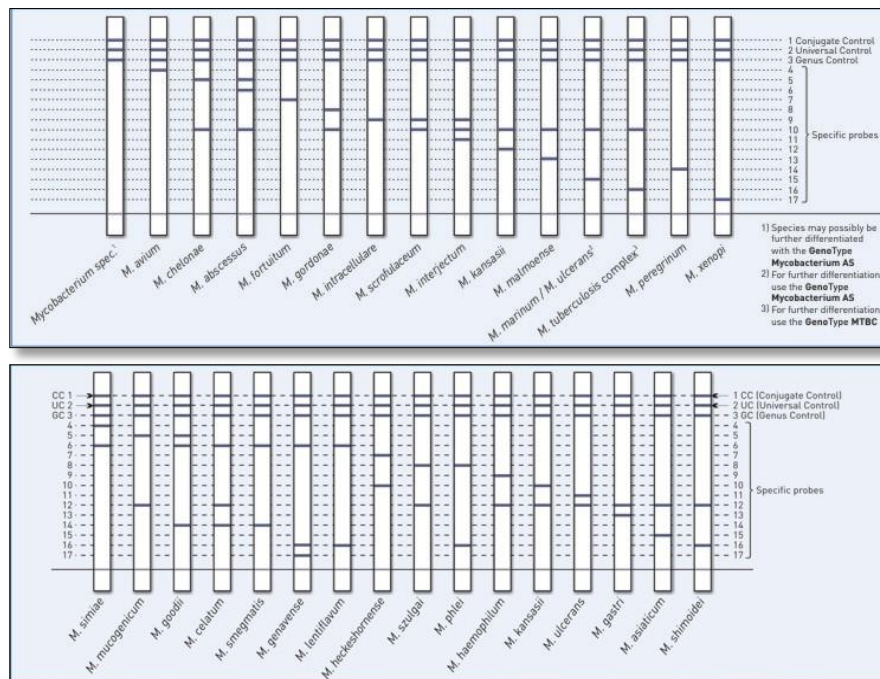


Figura 48 – Padrões de positividade para a identificação de Micobactérias pela técnica Genotype®. Adaptado de <http://www.hain-lifescience.de/en>.

2.2.5. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS MGIT™

Os testes de suscetibilidade a fármacos são essenciais para o tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento envolve um regime múltiplo de fármacos que normalmente incluem a Estreptomina (SM), Rifampicina (RMP) e Etambutol (EMB). É muito importante que os fármacos prescritos possuam atividade apropriada contra o organismo isolado e, por este motivo, os testes de suscetibilidade são efetuados pelo método das proporções. Este método consiste em detetar a proporção de bacilos resistentes numa cultura em presença de uma determinada concentração de fármaco.

Assim, após a identificação da micobactéria presente, é efetuado o teste BACTEC MGIT 960 SIRE e o teste BACTEC Pirazinamida (PZA) (Figura 49). O teste BACTEC MGIT 960 SIRE é um teste qualitativo de 4 a 13 dias que permite avaliar a concentração crítica para Estreptomina (SM) 1,0µg/µL, Isoniazida (INH) 0,1µg/µL, Rifampicina (RMP) 1,0µg/µL e Etambutol (EMB) 5,0µg/µL. O teste BACTEC Pirazinamida é um teste qualitativo de 4 a 21 dias que permite avaliar a concentração crítica de Pirazinamida (PZA) 100µg/µL. Os testes são efetuados em meio Middlebrook 7H9, usando os tubos BBL™MGIT™ que suportam o crescimento e deteção de micobactérias. Esta deteção é conseguida pelo composto fluorescente que o tubo possui, sensível à presença de oxigénio dissolvido no meio.

Os tubos são preparados previamente com a adição de 0,8mL de suplemento e 100 µL de antibiótico respetivo. Assim, é adicionado BBL™MGIT™PANTA™ aos tubos de controlo SIRE, Isoniazida e Etambutol, Bactec™MGIT™960 SIRE *Supplement* aos tubos de Rifampicina e Estreptomina, e Bactec™MGIT™960 PZA aos tubos de Controlo PZA e Pirazinamida. A adição do inócuo é efetuada conforme descrito na Figura 49 para culturas nos dias 1 a 3, após positivar. No caso de executar este procedimento nos dias 4 e 5, após a cultura positivar, o inócuo deve ser diluído. Para isso, adicionam-se 4mL de solução salina a 1mL de cultura.

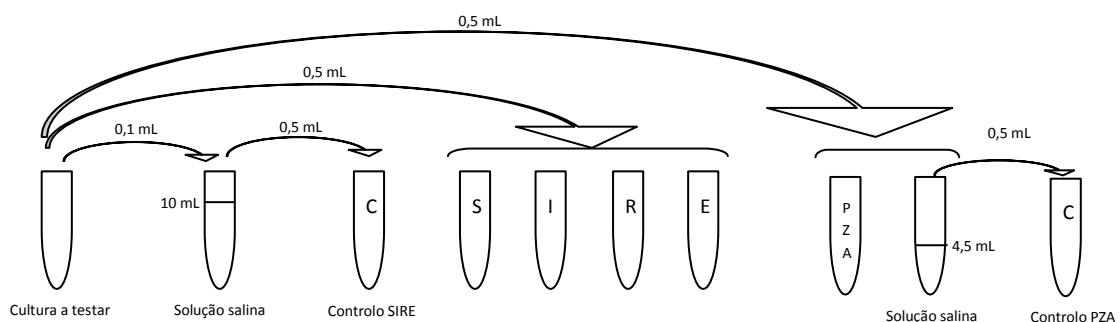


Figura 49 – Procedimento para a deteção da suscetibilidade a antibióticos de Micobactérias.

A obtenção de culturas positivas, nos dias 1 a 5, obriga a executar passagens da cultura inicial em novo meio MGIT™. Nesta fase é efetuada em paralelo a inoculação em gelose de sangue para verificar se há inquinação da cultura.

Os antibiogramas incubam a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ na estufa própria e as positivities são registadas. O crescimento do controlo antes do 4º dia invalida o teste e é por este motivo que o controlo é diluído, obtendo-se o crescimento gradual da micobactéria.

2.3. SEROLOGIA

No laboratório de Serologia são realizadas técnicas manuais e automáticas a partir de amostras de soro, plasma, fezes e LCR.

2.3.1. PESQUISA DE ANTIGÉNIOS DE *Aspergillus spp.* (GALACTOMANNAN)

As Aspergiloses são infeções que ocorrem por inalação de esporos de *Aspergillus spp.*, sendo frequentes em doentes neutropénicos ou imunocomprometidos.¹⁰ O diagnóstico clínico não é específico, pelo que a pesquisa do antígeno galactomannan, solúvel no soro, é um método serológico de grande importância no diagnóstico de Aspergilose invasiva. O antígeno galactomannan faz parte integrante da parede celular dos microorganismos *Aspergillus spp.* (Figura 50).

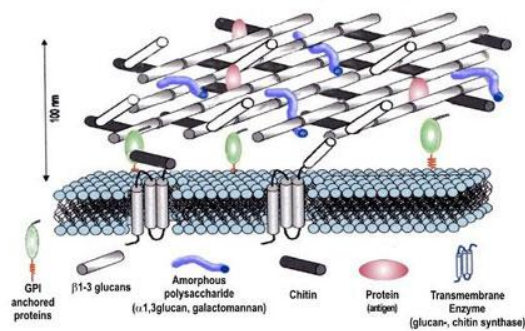


Figura 50 – Representação esquemática tridimensional da parede celular do *Aspergillus fumigatus*. Adaptado de www.pasteur.fr.

O teste utilizado, Platelia™ *Aspergillus* EIA (BioRad), consiste num ensaio imunoenzimático em microplaca que deteta o antígeno galactomannan, em amostras de soro humano. O ensaio usa anticorpos monoclonais de rato EBA-2, anticorpo monoclonal diretamente contra o *Aspergillus* galactomannan, revestindo os poços da microplaca que ligam o antígeno. A adição de um anticorpo monoclonal, ligado à peroxidase (conjugado), permite detetar o antígeno ligado (Figura 51).

As amostras de soro são inativadas pelo calor, na presença de EDTA, de forma a dissociar imuno-complexos e a precipitar proteínas do soro que poderiam interferir com o teste. Para isso, são adicionados 300µL de soro a 100µL da solução de EDTA (R7) em tubos *ependorf* que incubam durante 6 minutos em bloco térmico a 120°C. Após a incubação são centrifugados durante 10 minutos a 10000g.

Na microplaca são adicionados 50µL de conjugado (anticorpo monoclonal anti-galactomannan marcado com peroxidase, R6) a cada poço e 50µL das amostras e controlos: negativo (R3), *cut-off* (R4) e positivo (R5). A microplaca incuba durante 90 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ permitindo que os antígenos, se presentes no soro, se liguem aos anticorpos anti-galactomannan. Após a incubação são efetuadas cinco lavagens no lavador automático, utilizando a solução de lavagem (R2). De forma a revelar os complexos formados são adicionados 200µL da solução de Substrato (40µL de cromogénio, R9 e 2mL de tampão, R8), que incuba durante 30 ± 5 minutos à temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), protegido da luz. Finalmente são adicionados 100µL de ácido sulfúrico (R10) para parar a reação e é feita a leitura num leitor ELISA.

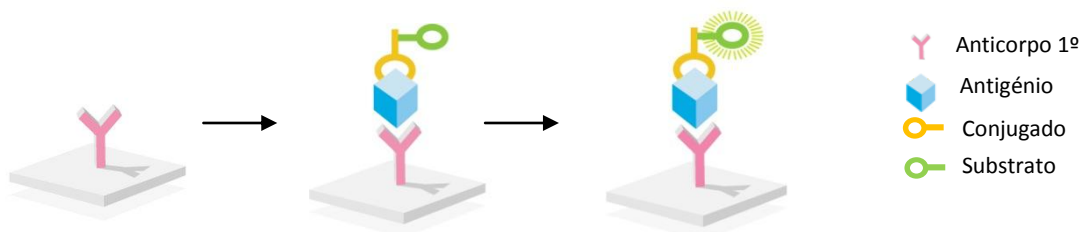


Figura 51 – Esquema do teste de pesquisa de antígenos galactomannan no soro (Platelia™) com a formação do complexo anticorpo monoclonal-antígeno galactomannan-anticorpo monoclonal/peroxidase.

A presença ou ausência do antígeno galactomannan na amostra é determinado pelo cálculo de um índice para cada amostra. O índice consiste no quociente do valor de densidade ótica (DO) obtido para a amostra, pela DO média dos soros que possuem o soro *cut-off*. Um resultado negativo para o antígeno galactomannan corresponde a um índice inferior a 0,5. Inversamente, se o índice for superior ou igual a 0,5 o resultado é positivo.

2.3.2. PESQUISA DE ANTIGÉNIOS DE *Cryptococcus neoformans*

O sistema de aglutinação em látex de antígenos de *Cryptococcus neoformans* (CALAS®, Meridian BioS) é um teste qualitativo e semi-quantitativo para a deteção de antígenos polissacarídios capsulares de *Cryptococcus neoformans*, em amostras de soro e LCR. As partículas de látex estão revestidas com globulina anti-cryptococcus que reagem com o antígeno polissacarídico, formando uma aglutinação visível.

A aglutinação inespecífica pode ocorrer devido à presença de certas macroglobulinas na amostra, como o fator reumatóide. Esta inespecificidade é eliminada com um tratamento inicial, variável consoante o tipo de amostra. O LCR, obtido após colheita asséptica, é centrifugado a 1000g durante 15 minutos de forma a remover todos os leucócitos presentes. O sobrenadante é aspirado para um novo tubo estéril, e é inativado por aquecimento no bloco térmico a 100°C durante 5 minutos. Após um arrefecimento da amostra de 3 a 4 minutos, a amostra está pronta para o teste. No caso de amostras de soro é efetuado um tratamento inicial adicional com pronase, adicionando 200µL de pronase a 200µL de soro, que incubam a 56°C durante 15 minutos. Após este tratamento, a preparação da amostra prossegue de forma idêntica às amostras de LCR.

Para o procedimento do teste devemos marcar os círculos para o controlo positivo, controlo do anticorpo, controlo negativo e controlo do látex, assim como para as amostras a testar. Colocar uma gota de controlo positivo e 25 µL dos reagentes controlo de anticorpo e negativo nos círculos correspondentes. Pipetar 25 µL de cada amostra a testar no círculo designado e colocar uma gota de controlo de látex e deteção látex, conforme indicado na Figura 52. A mistura é efetuada com o aplicador e é efetuada a incubação no agitador orbital, a 125±25 rpm durante 5 minutos. Após a incubação os resultados são lidos de imediato. Para o teste ser considerado válido, devemos obter as reações em todos os controlos.

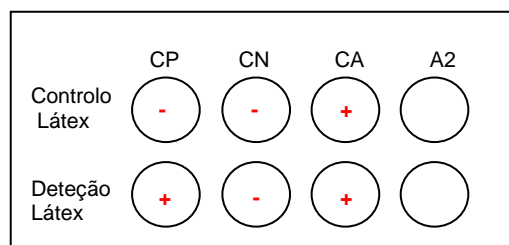


Figura 52 – Esquema ilustrativo do cartão de reação para o teste de pesquisa de *Cryptococcus neoformans*, sendo CP – Controlo Positivo, CN – Controlo Negativo, CA – Controlo Anticorpo, A – Amostra.

Um resultado negativo corresponde a uma suspensão homogénea sem qualquer agregação visível. Os resultados positivos devem ser registados com gradação da reacção. Assim, um positivo (1+) significa que é visível uma agregação fina numa suspensão homogénea, no positivo (2+) já são visíveis agregados bem definidos, apesar de pequenos. Os positivos de (3+) e (4+) são já agregados grandes, com a suspensão clara e muito clara, respetivamente. No caso de obtenção de resultados com positividade superior a (2+) é efetuada a titulação da amostra.

2.3.3. PESQUISA DE ANTICORPOS *anti-Salmonella* – REAÇÃO DE WIDAL

A reacção de Widal é um teste presuntivo de aglutinação em tubo que permite detetar a infeção por bactérias do género *Salmonella*, sendo solicitado ao laboratório em casos de diarreia. O teste consiste em verificar a aglutinação de antígenos somáticos(O), antígenos flagelares (H) e antígenos de superfície Vi, numa amostra de sangue, após a adição dos soros anti-O para a determinação do grupo serológico e anti-H para a determinação do serótipo.

O procedimento do teste inicia-se pela diluição do soro a testar (1/20), adicionando 1900µL de soro fisiológico a 100µL de soro. De seguida executa-se uma segunda diluição (1/5), adicionando 200µL da mistura a 800µL de soro fisiológico. É adicionada uma gota de cada antígeno (TO, BO, TH, BH) e incuba-se no bloco térmico a 50°C, durante 4 horas os antígenos somáticos e 2 horas os antígenos flagelares.

A aglutinação somática caracteriza-se por ser fina e granular, de formação lenta e dificilmente desagregável. Por contrário, a aglutinação flagelar é flocular, de rápida formação e de fácil desintegração. Se não se verificar qualquer aglutinação o resultado é negativo. Os resultados positivos são titulados procedendo-se às diluições 1/100, 1/200 e 1/400. O título corresponde à última diluição que apresenta aglutinação.

No caso de infeção por *Salmonella*, como é o caso da febre tifóide, a aglutinação ocorre na presença dos antígenos somáticos e flagelares. Por outro lado, no caso de infeção por *Brucella* a aglutinação ocorre apenas nos antígenos somáticos.

2.3.4. PESQUISA DE ANTICORPOS *anti-brucella*

As bactérias do género *Brucella*, coco-bacilos gram-negativos, são o agente causal da Brucelose e consideram-se reservatórios mais frequentes os ovinos e caprinos (*B. melitensis*), bovinos (*B. abortus*), suínos (*B. suis*), caninos (*B. canis*) e roedores (*B. neotomae*) causando aborto, morte fetal e infeções genitais.^{11,12} A infeção é transmitida indiretamente ao Homem através da ingestão de alimentos infetados, por contacto direto de animais infetados ou inalação de aerossóis causando febre, indisposição e dores musculares.

A maior incidência de casos humanos está relacionada com a *Brucella melitensis* e ocorre em zonas onde predomina a exploração de ovinos e caprinos. Contudo, o Homem é igualmente suscetível à *B. abortus*, *B. suis* e de forma esporádica à *B. canis*.

O teste utilizado permite a determinação qualitativa de anticorpos anti-brucella no soro humano, por aglutinação em lâmina, usando antigénio da bactéria *Brucella abortus* inativada e corada com Rosa de Bengala.

A amostra de soro é obtida por colheita de sangue venoso, em tubo sem anticoagulante, e posterior centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. As amostras de soro podem ser conservadas de 2-8°C até 48 horas ou a -20°C até seis semanas.

Para a realização do teste deve-se permitir que o reagente e soros a testar estabilizem à temperatura ambiente (20-25°C). O procedimento do teste consiste na adição de 50µL de soro a uma gota do reagente, misturando com a ponta da pipeta. Paralelamente devem ser testados o controlo negativo e controlo positivo. Após uma incubação de 4 minutos, com agitação manual ou agitador orbital a 80-100 rpm, é efetuada a leitura dos resultados.

O resultado é negativo quando não se verificam alterações na suspensão de látex (Figura 53a), e positivo quando se verifica uma aglutinação óbvia visível macroscopicamente (Figura 53b). Um resultado positivo indica que existem anticorpos presentes no soro, com capacidade de aglutinar com o antigénio da bactéria com uma concentração igual ou superior a 25 IU/mL.

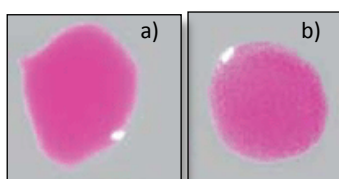


Figura 53 – Teste de aglutinação Rosa Bengala: a) resultado negativo, b) resultado positivo.

Em doentes com infeção crónica o nível de anticorpos pode ser reduzido levando a resultados falsamente negativos. Por outro lado, a prevalência de anticorpos anti-brucella na população saudável em zonas endémicas é elevada pelo que a especificidade deste teste é reduzida.¹³ Desta forma, os resultados positivos nesta prova de Rosa Bengala são confirmados pelo teste Brucellacapt[®].

2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS *anti-brucella*

O teste Brucellacapt[®] é um teste quantitativo de imunocaptura e aglutinação para a deteção de anticorpos totais anti-brucella. É realizado em microplacas com poços em forma de U, revestidos com imunoglobulina anti-humana (Figura 54).

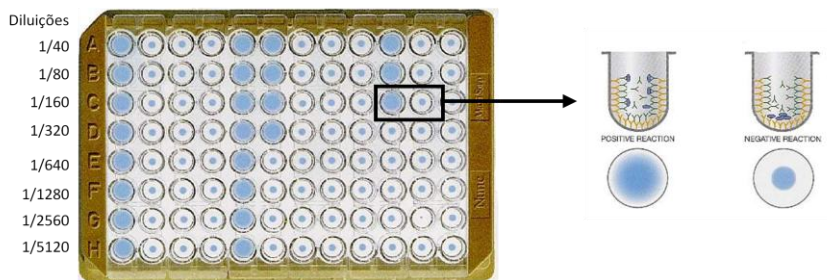


Figura 54 – Microplaca do teste Brucellacapt[®] visualizando-se reações positivas e negativas.

Depois da adição dos soros, e respetivas diluições, adiciona-se o antígeno que incuba durante 24 horas, para que se produza aglutinação. Este teste permite detetar anticorpos aglutinantes e também anticorpos incompletos ou não-aglutinantes das classes IgA e IgG, que apenas poderiam ser detetados pelo teste de *Coombs*. Foi demonstrada uma correlação elevada entre o teste Brucellacapt e a prova de *Coombs*, com elevada sensibilidade e especificidade.¹⁴

O teste é positivo quando se verifica aglutinação, distribuída pelas paredes e fundo do poço, e é considerado negativo quando se observa um botão de bactérias no centro do poço.

Um título superior a 1/320 sugere a existência de Brucelose o que deve ser sempre avaliado em conjunto com os restantes testes, epidemiologia do doente e seroprevalência na zona em causa, antes de emitir um diagnóstico. Em zonas endémicas é frequente a visualização de resultados positivos com títulos inferiores a 1/320. Nos casos em que se observa um resultado positivo até à diluição de 1/5120 é conveniente testar diluições mais elevadas, especialmente nos casos de monitorização de doentes.

2.3.6. PESQUISA DE ANTICORPOS HETERÓFILOS

A pesquisa de anticorpos heterófilos IgM no soro, plasma ou sangue total é efetuada por um teste qualitativo de imunocromatografia (MNITOP[®]) em situações de suspeita de Mononucleose Infeciosa.

Para a realização do teste permite-se que o reagente e as amostras a testar estabilizem à temperatura ambiente (20-25°C). O procedimento executa-se num tubo de vidro onde se colocam 9 gotas do reagente e adicionam 90µL do soro. Mistura-se gentilmente e coloca-se a tira-teste na solução com cuidado para não submergir acima do nível máximo indicado pelas setas. A leitura é efetuada após 5 minutos.

Com a combinação de antígenios isolados de membranas de eritrócitos bovinos e um anticorpo de rato anti-humano IgM é possível detetar anticorpos na amostra (Figura 55).



Figura 55 – Pesquisa de anticorpos heterófilos IgM por imunocromatografia - MNITOP[®]. a) resultado negativo e b) resultado positivo.

2.3.7. PESQUISA DE ANTICORPOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA (CMIA)

A pesquisa de anticorpos é efetuada por imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência (CMIA) no equipamento Architect® (Abbott). O CMIA é uma tecnologia utilizada para a determinação de antigénios, anticorpos e analitos em amostras. Para isso, utilizam-se micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura específica (antigénio, anticorpo ou partícula viral), conjugado marcado com acridínio, uma solução pré-ativadora e uma solução ativadora. A reação inicia-se com a adição das micropartículas à amostra, na cuvete de reação. A mistura é homogeneizada e incubada, ocorrendo ligação entre o analito presente na amostra e as moléculas de captura existentes nas micropartículas, formando o complexo imunitário. Posteriormente, um ímã atrai as micropartículas para uma parede da cuvete de reação e é efetuada uma lavagem de forma a remover todas as partículas não ligadas. Seguidamente, é adicionado o conjugado marcado com acridínio quimioluminescente, que se liga ao complexo imunitário formado após incubação. Uma nova lavagem remove todas as partículas não ligadas (Figura 56).

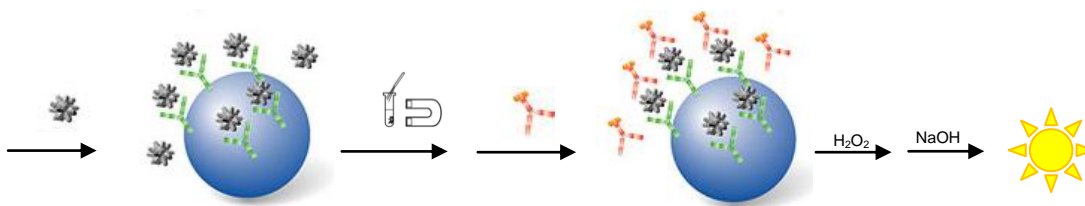


Figura 56 – Esquema do imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA).

Após adição da solução pré-ativadora (peróxido de hidrogénio 1,32%), o sistema ótico efetua uma leitura de *background*. Esta solução cria um ambiente ácido, prevenindo a libertação prematura de energia e emissão de luz, evita que as micropartículas se aglomerem e elimina a matéria corante do acridínio do conjugado ligado ao complexo. A solução ativadora é dispensada (hidróxido de sódio 0,35N), ocorrendo oxidação do acridínio e a reação de quimioluminescência. Forma-se N-metilacridona à medida que o acridínio volta ao seu estado primário, com libertação de energia e emissão de luz.

A reação de quimioluminescência é medida pelo sistema ótico, durante um período de tempo pré-definido, em unidades de luz relativa (RLUs), determinando a concentração do analito ou para determinar interpretações qualitativas nos ensaios de índice (*cutoff*).

Esta metodologia é utilizada para as pesquisas de anticorpos anti-*treponema pallidum*, anti-rubéola IgG, anti-citomegalovírus (CMV) IgG e IgM, e anti-toxoplasma IgG e IgM, em amostras de soro ou plasma (Tabela 4). No caso de resultados acima do limite de linearidade do equipamento, ou no limite do intervalo da calibração, é efetuada uma diluição da amostra de acordo com o indicado pelo fabricante. Resultados entre os valores indicados como negativos ou positivos são considerados na zona cinzenta, sendo duvidosos pelo que é recomendada a colheita de uma segunda amostra para confirmação.

Tabela 4 – Pesquisa de Anticorpos efetuadas com o teste CMIa com o equipamento Architect®, sendo S o RLU da amostra e CO o RLU do *cutoff*.

Anticorpos	Micropartículas revestidas	Resultados	Diluição
anti- <i>treponema pallidum</i>	Antigénios <i>Treponema pallidum</i> (TpN15, TpN17, TpN47)	Negativo S/CO < 1,0 Positivo S/CO ≥ 1,0	não efetuada
anti-rubéola, IgG	Vírus rubéola	Negativo < 5,0 UI/mL Positivo ≥ 10,0 UI/mL	> 500,0 UI/mL
anti-rubéola, IgM	Vírus rubéola (estirpe HPV77)	Negativo S/CO < 0,75 Positivo S/CO ≥ 1,0	não efetuada
anti-citomegalovírus, IgG	Lisado viral CMV (estirpe AD169)	Negativo < 6,0 AU/mL Positivo > 6,0 AU/mL	> 250,0 AU/mL
anti-citomegalovírus, IgM	Antigénios CMV	Negativo S/CO < 0,85 Positivo S/CO ≥ 1,0	não efetuada
anti-toxoplasmose, IgG	Antigénios <i>Toxoplasma gondii</i> (P30 e P35)	Negativo < 1,6 UI/mL Positivo ≥ 3,0 UI/mL	> 200,0 UI/mL
anti-toxoplasmose, IgM	Anticorpos anti-IgG humano	Negativo S/CO < 0,83 Positivo S/CO ≥ 1,0	não efetuada

A deteção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, teste treponémico é confirmada por um teste não treponémico, como o *Venereal Disease Research Laboratory test* (VDRL) ou *Rapid Plasma Reagin* (RPR).

A pesquisa de anticorpos anti-rubéola é solicitada maioritariamente no contexto da gravidez, com o objetivo de distinguir uma primoinfeção de uma reinfeção. Títulos de anticorpos IgG anti-rubéola superiores a 15 UI/mL indicam imunidade adquirida. No caso da presença de anticorpos IgM anti-rubéola deve ser avaliado o índice de avididade dos anticorpos.

A deteção de anticorpos IgM anti-CMV é confirmada pela determinação da avididade dos anticorpos no sistema Vidas®. Este sistema é também utilizado na confirmação de resultados de anticorpos IgM anti-toxoplasma positivos.

2.3.8. PESQUISA DE ANTICORPOS POR FLUORIMETRIA

O sistema Vidas® é um equipamento cujo funcionamento se baseia em fluorimetria. Para isso, utiliza barretes (STR®) e cones (SPR®) específicos para cada teste. As barretes possuem um local próprio para pipetar a amostra e incluem todos os reagentes necessários à reação imunológica. Os cones servem de fase sólida, com proteínas recombinantes específicas fixas à superfície, e de suporte de pipetagem.

Todas as etapas do teste são efetuadas de forma automática pelo equipamento, sendo constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação do meio reacional (Figura 57). Assim, à medida que os cones aspiram a amostra há ligação dos anticorpos presentes na amostra. Segue-se um passo de lavagem, de forma a eliminar os componentes não ligados, e a adição do conjugado anti-IgG ou anti-IgM humano, marcado com fosfatase alcalina, que se liga aos complexos antigénio-anticorpo previamente formados. Finalmente há uma nova lavagem, de forma a eliminar o excesso de conjugado, e adição do substrato (4-metil-umbeliferil fosfato), com emissão de fluorescência a 450 nm. O valor de sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de anticorpos da classe IgG ou IgM presentes na amostra.

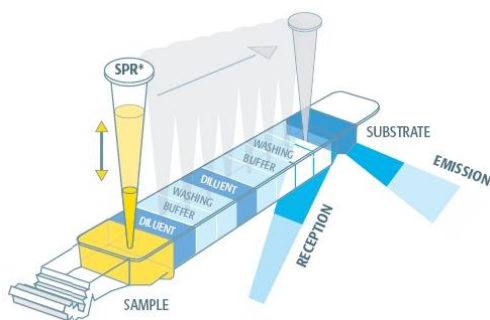


Figura 57 – Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema Vidas®. Adaptado de <http://www.biomeriex.com>.

2.3.8.1. Anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*, IgG e IgM

A borreliose de Lyme é uma doença infecciosa provocada por diferentes estirpes de *B. burgdorferi* transmitida ao homem através da picada de uma carraça infetada. O teste VIDAS®Lyme pode ser efetuado em soro, plasma ou LCR. Para isso, são colocados 100µL de amostra no local próprio da barrete, que reagem com os cones sensibilizados com proteínas recombinantes quiméricas de *B. burgdorferi sensu lato*. O teste demora cerca de 27 minutos e a interpretação dos resultados é efetuada de acordo com a Tabela 5. O equipamento fornece um valor de teste em índice (RFV da amostra/RFV do calibrador, sendo RFV o valor de fluorescência relativo). Os resultados equívocos e positivos devem ser confirmados por *Western-blot*.

Tabela 5 – Resultados VIDAS Lyme

Teste VIDAS®	Índice (i)	Interpretação
VIDAS®Lyme IgM, no soro ou plasma	$i < 0,20$	NEGATIVO
	$0,20 \leq i < 0,32$	EQUIVOCO
	$i \geq 0,32$	POSITIVO
VIDAS®Lyme IgG, no soro ou plasma	$i < 0,20$	NEGATIVO
	$i \geq 0,20$	POSITIVO
VIDAS®Lyme IgG, em LCR	$i < 0,20$	EQUIVOCO
	$i \geq 0,20$	POSITIVO

2.3.8.2. Anticorpos anti-toxoplasma IgM

A infeção com o parasita *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose, pode ser grave em imunodeprimidos e grávidas devido à potencial infeção fetal. O teste VIDAS®TOXO IgM é efetuado como teste confirmatório dos resultados positivos obtidos no imunoensaio por Quimioluminescência no equipamento Architect®.

A deteção é conseguida pela sensibilização dos cones com anticorpo anti-cadeia μ humana (cabra). Para isso, são colocados 100 μ L de soro no local próprio da barrete e é iniciado o teste que demora cerca de 40 minutos. A interpretação dos resultados é efetuada de acordo com a Tabela 6. O equipamento fornece um valor de teste em índice (RFV da amostra/RFV do calibrador, sendo RFV o valor de fluorescência relativo). Os resultados equívocos e positivos devem ser confirmados por *Western-blot*.

Tabela 6 – Resultados VIDAS®TOXO IgM

Teste VIDAS®	Índice (i)	Interpretação
VIDAS®TOXO IgM, no soro	$i < 0,55$	NEGATIVO
	$0,55 \leq i < 0,65$	EQUIVOCO
	$i \geq 0,65$	POSITIVO

2.3.8.3. Anticorpos anti-varicela zóster, IgG

A varicela e a zona são duas manifestações clínicas da infeção pelo vírus de varicela-zoster (VZV). O teste VIDAS®Varicella-Zoster IgG (VZV) é efetuado no soro. A deteção da infeção é possível através dos cones sensibilizados por antígenos inativados do vírus da varicela. Para isso, são colocados 100 μ L de amostra no local próprio da barrete e é iniciado o teste que demora cerca de 35 a 40 minutos.

A interpretação dos resultados é efetuada de acordo com a Tabela 7. O equipamento efetua duas leituras de fluorescência para cada teste. A primeira leitura é efetuada antes da adição do substrato, correspondendo ao branco, e a segunda leitura é efetuada após a incubação com o substrato. O cálculo de RFV corresponde à diferença entre as duas medidas e o valor de teste tem em consideração o valor de fluorescência do calibrador. Os resultados equívocos e positivos devem ser confirmados por *Western-blot*.

Tabela 7 – Resultados VIDAS®Varicella-Zoster IgG

Teste VIDAS®	Valor do teste (VT)	Interpretação
VIDAS®Varicella-Zoster IgG, no soro	< 0,60	NEGATIVO
	$0,60 \leq VT < 0,90$	EQUÍVOCO
	$\geq 0,90$	POSITIVO

2.3.9. DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS anti-CMV IgG

O diagnóstico da infeção por Citomegalovírus é serológico e tem enorme relevância na mulher grávida. A determinação da avidéz dos anticorpos anti-CMV IgG assume particular relevância nos casos em que apenas se possui uma amostra e se pretende excluir uma primo-infeção por CMV.

O teste VIDAS® CMV IgG *avidity* permite distinguir anticorpos com fraca avidéz, produzidos durante uma primoinfeção, dos anticorpos com forte avidéz, indicativos de infeção antiga. Para a execução do teste são necessárias duas barretes e dois cones, em que o primeiro teste serve de referência. No segundo teste, o tampão de lavagem contido no poço 4 deve ser substituído por 600µL de tampão ureia.

O índice de avidéz (IA) é determinado pelo quociente entre o valor de RFV obtido para a amostra com a barrete que contém ureia, pelo valor de RFV obtido para a amostra com barrete que não contém o tampão ureia. A interpretação dos resultados deve ser efetuada de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados VIDAS®CMV IgG avidity.

Teste VIDAS®	Valor do teste (IA)	Interpretação
VIDAS®CMV IgG avidity, no soro	< 0,20	Primo-infeção com menos de 3 meses
	$0,20 \leq IA < 0,80$	EQUÍVOCO
	$\geq 0,80$	Primo-infeção com mais de 3 meses

2.3.10. PESQUISA DE TOXINAS DE *Clostridium difficile*

O teste VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B é útil no diagnóstico das doenças associadas a *Clostridium difficile* pois permite a deteção das toxinas A e B, em amostras de fezes. As fezes devem ser diluídas no diluente da amostra (R1) com uma pipeta descartável, num tubo de 1,5mL. No caso de fezes líquidas adicionar 500µL e no caso de fezes sólidas cerca de 200 mg a 1000µL de diluente. Agitar muito bem em vórtex e centrifugar durante 5 minutos a 12000g, de forma a sedimentar as fezes. É do sobrenadante que são retirados 300µL para o poço de amostra da barrete.

Para cada amostra, o aparelho efetua duas leituras da fluorescência, antes da adição do substrato e após a incubação. O cálculo de RFV é o resultado da diferença das duas medidas, e o valor do teste é o quociente entre o valor RFV da amostra pelo valor RFV do calibrador. Os resultados são interpretados de acordo com a Tabela 9, tendo em conta o contexto clínico do doente.

Tabela 9 – Resultados VIDAS® *C. difficile* toxin A&B, nas fezes.

Teste VIDAS®	Valor do teste (VT)	Interpretação
VIDAS® <i>C. difficile</i> toxin A&B, nas fezes	< 0,13	NEGATIVO
	$0,13 \leq VT < 0,37$	EQUÍVOCO
	$\geq 0,37$	POSITIVO

2.3.11. PESQUISA DE ANTICORPOS *anti-toxoplasma* IgA, TOXO-ISAGA IgA

A pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma IgA é efetuada no soro de recém-nascidos com suspeita de Toxoplasmose Congénita e com anticorpos anti-toxoplasma IgG positivos.

O teste utilizado baseia-se na aglutinação em placa, cujos poços estão revestidos por anti-IgA e anti-IgM, efetuando a deteção simultânea de anticorpos anti-toxoplasma IgA e IgM por um imunoensaio de aglutinação (ISAGA).

Para o procedimento o soro a testar é diluído 1/100 em PBS (R5) e o controlo positivo é diluído 1/10 em R4. São dispensados 100µL de PBS nos dois poços de controlo negativo, dispensar 100µL de controlo positivo diluído nos dois poços adjacentes e pipetar 100µL de amostra igualmente em duplicado. A placa, devidamente tapada, incuba durante 2 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, em câmara húmida. Seguidamente são efetuadas três lavagens, uma primeira lavagem com cerca de 200µL de PBS-*tween* durante 5 minutos e duas lavagens seguintes apenas com 200µL de PBS. A revelação é conseguida com o uso do antigénio R2 diluído 1/10 no tampão R3. Para isso, são dispensados 100µL da solução no primeiro poço e 150µL nos restantes poços, que incubam *overnight* a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, em câmara húmida.

A leitura é manual e um resultado negativo é visualizado pela sedimentação total dos toxoplasmas em botão. A positividade é determinada pela adesão dos toxoplasmas em camada uniforme que tapa o fundo do poço. O resultado deve ser avaliado em graus, entre (0) e (4+), através da comparação com os resultados obtidos nos poços de controlo positivo (4+) e negativo (0).

2.3.12. PESQUISA DE ANTICORPOS POR ELISA

A deteção de anticorpos por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) é efetuada de forma automática com o equipamento *MAGOPlus*. O teste baseia-se numa microplaca de poliestireno revestida por antigénios purificados, que serve de fase sólida para a ligação de anticorpos (Figura 58). No caso da presença de anticorpos na amostra, ocorre a formação de complexos antigénio-anticorpo. Estes complexos são detetados após a adição de um anticorpo anti-humano marcado com peroxidase. A revelação da reação é conseguida pela adição de uma solução de substrato (cromogénio), com produção de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra. Os kits IgM incluem um tampão com a capacidade de absorção de IgG, aumentando a especificidade da deteção de IgM.

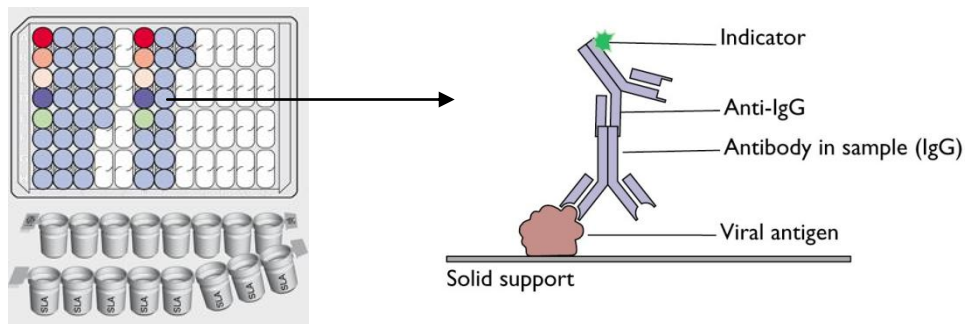


Figura 58 – Esquema ilustrativo da reação de ELISA em microplaca. Estão representados os calibradores, controlos e amostras: calibrador 1 (vermelho), calibrador 2 (rosa), calibrador 3 (beje), controlo positivo (azul), controlo negativo (verde).

A análise pode ser semi-qualitativa, usando apenas um calibrador, ou quantitativa pelo uso de três calibradores com concentrações conhecidas. A calibração é efetuada em unidades relativas (RU/mL) ou em unidades internacionais (IU/mL), caso estejam definidas. Podem ser testados em paralelo um controlo positivo e um controlo negativo. No laboratório de serologia a pesquisa de anticorpos por ELISA em microplaca é efetuada para os microorganismos descritos na tabela 10.

Tabela 10 – Pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG por ELISA.

Anticorpos	Classe	Antígenos
anti- <i>Herpes simplex</i> 1/2	IgM e IgG	Antígenos <i>Herpes simplex</i> , Glicoproteínas C1 e G2
anti- <i>Chlamydia pneumoniae</i>	IgA, IgG e IgM	Antígenos <i>C. pneumoniae</i> , estirpe CDC/CWL-029
anti- <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	IgM e IgG	Antígenos <i>M. pneumoniae</i> , estirpe MAC ATCC 15531
anti-Parvovírus B19	IgM e IgG	Antígenos Parvovírus B19, proteína viral recombinante expressa em células eucarióticas
anti- <i>Epstein-barr</i> (anti-EBV-CA, anti-EBNA-1 e anti-EBV-EA)	IgA, IgM e IgG	Antígenos <i>E. barr</i> , EBNA-1 e EBV-EA
anti- <i>Rickettsia conori</i>	IgM e IgG	Antígenos <i>R. conori</i> , estirpe Morocann ATCC VR-141
anti- <i>Coxiella burnetti</i>	IgM e IgG	Antígenos <i>C. burnetti</i> fase II, estirpe Nine Mile Q ATCC VR-616

2.3.13. PESQUISA DE ANTICORPOS POR *Western-blot*

O *Western-blot* é um método qualitativo, utilizado como teste confirmatório de resultados positivos em testes de *screening*, tais como ELISA. O teste baseia-se na separação eletroforética de antígenos, posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose, fase sólida da reação. A posição de cada uma das proteínas depende da sua massa molecular.

No caso de uma amostra positiva, com anticorpos presentes, estes ligam-se aos antígenos da membrana. Esta ligação é visualizada após a incubação com anticorpos anti-humanos marcados, seguida de uma nova incubação com um substrato cromogénico, com a formação de cor na linha correspondente ao antígeno específico (Figura 59). As bandas com positividade devem ser registadas para a interpretação do resultado final como positivo ou negativo.

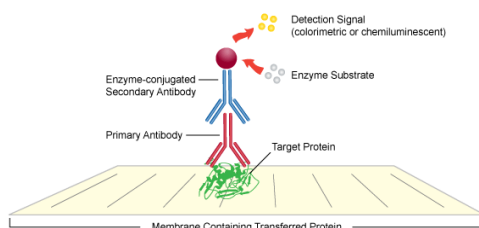


Figura 59 – Esquema ilustrativo da reação de *Western-blot*. Adaptado de <http://www.leinco.com>.

O teste é efetuado à temperatura ambiente e em agitação, com o auxílio de um agitador orbital. O procedimento inicia-se com um pré-tratamento de 15 minutos, em que se coloca cada tira marcada mergulhada em 1,5mL de tampão. Após esta incubação, é adicionado 1,5mL de soro que incuba 30 minutos com a tira. São efetuadas 3 lavagens com o tampão e é adicionado 1,5mL de conjugado que incuba novamente 30 minutos. Após novas 3 lavagens com o tampão é adicionado 1,5mL de substrato que incuba 15 minutos. A reação é parada com água destilada e é efetuada a leitura manual da positividade, que é lote específica. De forma a validar o teste deve haver positividade na banda controlo. A intensidade das bandas positivas está relacionada com a quantidade de anticorpos. Os resultados obtidos podem ser negativos, *borderline* ou positivos, dependendo dos padrões de positividade e intensidade das bandas positivas (Tabela 11). Na Figura 60 encontra-se exemplificado um controlo positivo para o teste de pesquisa de anticorpos anti-*Helicobacter pylori*.

Tabela 11 – Pesquisa de anticorpos por Western-blot.

Anticorpos	Antígenos	Resultados	
		Positivo	Borderline
anti- <i>Helicobacter pylori</i> , IgA e IgM	C1: 41KDa, 50KDa, 54KDa, 57KDa, 67KDa e 75 KDa C2: 66KDa (urease B) C3: 17KDa, 19KDa, 26KDa, 29KDa, 30KDa, 33KDa, VacA e CagA	IgA: 2 bandas distintas C2 ou C3 IgG: ≥ 2 bandas distintas C3	IgA: 1 banda distinta C3 e ≥ 2 bandas fracas C2 ou C3 IgG: 1 banda distinta C3 e ≥ 2 bandas fracas C3
anti- <i>Treponema pallidum</i> , IgG e IgM	Antígenos específicos: 47KDa (TpN47), 45KDa (tmpA), 17KDa (TpN17) e 15KDa (TpN15) Antígeno inespecífico: p22	IgG: > 1 bandas antígenos específicos IgM: 1 banda antígeno específico	IgG: 1 banda antígeno específico
anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> , IgG e IgM	Antígenos específicos: p18, p19, p20, p21, p58, Ospc (p25), p39, p83, Lipid Ba, VISE Bg, VisE Ba e VisEb	IgG: VISE Bb ou VISE Bb fraca e ≥1 banda antígeno específico ou ≥2 banda antígeno específico; IgM: Ospc Ba/ Ospc Bg ou Ospc Ba/Ospc Bg fraca e p39/VISE Bb e p39/VISE Bb	IgG: VISE Bb e ≥1 banda antígeno específico ou ≥1 banda antígeno específico; IgM: Ospc Ba/Ospc Bg ou Ospc Ba/Ospc Bg fraca;
anti-Citomegalovírus, IgM	Antígenos específicos: 150KDa, 65KDa e 28KDa	≥1 das bandas antígeno específica positiva	

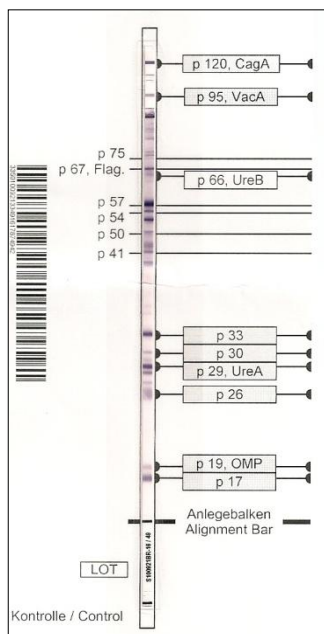


Figura 60 – Exemplo de um controlo positivo para o teste anti-*Helicobacter pylori*.

2.4. VIROLOGIA

No laboratório de Virologia são rececionados diferentes produtos biológicos: sangue periférico (colhido em anticoagulante EDTA), urina, LCR, raspados e exsudados de lesões, e amostras do trato respiratório, tais como aspirados nasofaríngeos, secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares, e líquidos pleurais.

2.4.1. PESQUISA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS

A pesquisa de vírus respiratórios é efetuada a partir de amostras do trato respiratório, conservadas de 2-8°C se processadas até 3 dias ou congeladas a -70°C se processadas após esse tempo.

As amostras devem ser diluídas em PBS na razão 1/2 ou 1/3 consoante a consistência num tubo de 15mL. No caso de amostras muito espessas, com muito muco, deve ser adicionado 0,1g de N-acetil-cisteína que incuba durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este tratamento, as amostras diluídas são centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante é rejeitado obtendo-se cerca de 1mL de amostra.

A amostra tratada é distribuída em 8 poços de uma lâmina pipetando-se 20µL em cada poço (Figura 61). A lâmina é seca na estufa a 37°C e procede-se à fixação do esfregaço em acetona durante 10 minutos.

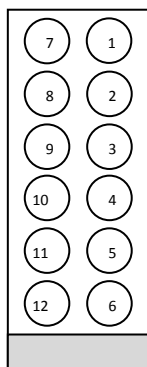


Figura 61 – Esquema exemplificativo da distribuição do painel de vírus respiratórios efetuado, sendo: 1 – Adenovírus, 2 – Influenza A, 3 – Influenza B, 4 – Parainfluenza 1, 7 – Parainfluenza 2, 8- Metapneumovírus e 11 – Vírus respiratório sincicial.

Após fixação é colocada uma gota de cada anticorpo monoclonal, marcado com FITC, conforme o esquema da Figura 61. A amostra incuba com os anticorpos durante 15 minutos, a 37°C em câmara húmida. É feita uma lavagem com PBS, eliminando todos os anticorpos não marcados, as lâminas secam ao ar e aplica-se a lamela, com meio de montagem.

A análise é efetuada em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x. Um resultado é considerado positivo pela presença de fluorescência específica, verde-maçã, num determinado poço. Um resultado negativo apresenta células com marcação vermelha devido à coloração de contraste azul de evans.

A fluorescência tem características específicas para cada tipo de vírus, sendo citoplasmática para o Adenovírus. A marcação específica dos vírus Influenza A e B é citoplasmática e/ou nuclear. A marcação nuclear é uniforme e a marcação citoplasmática é um pontuado, com grandes inclusões. No caso dos vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, a fluorescência é citoplasmática em pontuado com inclusões irregulares. O vírus respiratório sincicial (RSV) apresenta marcação citoplasmática com pequenas inclusões, por vezes mais evidente na periferia das células. O metapneumovírus tem uma marcação muito característica com grandes inclusões citoplasmáticas (Figura 62).

A co-infecção é possível, especialmente em crianças hospitalizadas em que um dos agentes é o RSV. Contudo, no caso de mais de um resultado positivo, devemos excluir a possibilidade de contaminação entre poços adjacentes. Para isso, as marcações devem ser repetidas, em lâminas separadas, para cada um dos vírus positivos.

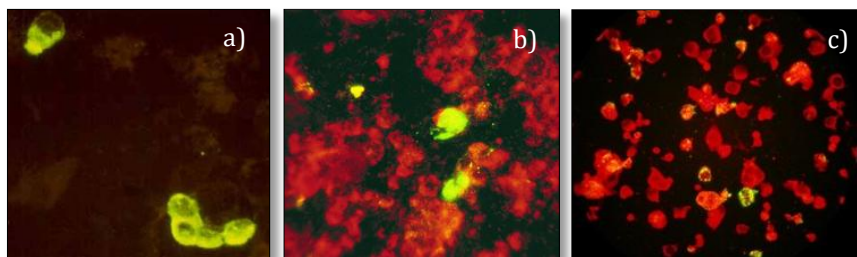


Figura 62 – Resultados positivos para os vírus: a) Vírus respiratório sincicial, b) Adenovírus, c) Metapneumovírus.

2.4.2. PESQUISA DE CITOMEGALOVÍRUS

A detecção de citomegalovírus é efetuada por imunofluorescência indireta (IFI) usando anticorpos monoclonais específicos, a partir de sangue total. Estes anticorpos ligam-se ao antigénio expresso no núcleo de células com infeção recente (6 a 24 horas) e no citoplasma das células infetadas numa fase mais avançada (após 48 horas). Estas inclusões estão presentes até 4 dias após infeção.

O procedimento inicia-se com o tratamento das amostras que consiste na separação dos leucócitos. Para isso, o tubo de sangue é agitado por inversão e transferido para um tubo de 15mL de fundo cónico, ao qual é adicionado 1mL de dextran a 70% homogeneizando suavemente. Segue-se uma incubação a 37°C durante 20 minutos permitindo que ocorra sedimentação e seja possível transferir o sobrenadante (2-3mL) para outro tubo, evitando a contaminação com eritrócitos. Adicionam-se cerca de 8mL de PBS à amostra que é centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação rejeita-se o sobrenadante e o sedimento é ressuspensionado em 2mL de solução lisante de eritrócitos (8,3g de NH₄Cl, 4g de KHCO₃ e 0,03g de EDTA em 1 litro de água destilada), que incuba 10 minutos a -20°C. A lavagem com PBS é repetida, o sobrenadante rejeitado e o sedimento ressuspensionado em 1mL de PBS que se transfere para o tubo *ependorf*. Finalmente é feita a contagem celular da suspensão que é ajustada a 2000 células.

Para a execução das lâminas colocam-se 20µL de amostra num poço da lâmina para cada doente. As lâminas são secas na estufa a 37°C, fixadas em acetona durante 10 minutos e permanecem sob luz UV até ao dia seguinte. O anticorpo monoclonal anti-CMV é colocado em cada poço e as lâminas são colocadas em câmara húmida na estufa a 37°C, durante 30 minutos. O excesso de anticorpo monoclonal é retirado com uma lavagem com PBS durante 5 minutos e é adicionado o conjugado nos respetivos poços que incuba por 30 minutos a 37°C, em câmara húmida. O excesso é novamente lavado com PBS durante 5 minutos, seguido de lavagens com água destilada. A lâmina é seca e adiciona-se o meio de montagem e é colocada a lamela.

A análise é efetuada em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x e no caso de se verificar fluorescência específica, considera-se a amostra positiva e efetua-se a contagem. O resultado é dado em nº células positivas/2000 células totais (Figura 63).

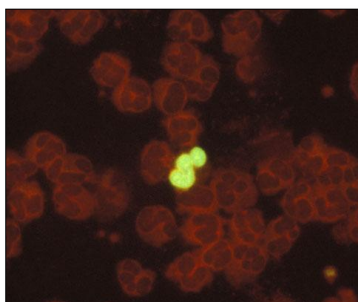


Figura 63 – Detecção de antigénio de citomegalovírus por imunofluorescência. Adaptado de www.virology.org.

2.4.3. PESQUISA ANTIGÉNICA DE VÍRUS *Herpes simplex* 1 e 2

A pesquisa de antígenos de vírus *Herpes simplex* (HSV) 1 e 2 é efetuada em amostras do trato respiratório, lavados brônquicos e bronco-alveolares, e amostras de lesões herpéticas, colhidas em zaragatoa. A deteção é efetuada com um reagente dirigido para os dois antígenos HSV tipo 1 e 2 e, no caso de positividade, procede-se à marcação com o reagente específico para o antígeno HSV tipo 1.

O procedimento inicial difere consoante o tipo de amostra. Assim, as amostras colhidas em zaragatoa são inoculadas diretamente na lâmina a marcar. No caso de lavados brônquicos e bronco-alveolares, é necessário efetuar um pré-tratamento da amostra. Para isso, as amostras são transferidas para um tubo de 15mL ao qual se adiciona o dobro ou triplo de volume de PBS, consoante a consistência da amostra. A mistura é agitada no vórtex, centrifugada a 3000 rpm, e o sobrenadante rejeitado. São colocados na lâmina 20µL da amostra concentrada, obtida após este procedimento.

Após secagem das lâminas, em estufa a 37°C, é efetuada a fixação em acetona durante 10 minutos. Às lâminas fixadas é adicionado o anticorpo monoclonal, marcado com FITC, que incuba em câmara húmida durante 30 minutos a 37°C. São efetuadas três lavagens, para eliminar todo o anticorpo não ligado, e é adicionado o contrastante azul de evans, diluído a 1/100, que incuba 5 minutos.

Finalmente, efetua-se a montagem das lâminas e observa-se em microscópio de fluorescência com a objetiva 40x. A visualização de fluorescência específica é indicativo de um resultado positivo (Figura 64).

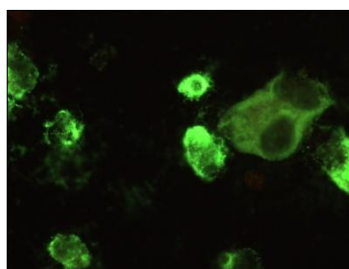


Figura 64 – Deteção antigénica de *Herpes simplex* 1 por imunofluorescência direta. Adaptado de aapublications.org.

2.4.4. PESQUISA ANTIGÉNICA DE *Legionella pneumophila*

A deteção e identificação de *Legionella pneumophila* é efetuada por imunofluorescência direta com o reagente MONOFLUO anti-*Legionella pneumophila* (BioRad), a partir de amostras diretas ou após cultura.

O procedimento laboratorial inicia-se com a preparação de dois esfregaços por cada amostra a testar, de forma a aumentar a sensibilidade do teste direto. Para amostras de exsudados pulmonares, secreções brônquicas, aspirados transtraqueais e lavagens brônquicas é selecionada uma porção viscosa da amostra de aparência leitosa ou com sangue. No caso de amostras de fluídos biológicos, tais como líquido pleural ou líquido cefalorraquidiano, é recomendado concentrar a amostra por centrifugação a 4000 g durante 30 minutos. O sobrenadante é rejeitado e ressuspendido em 0,5 mL. Paralelamente é efetuado um controlo positivo, aplicado numa lâmina independente e processada separadamente, de forma a evitar contaminações.

Os esfregaços secam ao ar e são fixados com calor, fazendo passar a lâmina na chama. Após fixação, os esfregaços incubam 10 minutos, à temperatura ambiente, em formalina a 10%. Seguidamente, efetua-se uma lavagem com água desionizada durante 2 minutos e seca-se ao ar antes de proceder à coloração dos esfregaço.

A coloração das amostras e controlo é efetuada cobrindo o esfregaço com 1 a 2 gotas de reagente de coloração MONOFLUO anti-*Legionella pneumophila*, marcado com FITC, que incuba em câmara húmida durante 30 minutos a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Este anticorpo reage com uma proteína presente na membrana exterior de todos os serogrupos conhecidos de *L. pneumophila*.

Após a incubação é retirado o excesso de reagente de coloração por aspiração e as lâminas são enxaguadas em água desionizada. Finalmente as lâminas secam ao ar e é aplicado o meio de montagem e lamela.

A *L. pneumophila* aparece sob a forma de bacilos ou coco-bacilos intensamente fluorescentes, verde maçã (Figura 65). O resultado deve ser indicado de forma quantitativa: 1 a 5 bacilos fluorescentes ou mais de 5 bacilos/lâmina. Nas amostras negativas apenas se visualizam organismos de cor vermelha.

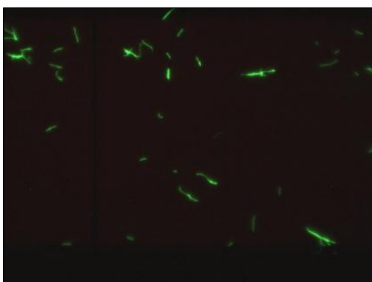


Figura 65 – Bacilos de *Legionella pneumophila* detetados por imunofluorescência direta. Adaptado de <http://www.innosieve.com>.

2.4.5. PESQUISA ANTIGÉNICA DE *Pneumocystis jiroveci*

A pesquisa antigénica de *Pneumocystis jiroveci* é efetuada por imunofluorescência indireta em amostras do trato respiratório, aspirados nasofaríngeos, secreções e expetorações induzidas, lavados brônquicos e bronco-alveolares, líquidos pleurais e aspirados pulmonares. As amostras devem ser previamente diluídas em água esterilizada ou, se muito espessas, em N-acetil-cisteína durante 30 minutos. É feita uma centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos e são colocados 20µL da amostra concentrada em dois poços numa lâmina.

As lâminas são secas na estufa a 37°C e é efetuada a fixação do esfregaço em acetona durante 10 minutos. Após a fixação adiciona-se 20µL de enzima, reconstituída em 200µL de ácido clorídrico 0,001M, a cada poço. Segue-se uma incubação de 30 minutos após a qual é efetuada uma lavagem com água destilada durante 5 minutos. Finalmente, adiciona-se 20µL de anticorpo monoclonal de ratinho anti-*pneumocystis jirovecii* sobre a amostra que re-incuba durante 15 minutos, em câmara húmida. Após nova lavagem é adicionado o conjugado anti-IgG de ratinho marcado com FITC, e azul de evans como corante de contraste, que incuba 15 minutos em câmara húmida a 37°C. É efetuada uma nova lavagem em água destilada durante 5 minutos e colocado meio de montagem e lamela.

As lâminas são observadas em microscópio de fluorescência, em objetiva de 40x. Um resultado é considerado positivo se visualizarmos pelo menos um oocisto com coloração fluorescente específica (Figura 66). Ausência de fluorescência, ou fluorescência inespecífica, é indicativo de um resultado negativo.

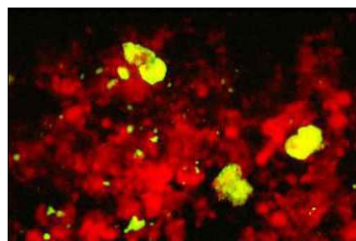


Figura 66 – *Pneumocystis jiroveci* detetados por imunofluorescência indireta. Adaptado de <http://www.microbelibrary.org>.

2.5. PARASITOLOGIA

Sempre que há suspeita de infecção sanguínea ou intestinal por parasitas é efetuado um exame parasitológico da amostra.

2.5.1. Exame parasitológico de sangue

Para a realização do exame parasitológico a amostras de sangue é efetuado um esfregaço sanguíneo, corado pelo método de Giemsa, e visualizado em microscópio ótico com a objetiva de 100x (Figura 67).

Em algumas amostras é muito importante quantificar e apresentar o resultado em percentagem de parasitêmia. É o caso da identificação de eritrócitos infetados por *Plasmodium spp.* Para isso, devemos contar o número de eritrócitos infetados em 10 campos com cerca de 100 eritrócitos totais. A média dos 10 campos visualizados é o resultado em percentagem.

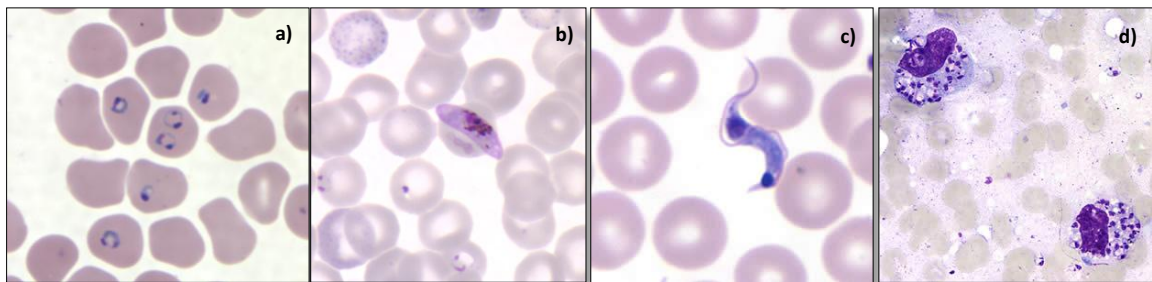


Figura 67 – Exame parasitológico de esfregaços sanguíneos. a) trofozoítos em anel de *Plasmodium falciparum*, b) gametócitos de *Plasmodium falciparum*, c) tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* e d) forma amastigota de *Leishmania spp.*, adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>.

2.5.2. Exame parasitológico de fezes

O exame parasitológico de fezes é efetuado pela visualização microscópica do sedimento de fezes, após execução do método de sedimentação-concentração Formol-Éter etílico.

O método de sedimentação-concentração de amostras de fezes tem como objetivo a pesquisa de cistos, ovos e larvas. O formol é usado como conservante e o éter como solubilizante de gorduras e fibras presentes nas fezes. A centrifugação permite a obtenção de camadas diferenciadas, com o objeto de estudo sedimentado num botão compactado no fundo do tubo.

O procedimento consiste em suspender uma porção de cerca de 4 gramas de fezes em 10mL de formol a 10%, que se deixam em contato durante 30 minutos. A mistura é então filtrada com um funil e gaze para um tubo cônico de 15mL e adiciona-se NaCl a 0,85% até perfazer 15mL. É efetuada uma centrifugação a 500g durante 10 minutos e o sobrenadante é decantado, sendo adicionado novamente NaCl até o sobrenadante se apresentar límpido.

O sedimento é ressuspendido na camada de formol, adiciona-se 4 a 5mL de éter etílico e agita-se em vórtex. A mistura é centrifugada durante 10 minutos a 500g, rejeita-se a camada de éter, tapa-se o tubo e visualiza-se ao microscópio ótico na objetiva de 10x, confirmando na objetiva de 40x.

No caso de fezes líquidas, ou fezes com muito muco, suspende-se em 10mL de formol a 10% que ficam em contato durante 30 minutos. A amostra é centrifugada a 500g durante 10 minutos e o sobrenadante é decantado. Adicionam-se uma a duas gotas de NaCl a 0,85% ao sedimento que está pronto a ser analisado.

Na figura 68 estão ilustradas alguns exemplos de sedimentos de fezes observados ao microscópio ótico.

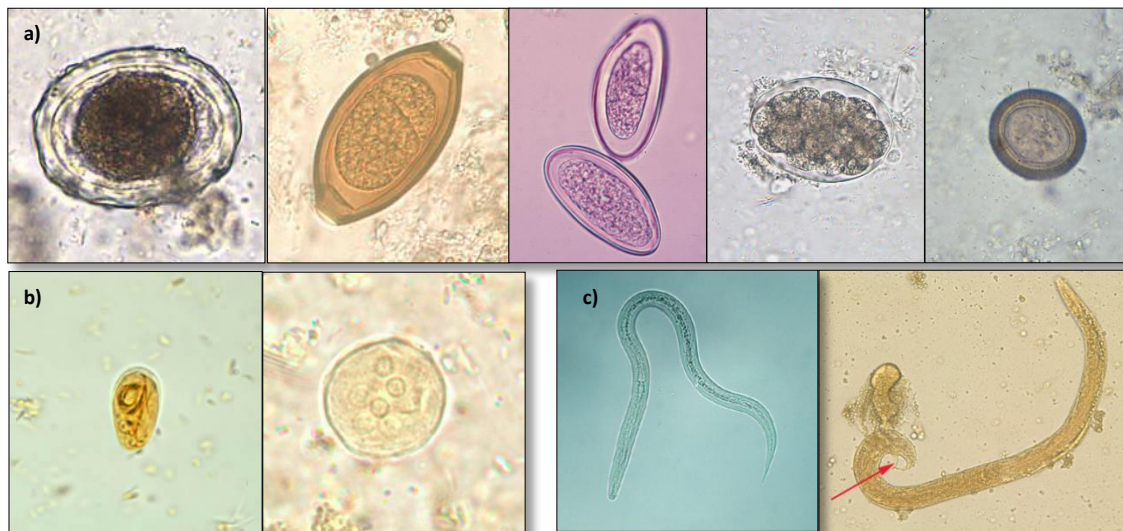


Figura 68 – Exame parasitológico de fezes. a) ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, ancilostomídeo e *Taenia spp.*, b) Cistos de *Giardia lamblia* e *Entamoeba coli* e c) Larvas de ancilostomídeo, *Strongyloides stercoralis*.

2.6. BIOLOGIA MOLECULAR

O laboratório de Biopatologia Molecular é um laboratório de apoio ao laboratório de Patologia Clínica sendo de extrema importância na deteção de microorganismos com crescimento lento, ou não-cultiváveis, com o uso de técnicas de biologia molecular. O laboratório é subdividido em diferentes áreas: a receção dos produtos, onde é efetuado o pré-tratamento e extração dos ácidos nucleicos, a área de pré-amplificação, onde se preparam as misturas para a amplificação dos ácidos nucleicos e a área pós-amplificação, onde estão localizados os termocicladores e é feita a análise.

2.6.1. Pré-tratamento das amostras

É imensa a variedade de produtos a partir dos quais é efetuada a extração de ácidos nucleicos. Alguns produtos, em virtude da sua natureza, necessitam de tratamentos prévios à extração para que esta seja eficaz. Por outro lado, existem produtos que são extraídos sem qualquer tratamento prévio. É o caso de amostras como líquido cefalorraquidiano, em que a extração é efetuada diretamente partindo do máximo de volume e eluindo no mínimo volume possível.

2.6.1.1. Amostras do trato respiratório

As amostras do trato respiratório tais como, secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares, carecem de ser fluidificadas e digeridas previamente à extração.

A fluidificação é efetuada com a adição de N-acetil-cisteína a 2% à amostra, num tubo de fundo cónico. Após a concentração, por centrifugação a altas rotações, é efetuada a digestão do sedimento com 10µL proteinase K (PK) e 190 µL de tampão de lise, a 56°C em bloco de aquecimento.

2.6.1.2. Urina

As amostras de urina necessitam de ser concentradas previamente ao tratamento de digestão com proteinase K (PK). Para isso, é efetuada uma centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos. No caso de pedido de pesquisa de *Leptospira*, o sedimento é rejeitado e o sobrenadante re-centrifugado a altas rotações.

Se o pedido incluir a quantificação, tal como quantificação dos vírus JC e BC em transplantados renais, a amostra não pode ser concentrada. Assim, é efetuada uma agitação da amostra de onde se retiram 400µL para executar a extração.

2.6.1.3. Biópsias

As biópsias, ou fragmentos de tecidos, são digeridos com 10 μ L PK e 190 μ L de tampão de lise, a 56°C, em bloco de aquecimento.

2.6.1.4. Zaragatoas

As amostras colhidas em zaragatoa são igualmente digeridas com 10 μ L de proteinase K e 290 μ L de tampão lise, durante 15 minutos a 56°C. A maior quantidade de tampão de lise deve-se ao facto da zaragatoa absorver algum líquido.

No caso de zaragatoa anal, com pedido de pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, é efetuado uma segunda incubação a 95°C durante 10 minutos.

2.6.1.5. Sangue

A partir da amostra de sangue a extração pode ser efetuada a partir de sangue total, como é o caso da pesquisa de vírus de *Epstein-barr* e Herpes vírus humano 8, a partir do *buffy-coat*, como é o caso da pesquisa de bactérias e adenovírus, e a partir do plasma, como é o caso de vírus e espiroquetas.

Se pretendermos a obtenção de *buffy-coat* ou plasma o sangue total é centrifugado durante 20 minutos a 2000 rpm, de forma a sedimentar os glóbulos vermelhos.

O *buffy-coat* é lavado com Tris-EDTA pH8, que lisa os glóbulos vermelhos sem lisar as bactérias. Após esta lavagem o *buffy-coat* é digerido com proteinase K. No caso de pesquisa de *Coxiella burnetii* e *Bartonella spp.* adicionalmente efetua-se uma incubação a 95°C durante 30 minutos, seguido de choque térmico em gelo.

O plasma é usado diretamente na maioria dos casos, mas há exceções tal como na pesquisa de espiroquetas em que o plasma é centrifugado a altas rotações, e o sedimento digerido com 10 μ L PK e 190 μ L de tampão de lise, a 56°C em bloco de aquecimento.

2.6.1.6. Líquido amniótico

As amostras de líquido amniótico são efetuadas a partir da amostra total e após concentração por centrifugação a altas rotações. O sedimento é digerido com 10 μ L PK e 190 μ L de tampão de lise, a 56°C em bloco de aquecimento.

2.6.1.7. Blocos de parafina

As amostras rececionadas em blocos de parafina são desparafinadas previamente à extração de ácidos nucleicos. Para isso, são removidas pequenas porções do tecido conservado em parafina, retirando o máximo de tecido com o mínimo de parafina possível, para um tubo de 1.5mL. O tubo é centrifugado brevemente, de forma a sedimentar os tecidos no tubo, e é adicionado 1,5mL de xilol. Agita-se no vórtex durante 5 minutos, centrifuga-se à velocidade máxima e retira-se o solvente. Este passo deve ser repetido o número de vezes necessário até eliminação de toda a parafina (quando os pedaços de tecidos deixam de possuir parafina, sedimentam mais rapidamente).

Quando o tecido estiver completamente limpo de parafina é adicionado álcool a 70% e a mistura é agitada no vórtex. Após uma centrifugação durante 5 minutos é retirado o etanol. De forma a garantirmos que todo o etanol foi eliminado, a amostra permanece no frigorífico com a tampa semi-aberta, *over-night*.

Após este protocolo de desparafinação, a amostra é digerida com 10µL de proteinase K em 190µL de tampão de lise, a 56°C durante 3 horas, agitando regularmente no vórtex.

2.6.1.8. Produtos com pedidos de pesquisa de Micobactérias

Os produtos com pedido de pesquisa de Micobactérias são descontaminados conforme descrito em 2.2.1. As amostras são então concentradas por centrifugação a alta rotação por 15 minutos. O sedimento obtido incuba a 95°C durante 30 minutos, de forma a inativar todas as micobactérias.

2.6.1.9. Produtos com pedidos de pesquisa de fungos

Todas as amostras com pedido de pesquisa de fungos necessitam de um tratamento adicional após a digestão com proteinase K, dada a natureza da parede destes microorganismos. Desta forma, o sedimento incuba com o dobro do volume de lyticase, durante 45 minutos a 37°C. Após esta incubação é efetuada uma centrifugação a 5200 rpm durante 10 minutos.

2.6.2. Extração de ácidos nucleicos

O tipo de extração a executar é escolhido consoante o tipo de amostra rececionada e o microorganismo que se pretende detetar (DNA ou RNA). Os métodos de extração de ácidos nucleicos utilizados baseiam-se em dois princípios: esferas magnéticas e colunas de sílica (Figura 69).

O método de esferas magnéticas executa-se no equipamento automático BioRobot EZ1 workstation, com os protocolos EZ1 tissue DNA kit, EZ1 virus mini kit ou EZ1 DNA blood kit. O protocolo EZ1 virus mini kit é o único protocolo que extrai RNA pelo que é usado sempre que é pedida a pesquisa de um organismo com RNA. É também usado em todas as situações em que é provável a presença de inibidores na amostra, como é o caso de urinas.

A extração de DNA/RNA pelas colunas de sílica é efetuada no equipamento automático QIAcube. Neste equipamento são utilizados os protocolos QIAamp DNA mini kit, QIAamp viral RNA e QIAamp DNA stool. O método de extração pelas colunas de sílica é utilizado em todos os casos de pesquisa de micobactérias, vírus influenza e amostras de fezes.

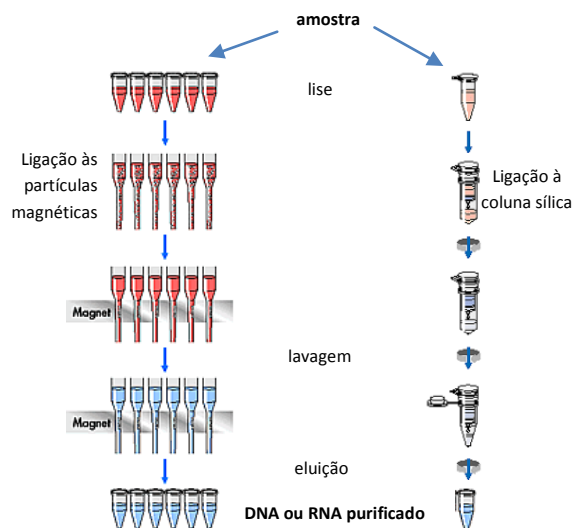


Figura 69 – Esquema ilustrativo do princípio dos métodos de extração de ácidos nucleicos: a) esferas magnéticas e b) colunas de sílica. Adaptado de <http://www.qiagen.com>.

2.6.3. Amplificação e detecção de ácidos nucleicos

Os métodos de amplificação utilizados são o PCR convencional, com análise dos produtos amplificados em gel de eletroforese e PCR em tempo real.

Para a realização do PCR em tempo real são utilizadas as diferentes abordagens destacando-se o fluorescente não específico SYBR® Green I e sondas específicas marcadas tais como as Sondas *Taqman*®, *Beacon* ou FRET.

2.6.3.1. SYBR® Green I

O SYBR® Green I é uma molécula fluorescente que se liga a todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente de comprimento de onda definido (Figura 70-A). A intensidade de sinal aumenta com o número de ciclos, devido à acumulação de produtos de PCR. O uso desta molécula permite a análise de muitas sequências-alvo, sem a síntese de sondas específicas. Contudo, produtos de PCR não específicos ou dímeros de *primers* podem contribuir para a obtenção de sinal fluorescente. Por este motivo, é necessária elevada especificidade no PCR e todos os resultados positivos devem ser confirmados pela análise da curva de *melting* (Figura 71).

2.6.3.2. Sondas *Taqman*®

As sondas *Taqman*® são oligonucleótidos específicos que possuem um fluoróforo na extremidade (5') e um *quencher* na extremidade (3'). Durante as fases de *annealing* e extensão do PCR a sonda é clivada pela atividade exonuclease 5'→3' da enzima *Taq*DNAPolimerase, separando o fluoróforo do *quencher*. Esta separação resulta em fluorescência detetável, proporcional à quantidade de produto de PCR acumulado (Figura 70-B).

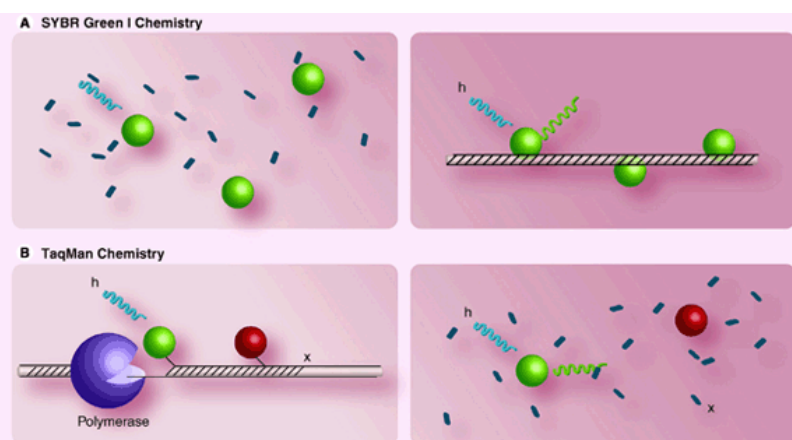


Figura 70 - Esquema ilustrativo do princípio de funcionamento de A) SyberGreen® e B) Sondas *Taqman*, em produtos de PCR por PCR em tempo real, sendo h-fluorescência e x- sem fluorescência. Adaptado de <http://www.medscape.com>.

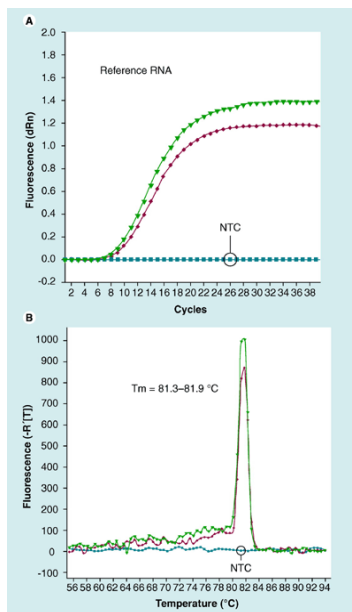


Figura 71 – Ensaio de PCR em tempo real com SYBR® Green I. A) Curva de amplificação e B) Curva de *Melting*. Adaptado de <http://www.medscape.com>.

2.6.3.3. Sondas *Beacon*

As sondas *Beacon* são oligonucleótidos específicos com conformação em *hairpin*. Nesta forma o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo (Figura 72). Na presença da sequência alvo a sonda toma a estrutura linear e emite fluorescência.

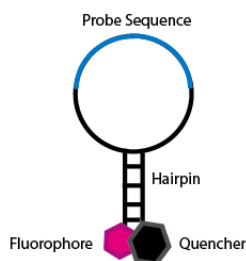


Figura 72 – Sonda Beacon. Adaptado de <http://en.wikipedia.org>.

2.6.3.4. Sondas *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*

As sondas FRET são oligonucleótidos específicos que se baseiam no princípio de hibridização dupla. Uma das sondas possui um fluoróforo, recetor de energia, e a segunda sonda possui um fluoróforo, aceitador de energia. Durante o *annealing* as duas sondas ligam-se à sequência alvo, ocorre transferência de energia, e a molécula aceitadora de energia emite fluorescência (Figura 73).

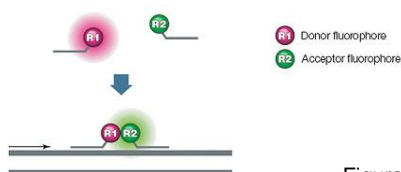


Figura 73 – Sondas FRET. Adaptado de <http://www3.bio-rad.com>.

No PCR é colocado sempre um controlo negativo (NTC) que não deve amplificar para que o ensaio seja considerado válido. A não amplificação da sequência alvo indica um resultado negativo e a sua amplificação é indicativa de um resultado positivo (Figura 74). Em cada ensaio é usado um controlo interno, que deve amplificar de forma a validar o teste. Contudo, no caso de verificarmos amplificação para a sequência-alvo e não amplificação do controlo interno, o teste pode ser validado. Tal ocorre devido a competição pelos reagentes da mistura.

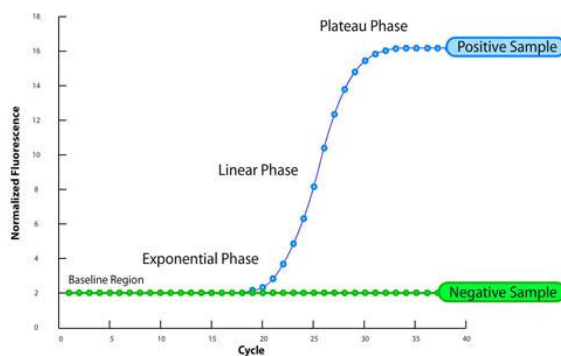


Figura 74 – Resultado de um ensaio de PCR em tempo real. Adaptado de <http://www.abbottmolecular.com>.

O PCR em tempo real é usado como teste quantitativo através do uso de controlos internos de concentração conhecida (Figura 75). A quantificação é útil na deteção de CMV no líquido amniótico e vírus JC e BK em transplantados renais.

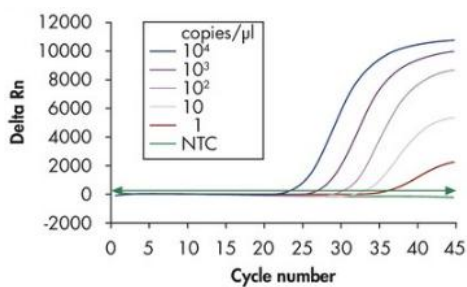


Figura 75 – Quantificação com PCR em tempo real. Adaptado de <http://www.qiagen.com>.

Atualmente estão implementadas inúmeras aplicações, tais como, a pesquisa de *Micobacteria tuberculosis spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus spp.* e *Aspergillus fumigatus*, adenovírus, bocavirus, enterovírus, metapneumovírus, vírus respiratório sincicial, vírus *Influenza A e B*, norovírus, parvovírus B19, Rhinovírus, Vírus BK e JC, vírus de *Epstein-barr* e vírus herpes. Contudo, as aplicações não terminam aqui e a função deste laboratório é a atualização contínua das suas potencialidades no auxílio do diagnóstico na Patologia Clínica.

3. LABORATÓRIO DE QUÍMICA CLÍNICA

O estágio no laboratório de Química Clínica decorreu entre 02 de Abril de 2012 e 31 de Maio de 2012, tendo permitido a aplicação prática dos temas lecionados nas unidades curriculares de Bioquímica Clínica, Bioquímica Clínica e Toxicologia e Patologia e Semiologia Clínica num laboratório hospitalar.

A Química Clínica está organizada nos laboratórios de Química Geral, Urinálise, Endocrinologia, Absorção atómica, Cromatografia, Radioimunoensaios e Rastreo bioquímico pré-natal.

As amostras são rececionadas pelos técnicos de análises clínicas e triadas nos sistemas automáticos AutoMate™ 2500.

3.1. QUÍMICA GERAL

3.1.1. ENSAIOS DE FOTOMETRIA - OLYMPUS AU5400

O laboratório possui dois autoanalisadores Olympus AU5400™ para a execução das análises de Química Geral por fotometria em amostras de soro, plasma, urina e/ou outros fluidos biológicos.

No início do dia de trabalho, após a manutenção do equipamento, são efetuados os brancos dos reagentes, ou seja, é medida a DO dos reagentes, de forma a anular as suas características óticas intrínsecas. Para isso, os reagentes são testados com água desionizada compensando qualquer interferência da cor do reagente na determinação da DO final das reações. Seguidamente são efetuadas as calibrações necessárias e os controlos de qualidade para todas as determinações.

Após a verificação dos resultados do controlo de qualidade, através da análise de gráficos *Levey-Jennings*, são testadas as amostras. Os ensaios possuem dois reagentes, iniciando-se com a pipetagem do reagente 1 na cuvete de incubação e a sua diluição em água desionizada. Posteriormente é dispensada a amostra a testar e o reagente 2. Uma reação entre o reagente e o analito contido na amostra provoca uma alteração na DO que é medida pelo fotómetro.

O sistema calcula os resultados usando uma reação de ponto final, cinética ou de tempo fixo. No caso de obtenção de um valor de DO acima do intervalo de calibração, o sistema efetua uma diluição automática e repete a leitura. As determinações efetuadas nestes equipamentos incluem o doseamento de metabolitos, enzimas, proteínas e alguns fármacos (Tabela 12).

Tabela 12 – Lista das análises de Química Clínica efetuadas nos equipamentos Olympus AU5400.

Enzimas	Adenosina desaminase (ADA)	Soro / Plasma
	Aldolase	Soro / Plasma
	Amilase	Soro / Plasma / Urina
	Colinesterase	Soro / Plasma
	Creatina Cinase e Creatina Cinase - MB	Soro / Plasma
	Fosfatase alcalina (ALP)	Soro / Plasma
	Gama Glutamil Transferase (γ GT)	Soro / Plasma
	Lactato desidrogenase (LDH)	Soro / Plasma
	Lipase	Soro / Plasma
	Transaminase Glutâmico Oxalacética (GOT)	Soro / Plasma
	Transaminase Glutâmico Pirúvica (GPT)	Soro / Plasma
	Metabolitos	Ácido Úrico
Amónia		Soro / Plasma
Bilirrubina Total e Direta		Soro / Plasma
Cálcio total		Soro / Plasma / Urina
Colesterol Total, LDL e HDL		Soro / Plasma
Creatinina		Soro / Plasma / Urina
Etanol		Soro / Plasma
Ferro		Soro / Plasma
Fósforo		Soro / Plasma / Urina
Glicose		Soro / Plasma / Urina
Lactato		Soro / Plasma
Magnésio		Soro / Plasma / Urina
Triglicerídeos		Soro / Plasma
Ureia		Soro / Plasma / Urina
Proteínas	Albumina	Soro / Plasma
	Anti-estreptolisina O (TASO)	Soro / Plasma
	Apolipoproteína A1 (APO A1)	Soro / Plasma
	Apolipoproteína B (APO B)	Soro / Plasma
	Ferritina	Soro / Plasma
	Lipoproteína a (Lpa)	Soro / Plasma
	Proteína C reativa	Soro / Plasma
	Proteínas totais	Soro / Plasma / Urina
	Transferrina	Soro / Plasma
Fármacos	Ácido Valpróico	Soro / Plasma
	Amicacina	Soro / Plasma
	Carbamazepina	Soro / Plasma
	Digoxina	Soro / Plasma
	Fenitoína	Soro / Plasma
	Fenobarbitol	Soro / Plasma
	Teofilina	Soro / Plasma

Este equipamento possui um sistema de análise de qualidade do soro, grau de Hemólise, Ictericia e Lipémia (HIL), auxiliando na avaliação de potenciais interferências nos parâmetros testados (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeito do índice HIL nos parâmetros de Química Clínica.

FLAG	H (hemólise)		I (Ictericia)		L (Lipémia)	
	Parâmetro	Efeito	Parâmetro	Efeito	Parâmetro	Efeito
+	AST Bilirrubina D Bilirrubina T CK-MB Ferro LDH Potássio	↑ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	Fosfatase ácida Ác. Úrico	↑ ↓	Ferro Lipase Glicose	↑ ↑ ↑
++	Fosfatase alcalina Creatina cinase Magnésio	↓ ↑ ↑	Colesterol Glicose	↓ ↓		
+++	Amilase Cloro Sódio Proteínas totais	↓ ↓ ↓ ↑	Lactato Lipase Proteínas Totais Ureia Triglicerídios	↓ ↓ ↓ ↓ ↓	Apo B	↓
++++	Fosfatase ácida Colesterol Glicose Fósforo Ác. Úrico	↑ ↓ ↓ ↑ ↓	Fosfatase alcalina Amilase CK-MB Glicose Magnésio	↑ ↑ ↑ ↑ ↑	Ferritina Glicose Colesterol LDL IgM	↑ ↓ ↑ ↑ ↓
+++++	TODOS					

3.1.2. ENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA - ARCHITECT®

O laboratório de Química Clínica possui dois equipamentos ARCHITECT® para a realização de ensaios de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para medir e quantificar a concentração de analitos. O princípio do método é idêntico ao descrito na seção 2.3.7.

As determinações executadas por este método compreendem marcadores da função cardíaca¹⁵ (troponina-I, peptídeo natriurético cerebral (BNP), mioglobina, creatina cinase-massa), marcadores de função tiroideia (FT4, T3 e T4 totais) e hormona gonadotrofina coriônica humana (β-HCG).

3.1.3. ANÁLISE DE ELETRÓLITOS

A análise de eletrólitos é efetuada por potenciometria direta com um Eléctrodo Seletivo de Iões (ISE). Para isso dispõe de equipamentos EasyLyte®, Na/K/Ca/pH e Na/K/Li, e os autoanalizadores AU5400™ que possuem unidades ISE incorporadas.

A unidade ISE dos equipamentos AU5400 determina a concentração dos iões Sódio (Na), Potássio (K) e Cloro (Cl) através da medição da diferença de potencial entre o eléctrodo seletivo e um eléctrodo de referência. Este potencial é gerado por iões da amostra que passam através de uma membrana seletiva de iões permitindo calcular a concentração de cada tipo de ião presente na amostra e solução padrão. A amostra é dispensada no poço de diluição da célula ISE, ao qual é adicionada um volume exato da solução tampão. A mistura passa pelas células de eléctrodos seletivos, onde ocorre a medição. O potencial gerado pela passagem da solução padrão é medido da mesma forma.

Os sistemas EasyLyte® são utilizados na determinação da concentração de Cálcio ionizado (Ca^{2+}) e Lítio (Li^+). O equipamento Na/K/Ca/pH permite a determinação do Cálcio ionizado (Ca^{2+}) em amostras de sangue total, soro ou plasma a pH 7,4. O resultado é fornecido em mmol/L e convertido em meq/L, multiplicado por dois. Os valores de referência para o Cálcio ionizado compreendem o intervalo de 2,26 a 2,64 meq/L. O equipamento Na/K/Li é usado da determinação da concentração de Lítio (Li^+) em amostras de sangue total, soro ou plasma e urina (diluída a 1:10).

3.1.4. DETERMINAÇÃO DA OSMOLARIDADE SÉRICA E URINÁRIA

A Osmolaridade mede a concentração de partículas num soluto que contribuem para a pressão osmótica. A determinação da Osmolaridade no plasma e urina é usada na avaliação do equilíbrio hídrico.

O equipamento Micro-Osmomoter 3300 determina a Osmolaridade medindo a diminuição do ponto de congelamento da amostra (depressão crioscópica), pois o ponto de congelamento de uma solução diminui em relação direta com a quantidade de soluto em solução. Para isso, a amostra em agitação suave e constante, é arrefecida vários graus abaixo do seu ponto de congelamento ($\approx 5^{\circ}\text{C}$). Quando a amostra atinge esta temperatura, a agitação passa a vigorosa favorecendo a cristalização. À medida que ocorre a formação dos cristais de gelo são adicionadas moléculas de água aos cristais. Contudo, há libertação de calor no processo de congelamento, o que aumenta a temperatura da amostra e o congelamento rápido pára a uma temperatura de equilíbrio. A temperatura é medida no ponto em que o calor retirado pelo bloco de refrigeração é igual ao calor libertado pelo processo de congelamento. Esta temperatura de equilíbrio é medida e convertida em miliOsmoles (mOsm) por kilograma.

O equipamento permite a determinação da Osmolaridade no intervalo de valores de 0 a 2000 mOsm/L H_2O , com uma resolução de 1 mOsm/L H_2O , em amostras de soro, urina e outros fluídos biológicos. Os valores de referência em amostras de soro são entre 282 a 300 mOsm/L H_2O .

3.1.5. GASIMETRIA

A medição da pressão de oxigénio (pO_2), pressão de dióxido de carbono (pCO_2), pH e concentração do ião hidrogenocarbonato carbonato (HCO_3^-) no sangue é importante na avaliação do equilíbrio ácido-base. Os distúrbios ácido-base denominam-se acidose e alcalose, metabólica ou respiratória consoante o distúrbio primário é a concentração de ião hidrogenocarbonato ou a pressão de dióxido de carbono.

A análise é efetuada com o oxímetro RapidLab1265® em sangue total, venoso ou arterial, colhido com anticoagulante heparina-lítio. Os resultados de pCO_2 , sO_2 , pH e HCO_3^- ativado são inseridos manualmente no sistema informático.

3.1.6. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS (TDM)

A monitorização terapêutica de fármacos, e seus metabolitos, é importante no controlo da terapêutica, evitando níveis tóxicos, sub-terapêuticos ou interações entre fármacos.

No laboratório de Química Clínica são doseados fármacos antiarrítmicos, tal como a digoxina, anti-asmáticos como a teofilina, psicotrópicos como os antidepressivos tricíclicos, antibióticos como a gentamicina e vancomicina, fármacos anti-neoplásicos como o metotrexato (MTX) e ainda fármacos anticonvulsionantes como o fenobarbital e ácido valpróico. Para isso, são usadas diferentes metodologias tais como a fotometria, no sistema AU5400 descrita em 3.1.1, quimioluminescência descrita em 2.3.7. e fluorescência polarizada.

O imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA) consiste na competição do fármaco marcado com fluoresceína e fármaco não marcado. Após a excitação da amostra com luz polarizada, ocorre emissão da fluoresceína, verificando-se que o fármaco livre tem maior rotação relativamente ao fármaco ligado ao anticorpo, originando menor emissão de luz. Desta forma, quanto maior for a concentração de fármaco na amostra menor é a fluoresceína emitida pelo fármaco-anticorpo, havendo menor emissão de luz polarizada. (Figura 76). Este ensaio requer a medição do branco do soro, de forma a eliminar o efeito de matriz, e a execução de uma curva de calibração.

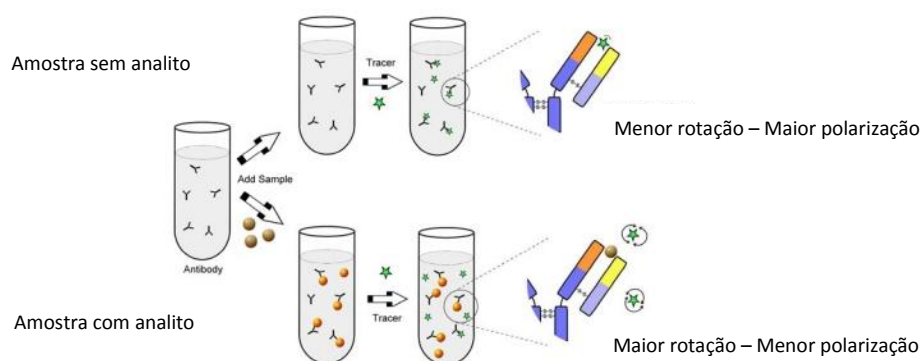


Figura 76 – Imunoensaio por Fluorescência Polarizada. Adaptado de <http://www.biomedsearch.com>.

3.1.6.1. Doseamento de Metotrexato

O Metotrexato (MTX) é um fármaco utilizado no tratamento de doenças oncológicas e autoimunes. O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição do metabolismo do ácido fólico, pela inibição da enzima dihidrofolato redutase.

É metabolizado pelo fígado e excretado pela urina, sendo monitorizada a sua concentração no soro nos casos terapêuticos com elevadas doses ($>50\text{mg/m}^2$) às 24, 48 e 72 horas. As concentrações sanguíneas indicativas de toxicidade são:

- 10 $\mu\text{mol/L}$ às 24 horas
- 1,0 $\mu\text{mol/L}$ às 48 horas
- 0,1 $\mu\text{mol/L}$ às 72 horas

O doseamento de MTX é efetuado no equipamento TDX®, utilizando o ensaio Methotrexato II, em amostras de soro ou plasma. O equipamento possui dois protocolos, sem e com diluição (1:10, 1:100 e 1: 1000), devendo ser usado o protocolo de diluição sempre que as concentrações de MTX forem superiores a 1,00 $\mu\text{mol/L}$, o que permite o doseamento até 1000 $\mu\text{mol/L}$.

3.1.6.2. Doseamento de Acetaminofeno, Benzodiazepinas, Salicilatos e Anti-depressivos Tricíclicos

O sistema AxSYM® é um autoanalisador de imunoensaios com potencialidade de executar ensaios imunoenzimáticos de micropartículas (MEIA), imunoensaios de fluorescência polarizada (FPIA) e ensaios de atenuação de energia radioativa (REA). A tecnologia a utilizar depende do peso molecular dos analítos que pretendemos dosear. A FPIA é usada no doseamento de moléculas de baixo peso molecular, sendo um método muito sensível e preciso no doseamento de fármacos.

Os fármacos doseados por esta metodologia são o acetaminofeno, benzodiazepinas, salicilatos e anti-depressivos tricíclicos. Este equipamento não possui módulo de diluição automático, pelo que as amostras com concentração de fármacos superiores ao limite de linearidade devem ser diluídas manualmente.

3.2. URIANÁLISE

A urianálise compreende a análise físico-química da urina, observação do sedimento urinário por microscopia ótica e análise toxicológica.

O método para a colheita de urina depende da capacidade do doente de evacuar de forma voluntária ou da necessidade de técnicas invasivas para obter a amostra em condições adequadas. Desta forma, a colheita pode ser efetuadas por micção espontânea (primeira urina da manhã, urina aleatória ou urina minutada), por cateterismo vesical ou punção suprapúbica.

O tipo de amostra depende do estudo solicitado pois existem compostos cuja eliminação obedece a ciclos metabólicos, outros são excretados em relação à concentração hormonal ou são dependentes da dieta. Assim, certas substâncias devem ser determinadas por um período de tempo estabelecido sendo colhidas urinas minutadas, tal como a urina de 24 horas que permite a quantificação dos compostos presentes na urina ao longo do dia. No caso de determinações especiais em urinas minutadas de 24 horas, são usadas substâncias químicas conservantes. Para doseamentos cromatográficos de catecolaminas e seus derivados a urina é acidificada. No caso de análise de porfirinas a urina é alcalinizada com carbonato de sódio e protegida da luz.

O volume das amostras de urina minutada é registado e, após a sua homogeneização, são retiradas alíquotas para a realização das determinações solicitadas. As amostras de urina aleatórias, ou a primeira urina da manhã, são homogeneizadas e divididas em alíquotas consoantes os pedidos: análise físico-química, análises de Química Clínica, executadas no equipamento Olympus AU5400 (Tabela 12) e Osmolaridade, efetuada no Micro-Osmomoter 3300, seção 3.1.4.

3.2.1. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A análise físico-química da urina é efetuada com tiras reativas, de uma forma automática com o uso do equipamento Aution-Max AX4030, ou manualmente mergulhando as tiras reativas MultistixR® 10SG na amostra de urina e posterior leitura no equipamento *Clinitek* (Bayer®).

O equipamento Aution-Max AX4030 analisa os parâmetros por refletância: pH, Glicose (GLU), Corpos Cetónicos (KET), Bilirrubina (BIL), Nitritos (NIT), Proteínas (PRO), Hematúria ou Hemoglobínúria (BLD), Leucócitos (LEU). Determina a densidade da urina por índice de refração (1.000-1.050), a cor por refletância (23 tonalidades) e ainda a turvação por dispersão de luz (límpida, turva ou muito turva).

3.2.2. URINANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A urianálise por citometria de fluxo substitui a análise microscópica do sedimento, com vantagens na precisão e redução substancial de trabalho. O equipamento utilizado, UF-1000i (Sysmex), realiza a identificação e contagem do número de elementos (elementos/mL), sem necessidade da centrifugação prévia da urina^{16,17,18}.

O equipamento funciona de modo automático e manual, usado em amostras com volume reduzido, determinando as contagens de glóbulos vermelhos (RBC), glóbulos brancos (WBC), bactérias (BACT), cilindros (CAST) e células epiteliais (EC), por volume de urina.

No caso de discrepâncias entre a análise da tira reativa e o resultado por citometria, ou em casos de alertas (FLAGS), que indicam a presença de elementos tais como cilindros patológicos, cristais, pequenas células esféricas, espermatozoides, leveduras e muco, é efetuado o sedimento urinário para confirmação.

3.2.3. SEDIMENTO URINÁRIO

O sedimento urinário é efetuado como análise confirmatória após a realização da análise físico-química da urina e citometria de fluxo. É efetuado de forma automática com o equipamento SediMax®, que fornece 15 imagens diferentes. No caso de necessidade de confirmação, ou volume insuficiente, a urina é centrifugada a 1500 g durante 5 minutos e o sedimento observado no microscópio ótico.

O equipamento necessita de um volume mínimo de amostra de 2,0 mL, utilizando 0,2 mL para a realização do sedimento. Deteta eritrócitos (RBC), leucócitos (WBC), cilindros hialinos (HYA), cilindros patológicos (PAT), células epiteliais escamosas (EPI), células epiteliais renais e células epiteliais de transição (NEC), bactérias (BAC), leveduras (YEA), cristais (CRY), oxalato de cálcio mono-hidratado (CaOxm), oxalato de cálcio di-hidratado (CaOxd), ácido úrico (URI), trifosfatos (TRI), muco (MUC) e espermatozoides (SPRM) (Figura 77).

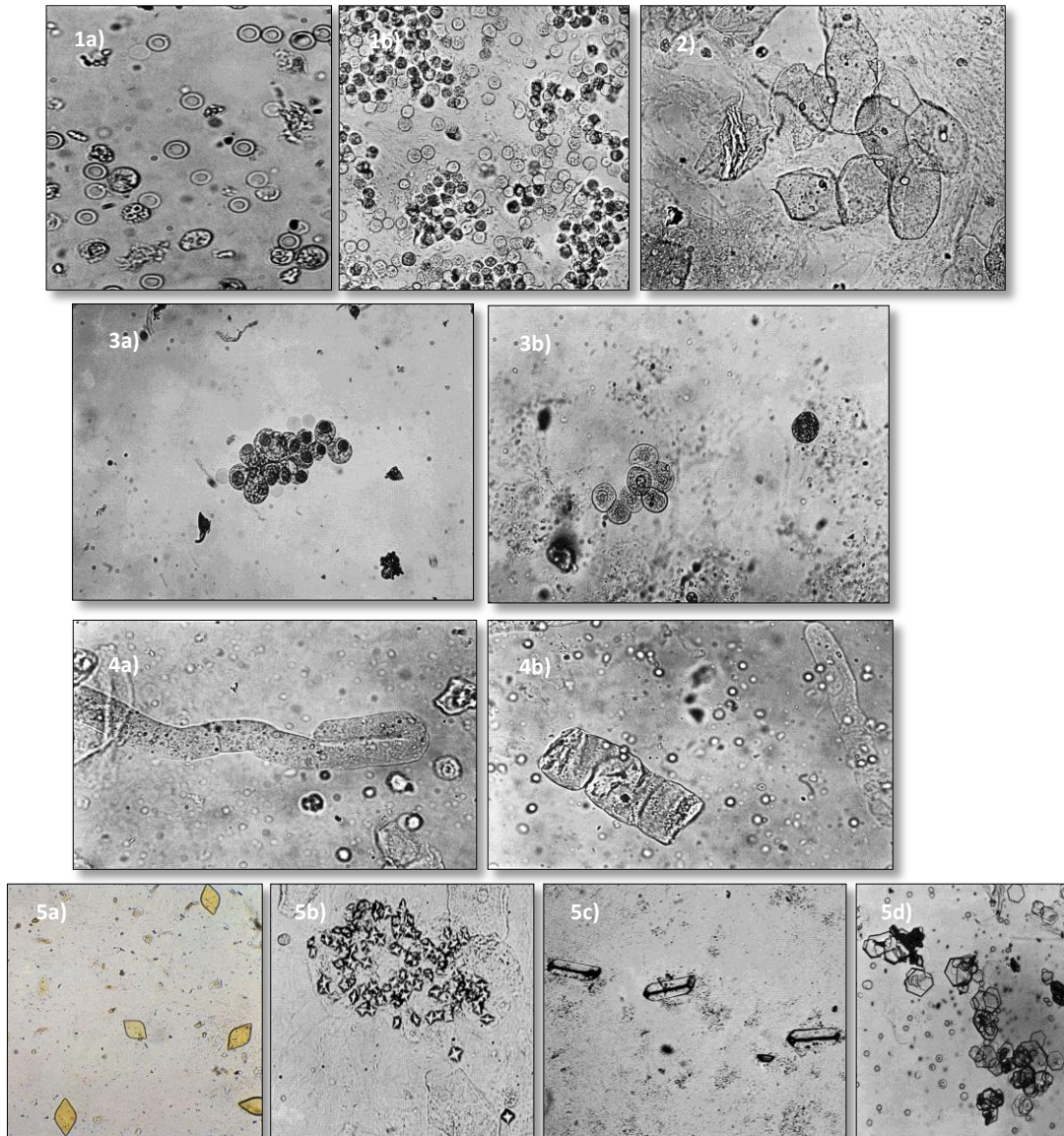


Figura 77 - Imagens de Sedimentos Urinários. 1) Células sanguíneas: 1a) eritrócitos, 1b) leucócitos; 2) Células epiteliais de descamação; 3) Células trato urinário superior: 3a) epitélio tubular, 3b) epitélio cilíndrico; 4) Cilindros: 4a) hialino, 4b) ceroso; 5) Cristais: 5a) ácido úrico, 5b) oxalato, 5c) trifosfato, 5d) cistina.

3.2.4. ANÁLISE TOXICOLÓGICA - PESQUISA DE DROGAS DE ABUSO

A pesquisa de drogas de abuso na urina é efetuada com o auxílio a um teste rápido Tox/See (BioRad) ou pela tecnologia FPIA, descrita em 3.1.6.2 (AxSYM®).

O teste rápido para pesquisa rápida de drogas permite a pesquisa de anfetaminas e metaanfetaminas, opiáceos, benzodiazepinas, tetrahydrocannabinol, metadona, cocaína, oxicodona, barbitúricos, antidepressivos cíclicos, ecstasy, fenilciclidina, propoxifeno. Para isso são adicionadas nos poços 3 gotas de urina, após homogeneização. É efetuada uma incubação de 5 minutos e registada a leitura para cada droga, verificando-se os controlos de forma a validar o teste (Figura 78). A ausência de linha indica um resultado positivo para a droga respetiva.



Figura 78 – Teste rápido para pesquisa de drogas na urina.

Com a tecnologia FPIA é efetuada a pesquisa de Anfetaminas e Metanfetaminas, Cocaína, Opiáceos e Canabinoides na urina. No caso de concentrações superiores a 8000 ng/mL de anfetaminas/metanfetaminas, superiores a 5000 ng/mL de cocaína e superiores a 135 ng/mL de canabinoides, a urina pode ser diluída manualmente e reanalisada. A diluição automática (1/3) é possível no caso dos opiáceos e deve ser realizada para os intervalos de 600 e 1800 ng/mL.

Os ensaios realizados no AxSYM® fornecem apenas um resultado preliminar devendo ser efetuado um método mais específico para a confirmação do resultado. É importante ter em consideração que as concentrações de drogas detetadas na urina não estão relacionadas com os níveis de droga no sangue ou danos fisiológicos. A presença de uma droga ou metabolito na urina é apenas uma indicação de exposição prévia à droga¹⁹.

3.3. ANÁLISE ÀS FEZES

3.3.1. PESQUISA DE SANGUE OCULTO

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é efetuada por imunocromatografia, usando uma combinação de anticorpo monoclonal marcado e anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana em fase sólida.

A hemoglobina presente na amostra liga-se ao conjugado, anticorpo monoclonal, formando um complexo antígeno-anticorpo. O complexo formado fluirá pela área absorvente da placa teste, ligando-se ao anticorpo anti-hemoglobina humana na área de reação positiva, surgindo uma banda de cor rosa-avermelhada. O teste executa-se conforme descrito na Figura 79

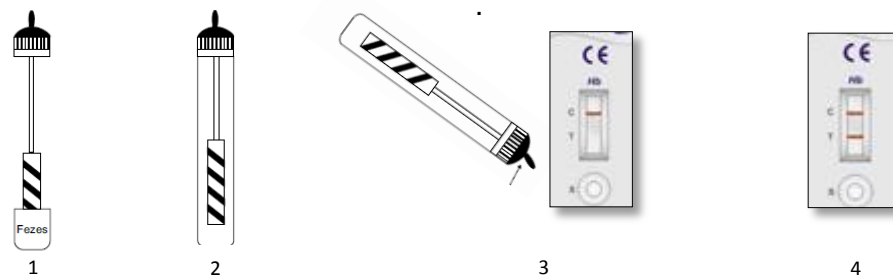


Figura 79 – Procedimento do teste para pesquisa de sangue oculto nas fezes: 1) amostras em três pontos diferentes na amostra; 2) recolocar a vareta no tubo e agitar vigorosamente; 3) quebrar a tampa e colocar a amostra no poço; 4) Efetuar a leitura dos resultados.

3.3.2. PESQUISA DA MÁ ABSORÇÃO INTESTINAL

A má absorção intestinal leva a um aumento da quantidade de gordura excretada nas fezes denominada esteatorreia. Há formação de fezes volumosas, acinzentadas, de cheiro intenso, com aparência oleosa flutuando na água. Pode ter diferentes etiologias, tais como a Pancreatite, Fibrose Quística e Doença Celíaca. Um teste simples para esta análise é a coloração com Sudão II de fezes diluídas em água visualizando ao microscópio ótico gotículas de gorduras coradas de vermelho (Figura 80a). Podem também ser visualizadas fibras musculares (estruturas estriadas) devido à má digestão de proteínas e grãos de amido (Figura 80b).

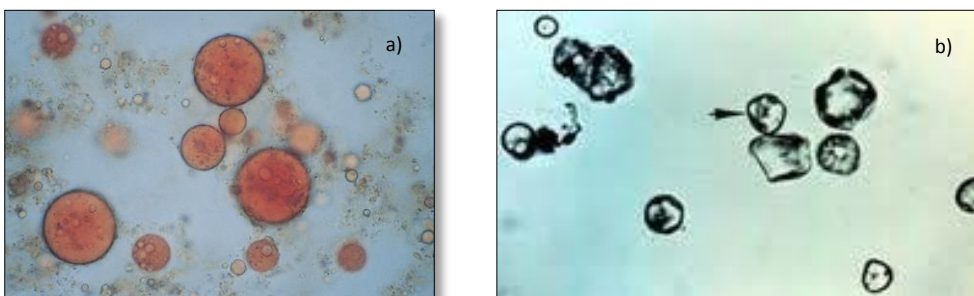


Figura 80 – Análise de má absorção intestinal: a) partículas de gordura com corante Sudão II e b) grãos de amido em Lugol.

3.4. CROMATOGRÁFIA LÍQUICA A ELEVADA PRESSÃO (HLPC)

O laboratório de Química efetua o doseamento cromatográfico de Catecolaminas plasmáticas e urinárias, das Vitaminas A e E no soro, e doseamento urinário dos ácidos vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

3.4.1. DOSEAMENTO DE CATECOLAMINAS

As catecolaminas: adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) e dopamina, sintetizadas a partir dos aminoácidos L-fenilalanina ou L-3,4-dihidroxifenilalanina, desempenham um papel fundamental no organismo como hormonas e neurotransmissores.

O doseamento dos níveis de catecolaminas no plasma e urina possui relevância clínica no diagnóstico do Feocromocitoma^{20,21} e outros tumores do sistema nervoso central, que aumentam grandemente a sua produção. Desta forma, há um aumento da concentração de catecolaminas na circulação sanguínea com conseqüente aumento da excreção na urina. O doseamento das catecolaminas é efetuado preferencialmente pela determinação quantitativa na urina minutada de 24 horas, acidificada com HCl. Por outro lado, para testes farmacológicos é necessário o seu doseamento no plasma.

O método utilizado é a cromatografia líquida de elevadas pressões (HPLC) com coluna de troca iónica de fase reversa e deteção eletroquímica (Gilson ASPEC™ XL). Em cada ensaio são usados dois calibradores e duas amostra controlo (BioRad®). Em todas as amostras, controlos e calibradores, é adicionada a mesma quantidade de padrão interno. Previamente à passagem da amostra de urina na coluna analítica de HPLC a amostra sofre um processo de extração automático.

A concentração das catecolaminas é determinada de acordo com a área dos picos obtidos no cromatograma (Figura 81), de acordo com a fórmula:

$$[Catecolamina]_{\mu g/dL} = \frac{\text{Altura pico amostra}}{\text{Altura pico calibrador}} \times [\text{Calibrador}] \times \frac{\text{Altura Padrão no calibrador}}{\text{Altura Padrão na amostra}} \times V(24h)$$

Nos casos em que a colheita de urina minutada de 24 horas não é possível, o valor final é fornecido em relação ao valor obtido de creatinina urinária:

$$[Catecolamina]_{\mu g/g \text{ creatinina}} = \frac{[Catecolamina]_{\mu g/dL}}{[Creatinina]_{mg/L}} \times 1000$$

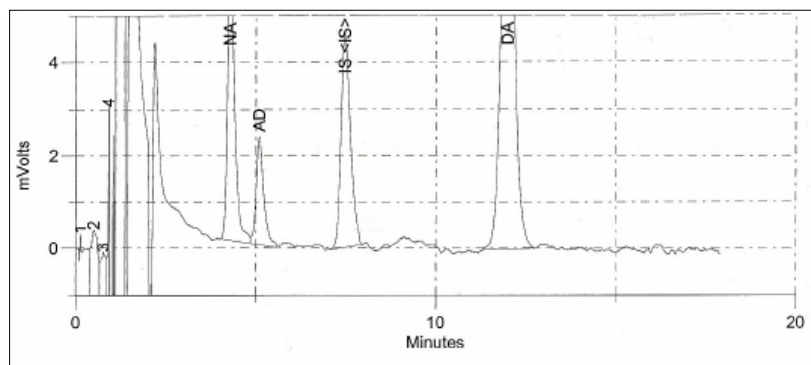


Figura 81 – Doseamento cromatográfico de catecolaminas urinárias, sendo NA - Noradrenalina, AD - Adrenalina, DP - Dopamina e IS - Padrão Interno.

O método de doseamento das catecolaminas plasmáticas é idêntico ao doseamento das catecolaminas urinárias, HPLC em coluna de troca iónica de fase reversa, com detetor eletroquímico. Contudo, dado que as concentrações plasmáticas das catecolaminas são 100 a 1000 vezes inferiores às concentrações urinárias, é usado um detetor mais sensível.

Os limites de deteção e linearidade são entre 3 e 1000 $\mu\text{g/L}$ para as catecolaminas urinárias e 15 a 10000 pg/mL para as catecolaminas plasmáticas.

3.4.2. DOSEAMENTO URINÁRIO DE VMA/HVA/5-HIAA

O doseamento dos ácidos vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), na urina minutada 24 horas, é efetuado por HPLC com coluna reversa de troca iónica e deteção eletroquímica (Gilson ASPEC™ XL).

Os ácidos VMA, HVA e 5-HIAA são os produtos urinários resultantes da degradação metabólica das catecolaminas. Por este motivo, em casos de tumores secretores de catecolaminas tal como o feocarcinoma, neuroblastoma e ganglioneuroma, encontram-se em concentrações elevadas. As amostras são submetidas a um processo de extração, às quais são adicionados dois padrões internos.

O limite de deteção dos ácidos VMA, HVA e 5-HIAA é de 0.5 mg/L . Por outro lado, a linearidade é de 60 mg/L para os ácidos VMA e HVA e de 120 mg/L para o ácido 5-HIAA.

3.4.3. DOSEAMENTO SÉRICO DE VITAMINA A E VITAMINA E

A Vitamina A (retinol) e Vitamina E (α -tocoferol) são doseadas no soro por HPLC acoplado a um detetor ultra-violeta (ChromSystems).

As amostras são congeladas protegidas da luz, a -20°C até a sua análise. Após descongelação as amostras são centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos.

Na coluna de HPLC são injetados 50 μL de amostra, pré tratada com soluções de precipitação que, a um fluxo de 1.5mL/min, demora cerca de 12 minutos a atravessar a coluna (Figura 82). A cada 200 μL de soro é adicionado 20 μL de padrão interno.

Os intervalos de deteção do método usado são 2 a 225 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e 50 a 4500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ para a Vitamina A e Vitamina E, respetivamente.

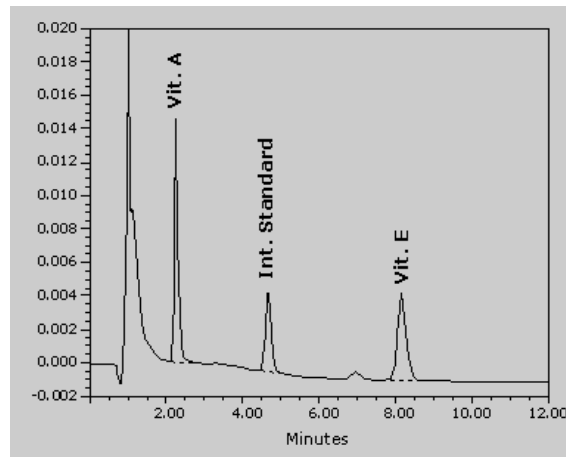


Figura 82 – Doseamento cromatográfico da Vitamina A e Vitamina E. Adaptado de www.chromsystems.com.

3.4.4. PESQUISA DE VARIANTES DE HEMOGLOBINA

A pesquisa de variantes da Hemoglobina é efetuada por determinação do tempo de retenção por HPLC com o sistema VARIANT™ II, BioRad²².

Os tipos de hemoglobinas normais encontradas em adultos são a Hemoglobina A, Hemoglobina A₂ (< 4%) e Hemoglobina Fetal (< 0.5 - 1%). Contudo, têm sido descritos alterações nas percentagens de síntese de cadeias globínicas (α e β) e síntese modificada originando talassémias e hemoglobinopatias, respetivamente. O sistema HPLC usado distingue e quantifica os tipos de Hemoglobina (Figura 83).

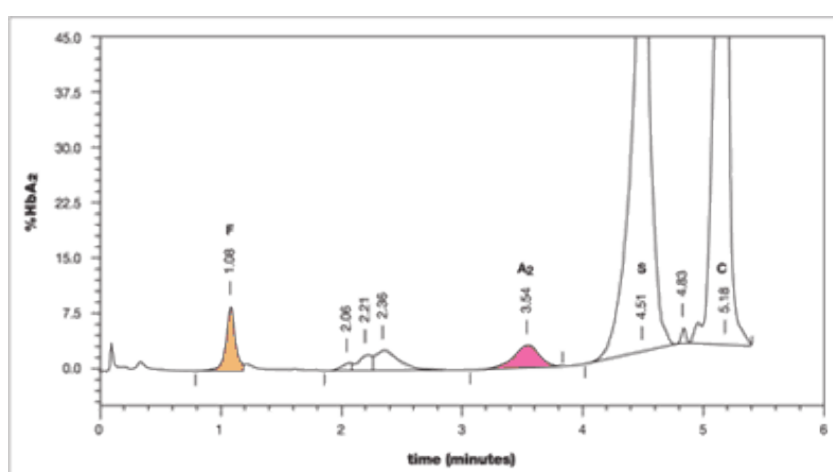


Figura 83 – Ensaio Cromatográfico das Hemoglobinas. Adaptado de <http://www.bio-rad.com>.

3.5. DOSEAMENTO DE METAIS POR ABSORÇÃO ATÓMICA

O Cobre (sérico e urinário) e Zinco (sérico) são determinados por Espectrofotometria de absorção atômica de chama (EAA-chama).

O Cobre, sérico e urinário, é doseado em casos de suspeita de Doença de Wilson, doença genética autossômica recessiva. Nesta doença o cobre sérico está baixo, relativamente aos valores de referência (50-140 µg/dL). Paradoxalmente, os níveis de cobre urinário estão elevados, relativamente aos valores de referência (3-35 µg/dL).

O Zinco é um elemento essencial associado a várias funções biológicas, nomeadamente como cofator enzimático²³. Níveis baixos de Zinco sérico têm sido associados à baixa atividade da enzima leptina, responsável pela sensação de saciedade^{24,25}.

A determinação é efetuada no equipamento EAA-chama (ICE, Thermo®) após a realização de uma reta de calibração de três pontos. As soluções padrão para o cobre são efetuadas diluindo uma solução padrão-mãe com a concentração 10 mg/L em ácido nítrico a 0.2%. Para a reta de calibração do cobre urinário são preparadas soluções padrão com as concentrações: 0.2 mg/L (P1), 0.4 mg/L (P2) e 0.6 mg/L (P3). As soluções padrão para a curva de calibração do cobre sérico são preparadas com as concentrações de 10 µg/dL (P1), 20 µg/dL (P2) e 30 µg/dL (P3). Finalmente, para a determinação de zinco sérico são utilizadas as soluções padrão com as concentrações de 10 µg/dL (P1), 20 µg/dL (P2) e 40 µg/dL (P3).

Em cada ensaio são usadas duas amostras controlo, com dois níveis de concentração diferente. Cada amostra é diluída em ácido nítrico (HNO₃) a 0.2% e o fator de diluição é introduzido no programa de forma a obter automaticamente o valor da concentração de cada amostra.

Os resultados de concentração de cobre sérico são calculados multiplicando os valores obtidos pelo volume da urina minutada de 24 horas. Todos os valores são convertidos em µmol/L multiplicando os valores pelo fator de conversão de 0,157.

3.6. RASTREIO BIOQUÍMICO PRÉ-NATAL 1ºTRIMESTRE

O laboratório de Química Clínica dá apoio à consulta de obstetrícia no rastreio bioquímico a mulheres no 1º trimestre de gravidez. Este rastreio combina medições sonográficas ao feto, a idade materna e análise bioquímica materna dos parâmetros de proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) e hormona gonadotrofina coriônica humana livre (β -hCG)^{26,27}. O 1º trimestre inicia-se à décima primeira semana e termina na décima terceira semana e seis dias, pelo que a amostra materna deve ser colhida neste período.

O rastreio bioquímico é efetuado pelo ensaio DELFIA® Xpress (Perkin-Elmer)²⁸. O ensaio DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) é um ensaio fluorimétrico de fase sólida que mede a fluorescência por unidade de tempo. A amostra é adicionada a placas revestidas com anticorpos, aos quais se liga. Após um passo de lavagem é adicionado o anticorpo marcado com Európio (Eu). Finalmente, após novo passo de lavagem é adicionado o Indutor com emissão de fluorescência a 612 nm, proporcional à concentração (Figura 84).

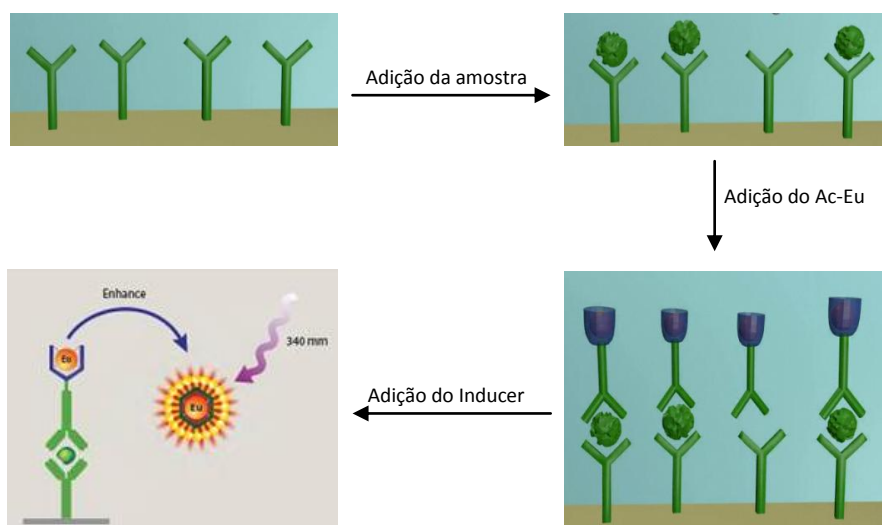


Figura 84 – Ensaio bioquímico DELFIA® Xpress para a deteção de PAPP-A e β -hCG, Delfia® Xpress (Perkin-Elmer), <http://perkinelmerreagents.onconfluence.com>.

Os valores obtidos (IU/L) são inseridos num programa de análise de risco que determina o risco basal, que considera apenas a idade materna, e o risco corrigido. O risco corrigido corresponde ao risco que existe no momento do rastreio, calculado a partir do risco basal, fatores ultrassonográficos e doseamento bioquímico materno (convertido em múltiplos de mediana normal MoM²⁹). Os fatores ultrassonográficos considerados compreendem a espessura da translucência da nuca (TN), presença/ausência dos ossos

do nariz, *doppler* do ducto venoso e frequência cardíaca fetal. São ainda inseridos os dados de paridade, etnia e peso materno (cálculo bioquímico por índice de massa corporal). O valor *cut-off* do rastreio é de 1/300, considerando um rastreio positivo para trissomias 13,18 ou 21 se o valor de risco for superior a 1/300.

3.7. ENDOCRINOLOGIA

3.7.1. IMUNOENSAIOS DE ELECTROQUIMIOLUMINESCÊNCIA (ECL)

A Eletroquimioluminescência (ECL) consiste num processo de reações químicas que geram luminescência a partir de um estímulo elétrico com a vantagem de controlar com maior rigor o início de reação.

A reação consiste na adição de dois tipos de anticorpos às amostras, anticorpos ligados a biotina e anticorpos ligados ao ruténio, que formam uma *sandwich* com o analito. Seguidamente são adicionadas micropartículas magnéticas ligadas a estreptavidina que se ligam fortemente à biotina. O complexo formado é então transferido para a células de deteção onde atua um íman, que liga as micropartículas magnéticas. A solução ProCell efetua uma lavagem, eliminando os anticorpos não ligados e fornece a tripropilamina (TPA) essencial à reação. É aplicada a voltagem que inicia a reação de ECL excitando o átomo de ruténio (Ru^{2+}) e a TPA. O TPA serve como um redutor fazendo passar o ruténio ao seu estado fundamental (Ru^{3+}), com emissão de luz detetada por um fotomultiplicador. O ciclo de ECL repete-se enquanto for aplicada voltagem permitindo a amplificação do sinal pois o ruténio possui capacidade de regeneração, ou seja, uma única molécula de ruténio tem a capacidade de libertar vários fótons de luz, com aumento da sensibilidade do ensaio (Figura 85).

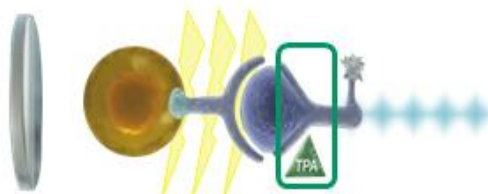


Figura 85 – Princípio do ensaio de eletroquimioluminescência (ECL), <http://www.cobas.com>.

O laboratório de endocrinologia utiliza esta tecnologia em dois equipamentos Cobas® e411, onde executa o doseamento da Hormona adrenocorticotrófica (ACTH), Péptido C, Cortisol³⁰, Desidroepiandrosterona (DHEA), Estradiol, Hormona folículo estimulante (FSH), Hormona gonadotrofina coriónica (hCG), Insulina, Hormona luteinizante (LH), Progesterona, Prolactina (PRL), Globulina transportadora de hormonas sexuais (SHBG) e Testosterona. São efetuados também nestes equipamentos os doseamentos de marcadores de remodelação óssea como o telopéptido β -C-terminal do colagénio tipo I (CTx), Vitamina D total, Osteocalcina, anticorpos anti-P1NP e Hormona para-tiróide (PTH), auxiliando o bloco operatório nas cirurgias de remoção.

3.7.2. IMUNOENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA

O laboratório de endocrinologia efetua ensaios de quimioluminescência, em amostras de soro, plasma e urina, com o autoanalisador Immulite 2000™ (Siemens) no doseamento de calcitonina, Δ 4-androstenediona (AND), hormona de crescimento (GRH), eritropoietina (EPO), tireoglobulina, fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1) e Proteína 3 de transporte de IGF (BP3).

O ensaio baseia-se em microesferas revestidas com anticorpos específicos como fase sólida. O processo inicia-se pela adição das micropartículas à cuvete de reação, à qual é adicionada a amostra ocorrendo a reação. Após uma lavagem é adicionado um substrato quimioluminescente com emissão de luz lida num fotomultiplicador, proporcional à quantidade de analito presente na amostra.

3.7.3. DOSEAMENTO DE FÁRMACOS IMUNOSSUPRESSORES

O doseamento de fármacos imunossupressores é efetuado por imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência (CMIA) no equipamento Architect® (Abbott), cujo princípio de funcionamento se encontra descrito em 2.3.7.

Os fármacos são doseados a doentes submetidos a transplante, em terapia imunossupressora, de forma a garantir que o fármaco se encontra em doses terapêuticas, evitando a rejeição do órgão e minimizando os efeitos tóxicos.

As amostras são colhidas com anticoagulante EDTA e são submetidas a um pré-tratamento com reagentes orgânicos de forma a precipitar as proteínas e extrair os fármacos.

3.7.3.1. Doseamento da Ciclosporina

Num tubo *ependorf* adicionam-se 200 µL de amostra, previamente homogeneizada, a 100 µL de reagente de solubilização e 400 µL de reagente de precipitação. A mistura é agitada fortemente no *vórtex* durante 5 a 10 segundos e centrifugada de imediato a 1300 rpm durante 4 minutos. Após verificação do sedimento, o sobrenadante é decantado para um tubo de pré-tratamento de transplante K2-EDTA (Abbott®) que, após agitação, é analisado no autoanalisador.

3.7.3.2. Doseamento de Tacrolimus

Num tubo *ependorf* adicionam-se 200 µL de amostra, previamente homogeneizada, a 200 µL de reagente de precipitação. A mistura é agitada fortemente no *vórtex* durante 5 a 10 segundos e centrifugada de imediato a 1300 rpm durante 4 minutos. Após verificação do sedimento, o sobrenadante é decantado para um tubo de pré-tratamento de transplante K2-EDTA (Abbott®) que, após agitação, é analisado no autoanalisador.

3.7.3.3. Doseamento de Sirolimus

Num tubo *ependorf* adicionam-se 150 µL de amostra, previamente homogeneizada, a 300 µL de reagente de precipitação. A mistura incuba durante 10 minutos em bloco de aquecimento a 42°C após forte agitação no *vórtex* durante 5 a 10 segundos. Após incubação a mistura é centrifugada de imediato a 1300 rpm durante 4 minutos. Após verificação do sedimento, o sobrenadante é decantado para um tubo de pré-tratamento de transplante K2-EDTA (Abbott®) que, após agitação, é analisado no autoanalisador.

3.7.4. RADIOIMUNOENSAIOS

3.7.4.1. Doseamento de Renina

A renina é uma enzima proteolítica ácida produzida e secretada pelas células justaglomerulares. Decompõe o angiotensinogénio em angiotensina I (inativa) que vai originar a produção de angiotensina II (ativa). O doseamento da renina é efetuado por radioimunoensaio (Renin III generation, *Cisbio*) no soro em doentes hipertensos e no seguimento de terapia de hipertensão.

O ensaio inicia-se por uma incubação de 3 horas, em agitação horizontal e temperatura ambiente, de 300 µL dos padrões (S_0 - S_5), amostra controlo e amostras a testar (em duplicado) com um anticorpo monoclonal anti-renina insolubilizado na parede dos tubos de poliestireno e 100 µL de anticorpo monoclonal secundário anti-renina marcado com Iodo radioativo (^{125}I).

Após incubação o meio reativo é eliminado com três lavagens com 2,0 mL de solução de lavagem R_3 (1/10). Finalmente, a radioatividade é lida num Contador de Cintilação Gama. Através da medição dos padrões é efetuada uma reta de calibração que associa os valores de contagens por minuto (cpm) ligados às concentrações de renina (pg/mL).

3.7.4.2. Doseamento de Aldosterona

Os níveis de aldosterona no soro ou plasma dependem da ingestão de sódio e da posição do doente aquando da colheita, em pé ou deitado³¹.

O doseamento de aldosterona é efetuado por radioimunoensaio de fase sólida, com anticorpos anti-aldosterona imobilizados na parede de tubos de polipropileno (Count-a Count® Aldosterone, Siemens). A adição de aldosterona marcada com Iodo radioativo compete durante um período de tempo fixo (tempo de incubação) com a aldosterona por locais de fixação de anticorpos na amostra do doente. As lavagens posteriores separam a aldosterona ligada e livre. A quantidade de aldosterona presente na amostra é determinada após a leitura dos padrões, controlo e amostras num contador gama, através de uma curva de calibração.

3.7.5. TESTE DE SUOR

A prova de suor é efetuada em casos de suspeita de Fibrose Quística, doença genética³² que se traduz numa alteração do transporte de iões de cloro (Cl) através das membranas. Os principais sintomas são o desenvolvimento de infeções respiratórias recorrentes e insuficiência pancreática.

O teste pode ser efetuado às duas semanas de idade em crianças com mais de três quilos, hidratadas e sem doença sistémica. O método usado consiste na estimulação e recolha da sudação após a colocação de dois eléctrodos revestidos com uma substância estimuladora de suor, Macroduct^{33,34}. É efetuado num dos braços, limpo e bem seco, onde são colocados os dois eléctrodos com gel de polícarpina e é aplicada a corrente. Após a estimulação de cerca de 20 minutos, coloca-se o coletor na zona do eléctrodo vermelho (positivo). O coletor possui um corante azul que permite a visualização da quantidade de suor produzida (Figura 86). Após a recolha é efetuada a medição da condutividade, inferindo a concentração de Cloro (mmol/L). O intervalo de valores de referência é entre 0 a 60 mmol/L, estando *borderline* entre 60-80 mmol/L e elevado acima de 80 mmol/L³⁵.

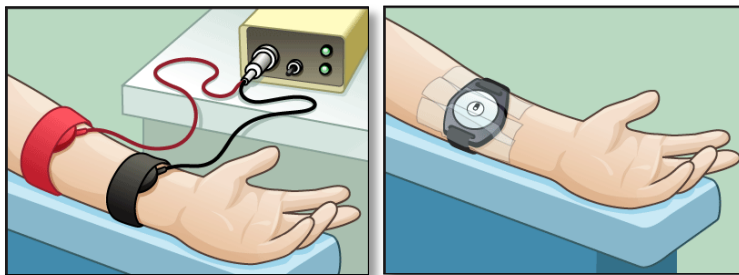


Figura 86 – Prova de suor Macroduct®. Adaptado de <http://alucinamedicina.wordpress.com>.

4. LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA

O estágio no laboratório de Imunologia no CHSJ decorreu de 4 a 29 de Junho de 2012 e teve como objetivo aprofundar os temas lecionados na unidade curricular de Imunologia Clínica num laboratório hospitalar.

O laboratório de Imunologia estuda patologias do foro imunológico, tais como doenças autoimunes, patologias alérgicas, imunodeficiências, doenças oncológicas e hematológicas. Encontra-se organizado de acordo com os métodos imunológicos nos laboratórios de autoimunidade, imunoalergologia, imunoquímica, marcadores tumorais e citometria de fluxo. A receção das amostras é efetuada no setor de separação, onde é feita a triagem, separação e distribuição das amostras para os diferentes laboratórios.

4.1. AUTOIMUNIDADE

As doenças autoimunes resultam da falha do mecanismo de auto-tolerância, ocorrendo uma resposta imunitária inapropriada a constituintes naturais do organismo. Estas patologias podem ser órgão-específicas, como a doença de Graves, tiroidite de hashimoto e diabetes *mellitus* tipo 1, ou sistémicas, tais como o lúpus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artrite reumatoide e escleroderma.

O laboratório de autoimunidade pesquisa a presença de autoanticorpos, em amostras de soro, usando ensaios de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA e imunoblotting. No entanto, apenas alguns testes são patognomónicos de determinadas doenças, pelo que são insuficientes para estabelecer um diagnóstico de doença autoimune sistémica e devem ser sempre interpretados no contexto clínico.

4.1.1. ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

O ensaio de IFI é baseado na ligação dos autoanticorpos presentes no soro diluído (1:100 e 1:1000) com os antígenos de células/tecidos imobilizados em lâminas. Após uma lavagem, que elimina todos os anticorpos não ligados, é efetuada a adição de um anticorpo secundário, conjugado com fluoresceína, que se liga ao imunocomplexo formado anteriormente (Figura 87).

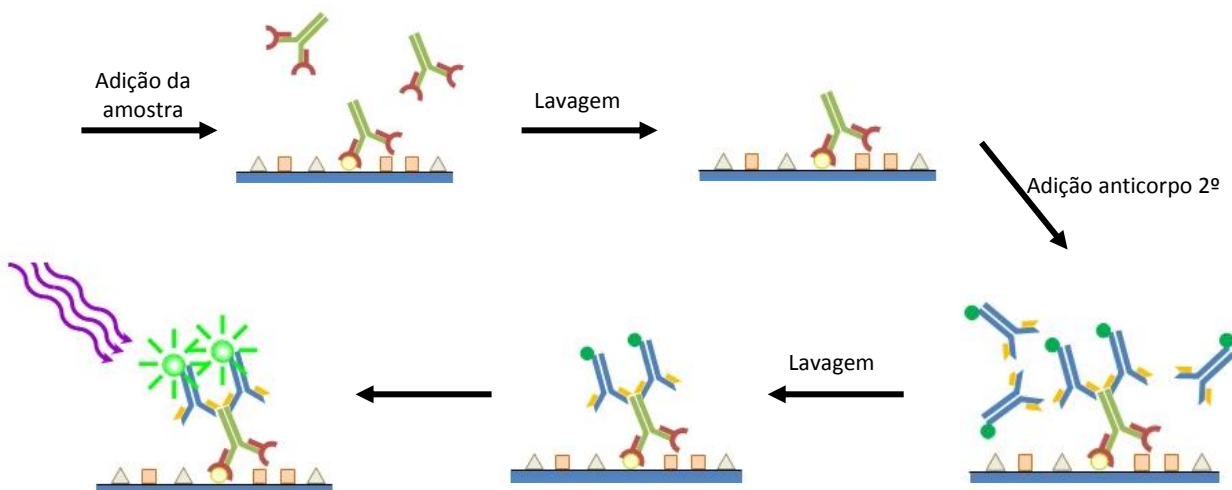


Figura 87 – Princípio do método de imunofluorescência indireta. Adaptado de <http://www.di.uq.edu.au/indirectif>.

A pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA) inclui a pesquisa de todos os anticorpos que podem ser visualizados por IFI em substrato de células HEp-2, linha celular de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano. Está indicada em doenças reumatológicas, sendo efetuada em lâminas comerciais com células HEp-2 e tecido hepático de primatas (Euroimmun #FA 1512). Conforme o local de ligação dos autoanticorpos, são expressos padrões de marcação que podem ser nucleares, nucleolares, citoplasmáticos, mitóticos ou mistos³⁶ que, por sua vez, são indicativos da patologia envolvida (Tabela 14)³⁷.

Tabela 14 – Padrões de Fluorescência de autoanticorpos e patologias associadas³⁶.

AA patterns	Disease association	Target organelle or antigen
Speckled	SLE, SSc, SjS, MCTD, SCLÉ, NLS,	Sm, RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, PCNA, RNAP II/III, Topo I
Homogeneous/difuse	SLE, DIL, SSc, AH	dsDNA, chromatin, Histone
Peripheral/rim	SLE, APS, AH	Nuclear envelope
Centromere	RP, lcSSc,	CENP-A, B, C
Mitotic apparatus	SLE, SjS	NuMA1, NuMA2 (HsEg5)
Nucleolar	dcSSc, SLE, PM, RP	PM/ScI, fibrillarín (U3-RNP), RNAP I/III, NOR-90 (hUBF)
Cytoplasmic	PM, DM, SLE, SjS, PBC, SSc	Ribosomes, mitochondria, Golgi complex, centrosomes, endosomes, GW bodies, SRP, Jo-1

AA – autoantibody; AH – autoimmune hepatitis; APS – anti-phospholipid syndrome; CENP – centromere protein; dcSS – diffuse cutaneous SSc; DIL – drug-induced lupus; DM – dermatomyositis; GW – glycine, tryptophan containing; hUBF; lcSSc – limited cutaneous SSc; MCTD – mixed connective tissue disease; NLS – neonatal lupus syndrome; NOR – nucleolar organizer; NuMA – nuclear mitotic apparatus; PBC – primary biliary cirrhosis; PCNA – proliferating cell nuclear antigen; PM – polymyositis; RNAP – RNA polymerase; RNP – ribonucleoprotein; RP – Raynaud's phenomenon; SCLÉ – subacute cutaneous lupus erythematosus; SjS – Sjögren syndrome; SLE – systemic lupus erythematosus; SRP – signal recognition particle; SSc – systemic sclerosis.

No caso de pedido de pesquisa de anticorpos antinucleares, anticorpos anti-mitochondriais (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA), anticorpos microssoma fígado e rim (LKM) e anticorpos anti-células parietais (APCA), o soro diluído a 1:40 é testado em

lâminas comerciais com três tecidos: hepático, renal e tecido de estômago de rato (DiaSorin, CT-3 Fluoro Kit ,#1740).

A determinação de APCA está indicada na gastrite atrófica crónica, anemia perniciosa e endocrinopatias autoimunes. Na cirrose biliar está indicada a pesquisa de AMA e LKM, estando estes últimos ainda relacionados em casos de hepatite autoimune e doenças reumáticas. Um resultado é considerado AMA positivo quando é detetada positividade no citoplasma dos três tecidos, e LKM positivo quando a marcação está confinada aos tecidos de fígado e rim. Entre o tecido de estômago e renal é possível detetar os anticorpos ASMA (actina).

O método de IFI é ainda utilizado na pesquisa de anticorpos anti-desmossoma e membrana basal epidérmica em esófago de macaco, indicado nas dermatoses autoimunes bolhosas, e anticorpos anti-ovário em ovários de macaca solicitados em casos de infertilidade.

4.1.2. ENSAIOS QUANTITATIVOS POR ELISA

Algumas das proteínas nucleares alvo dos autoanticorpos foram extraídas de células do timo, baço e de culturas de células, tendo sido denominadas de antigénios nucleares extraíveis (ENA). Nestes estão incluídos os anticorpos anti-SSA (anti-Ro), anti-SSB (anti-La), anti-ribonucleares (anti-RNP), anti-histonas, anti-Smith (anti-Sm), anti-topoisomerase I (Scl-70), anti-Jo1 e dsDNA. Os anticorpos contra os ENA são detetados por micro-ELISA quantitativa.

Nesta metodologia, os antigénios usados na deteção de anticorpos em soro ou plasma encontram-se a revestir os poços da microplaca. Após a adição da amostra ocorre ligação antigénio-anticorpo, formando imunocomplexos, aos quais se ligam posteriormente os anticorpos anti-humanos secundários, marcados com peroxidase. A deteção é efetuada após a adição do substrato cromogénio com formação de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos, obtendo-se os resultados em UI/mL. A quantificação é conseguida pela realização de uma reta de calibração, efetuada no equipamento *MagoPlus* (Diamed), já descrito em 2.3.12, e no equipamento *Triturus®* (Grifols).

Os ensaios de micro-ELISA são ainda efetuados para a deteção de anticorpos anti-cardiolipina (ACA) IgG e IgM e anticorpos anti- β 2-glicoproteína IgG e IgM, anticorpos anti-neutrófilos MPO e PR3 (MPO-ANCA e PR3-ANCA), anticorpos estimuladores dos recetores da TSH (TRab), anticorpos anti-complemento (CH₁₀₀), anticorpos anti-fator intrínseco e deteção de imunocomplexos circulantes.

4.1.3. ENSAIOS DE IMUNO*Blotting*

Os ensaios de imunoblot são efetuados tal como descrito em 2.3.13. Esta metodologia é efetuada na pesquisa de anticorpos anti-neuronais e diferenciação de anticorpos anti-mitocondriais e anti-ENA.

Os anticorpos dirigidos contra antígenos neuronais estão associados a sintomas neurológicos paraneoplásicos. A pesquisa dos anticorpos anti-Yo, anti-Hu e anti-Ri, anticorpos contra antígenos presentes no núcleo dos neurónios, é efetuada no soro diluído 50x, por imunoblot em tiras de nitrocelulose (Figura 88).

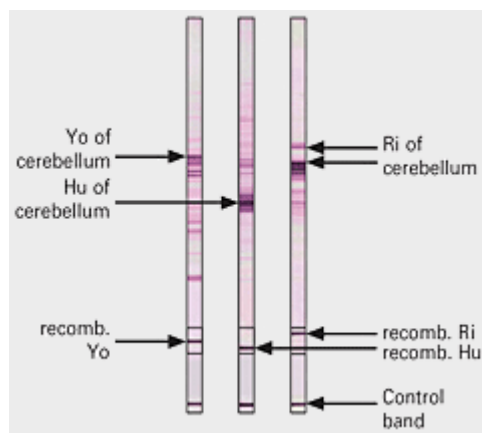


Figura 88 – Imunoblot para pesquisa de anticorpos anti-neuronais, com proteínas Yo, Hu e Ri extraídas do cerebelo de primatas e recombinantes. Adaptado de <http://www.euroimmun.com>.

Os anticorpos anti-mitocondriais estão implicados na cirrose biliar primária³⁸. São nove os anticorpos descritos, sendo os anticorpos anti-M2 (complexo piruvato desidrogenase), anti-M4 (sulfito oxidase) e anti-M9 (glicogénio fosforilase) descritos como relevantes clinicamente e associados a diferentes fases da doença. Na presença de AMA é efetuado o imunoblot, com o soro diluído 1:100, definindo o perfil AMA.

Finalmente, o ensaio de imunoblot é efetuado em casos de positividade para anticorpos anti-ENA, de forma a discriminar os anticorpos nRNP/Sm, Sm, SSa, SSb, Scl70 e Jo-1.

4.2. IMUNOALERGOLOGIA

As alergias resultam de uma resposta exagerada do sistema imunitário, ou seja, é uma reação de hipersensibilidade imunológica a um estímulo externo (alergénios). Resulta da produção aumentada de imunoglobulina IgE específica para alergénios e surge, geralmente, minutos após o contato.

A sintomatologia associada a alergias tais como sintomas gastrointestinais, asma ou sibilância, eczemas cutâneos e rinite, podem estar associados a causas não alérgicas. Por este motivo, é importante o diagnóstico laboratorial assegurando o tratamento mais adequado. É importante também perceber que a sensibilidade aos alergénios é variável ao longo da vida, podendo desaparecer ou tornar-se exacerbada.

4.2.1. DOSEAMENTO DE IgE, TOTAL E ESPECÍFICA

O laboratório de imunoalergologia efetua a determinação quantitativa de IgE total e IgE específicas a alergénios, no soro ou plasma, pelo imunoensaio immunoCAP, executadas no equipamento Phadia®250.

A fase sólida do imunoensaio para a determinação da IgE total consiste num derivado de celulose fechado numa cápsula que liga os alergénios de forma irreversível enquanto mantém a estrutura nativa. Após lavagem, são adicionados anticorpos anti-IgE marcados por uma enzima formando um complexo. Após incubação é feita nova lavagem, de forma a remover todo o anticorpo anti-IgE não ligado, 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 concentração de IgE na amostra de soro (Figura 89).

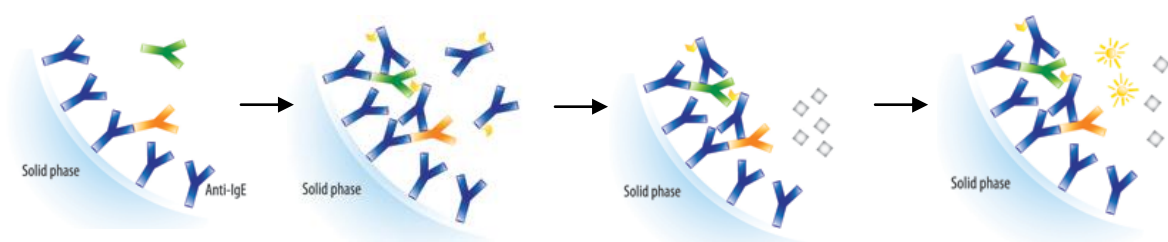


Figura 89 – Princípio do imunoensaio para a determinação de IgE total. Adaptado de <http://www.phadia.com>.

O doseamento de IgE específicas a alergénios é igualmente efetuado numa cápsula com a fase sólida de celulose, mas que neste caso possui alergénios específicos ligados covalentemente. Se o soro do doente possuir a IgE específica ocorre a ligação ao alergénio.

Após uma lavagem são adicionados anticorpos anti-IgE, marcados por uma enzima, que formam um imunocomplexo. O anti-IgE não ligado é removido por nova lavagem e o complexo formado incuba com o substrato. Finalmente, é medida a fluorescência que é diretamente proporcional à presença de IgE específico na amostra (Figura 90).

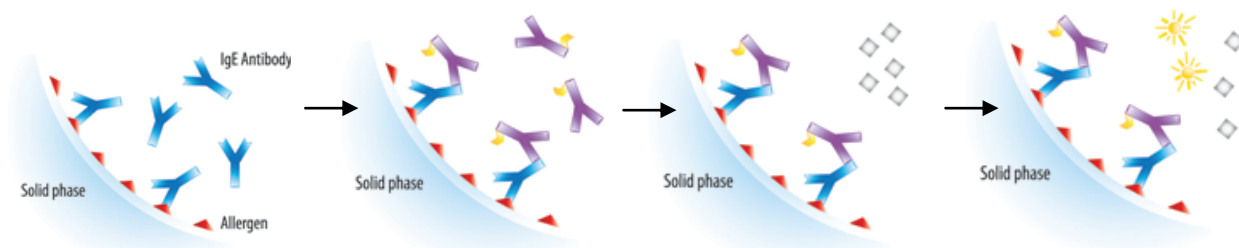


Figura 90 - Princípio do imunoenensaio para a determinação da IgE específica. Adaptado de <http://www.phadia.com>.

O teste immunoCAP IgE específico deteta anticorpos IgE específicos no intervalo de 0,1 a 100 kU_A /l, sendo A os anticorpos específicos dos alergénios. O resultado apresentado é quantitativo. Na prática clínica, o valor de *cut-off* normalmente considerado é 0,35 kUA /l.

4.2.2. DOSEAMENTO DE IgG ESPECÍFICO

O teste ImmunoCAP IgG específico mede os anticorpos IgG específicos de antigénios, em soro e plasma humano. Estes anticorpos fazem parte do sistema de defesa natural do organismo e desenvolvem-se em resposta ao contacto com substâncias estranhas. Na doença alérgica, o IgG específico é um marcador de exposição em diversas doenças pulmonares, tais como alveolite alérgica, aspergiloma e aspergilose.

O princípio do método para o doseamento de IgG é muito semelhante aos descritos anteriormente. Neste teste a fase sólida possui imobilizado o antigénio de interesse, que reage com os anticorpos IgG específicos na amostra do doente. Após lavagem é adicionado o conjugado que consiste em anticorpos marcados por uma enzima contra a IgG para formarem um complexo. A enzima-anti-IgG não ligada é lavada 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 IgG específicos na amostra.

4.2.3. DOSEAMENTO DE IgA ESPECÍFICO

O teste ImmunoCAP IgA específico mede os anticorpos IgA específicos de antígenos em soro e plasma humano. Os anticorpos IgA específicos fazem parte do sistema imunitário do organismo. Estão presentes nas secreções, como a saliva e mucosas, e no sangue. A presença de níveis elevados de anticorpos IgA específicos de antígenos alimentares no soro pode indicar uma exposição aumentada, causada por danos na mucosa intestinal.

O procedimento do teste é idêntico ao descrito para a determinação de IgG específica.

4.2.4. DOSEAMENTO DE TRIPTICASE

O imunoensaio immunoCAP triptase mede o nível de triptase libertado pelos mastócitos no soro. Os mastócitos desempenham um papel preponderante nas reações alérgicas e multiplicam-se em condições de inflamação. Quando ativados, libertam uma variedade de mediadores que conduzem aos sinais e sintomas de reações alérgicas, tais como anafilaxia. Estes mediadores incluem a triptase e a histamina. Um incremento transitório do nível de triptase na circulação após uma reação anafilática ajuda a identificar e avaliar o grau da reação. Um nível base persistentemente elevado de triptase indica a possibilidade de mastocitose.

O procedimento do teste baseia-se no já descrito, ocorrendo a reação da triptase da amostra com a anti-triptase covalentemente imobilizada na fase sólida. Após lavagem, são adicionados anticorpos anti-triptase marcados por uma enzima, formando um complexo. Após incubação, a enzima-anti-triptase não ligada é lavada 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 concentração de triptase na amostra de soro.

4.2.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CATIONICA EOSINÓFILA (ECP)

O ImmunoCAP ECP mede o nível de proteínas cationicas eosinófilas (ECP) no soro. Os eosinófilos são os principais responsáveis pela produção da inflamação associada à asma. Quando presentes nas vias respiratórias, são ativados e sofrem uma desgranulação que causa danos epiteliais nas vias respiratórias, o que pode conduzir a uma doença inflamatória crónica.

Os doentes asmáticos com inflamação eosinofílica apresentam níveis elevados de ECP no soro e noutros fluidos corporais, tais como no fluido alveolar bronquial e secreções brônquicas.

O princípio do teste é idêntico ao anterior, existindo imobilizados na fase sólida anticorpos anti-ECP.

4.2.6. DOSEAMENTO DE ANTICORPOS

O doseamento de anticorpos é efetuado pelo imunoensaio enzimático ELIA™, usando o equipamento automático Phadia®250. Os anticorpos determinados por este método incluem os anticorpos IgA anti-gliadina e anti-transglutaminase (tTG), e os anticorpos IgG anti-péptido citrulinado cíclico (CCP) e anti-membrana basal glomerular (GBM).

A determinação de anticorpos anti-gliadina e anti-tTG são importantes na doença celíaca, caracterizada pela intolerância ao glúten. Nas crianças o diagnóstico precoce da doença é crucial para que não ocorra atraso no crescimento. O tratamento consiste numa dieta sem glúten (trigo, cevada e centeio).

Os anticorpos anti-CCP são importantes no diagnóstico da artrite reumatoide³⁹, doença autoimune do foro reumatológico que afeta as articulações, e o anticorpo anti-GBM é usado no diagnóstico do Síndrome de Goodpasture⁴⁰.

4.2.7. ALERGOLOGIA MOLECULAR

A partir de uma fonte alérgica é possível separar os componentes alérgicos, determinando a sensibilidade específica a cada componente de forma independente e identificar componentes comuns entre fontes alérgicas, responsáveis por reações cruzadas (Figura 91).

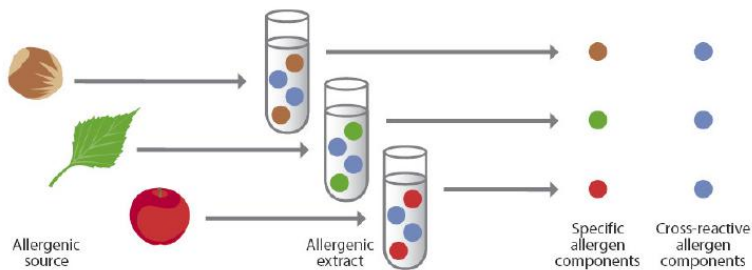


Figura 91 – Imunoalergologia molecular. Adaptado de <http://www.phadia.com>.

O procedimento é efetuado com o imunoensaio immunoCAP ISAC®, num *microarray* que possui 103 componentes moleculares dos alérgenos, de 47 fontes alérgicas diferentes, imobilizados numa lâmina. A amostra incuba no *microarray* e, após uma lavagem, é efetuada a incubação com o anticorpo secundário. As imagens são lidas num leitor próprio e os resultados obtidos em ISU, ISAC *standard unit* (Figura 92). Valores inferiores a 0,3 ISU são indetetáveis, até 0,9 ISU são considerados baixos, sendo moderados a altos até 14,9. Acima de 15,0 ISU são valores muito altos.

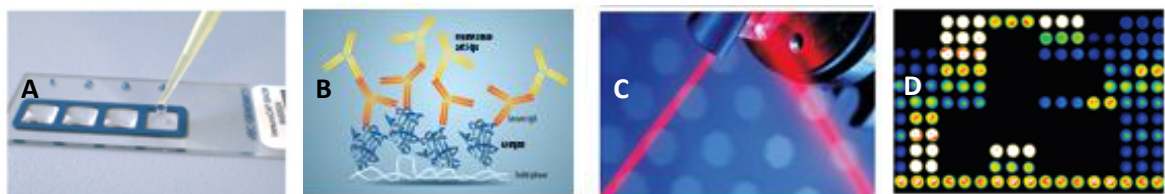


Figura 92 – Esquema representativo do imunoensaio immunoCAP ISAC®: A) Incubação da amostra no microarray, B) Marcação com anticorpo secundário, C) Leitura do *microarray*, e D) Análise da imagem. Adaptado de <http://www.phadia.com>.

O desenvolvimento e progresso conseguidos no campo do diagnóstico das alergias permitiram o aparecimento de um novo conceito, a alergologia molecular, que possibilita a identificação de componentes proteicos individuais. A mais importante utilidade clínica deste novo conceito é a capacidade de revelar se a sensibilização é de natureza genuína ou devida a uma reação cruzada a proteínas com estruturas proteicas semelhantes. Com este conhecimento é possível avaliar o risco de reação à exposição a diferentes fontes alérgicas⁴¹.

4.3. IMUNOQUÍMICA

O laboratório de Imunologia efetua a determinação quantitativa de proteínas por imunonefelometria, eletroforese de proteínas plasmáticas e ensaios de imunofixação de proteínas séricas.

4.3.1. IMUNONEFELOMETRIA

As proteínas contidas nos fluídos corporais humanos formam complexos imunitários numa reação imunoquímica com anticorpos específicos. A intensidade de luz difundida é proporcional à concentração da proteína na amostra. O resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida. As proteínas determinadas por nefelometria (DimensionVista, Siemens) incluem a albumina e pré-albumina, α 1-antitripsina, α 1-microglobulina, α 2-macroglobulina, β 2-microglobulina, proteína C reativa, cistatina C, complemento C3 e C4, haptoglobina, imunoglobulinas IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM, cadeias leves kappa lambda, retinol, recetor da transferrina solúvel e fator reumatoide.

4.3.2. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS

A determinação do perfil eletroforético das proteínas no soro permite a obtenção do proteinograma (Figura 93). Estão descritos perfis eletroforéticos típicos de determinadas situações clínicas, tais como hemopatias, inflamação, cirrose e distúrbios imunológicos.

No laboratório de Imunologia, o perfil eletroforético é efetuado por eletroforese capilar, a pH básico, com o sistema MINICAP, Sebia. A este pH todas as proteínas possuem carga negativa migrando para o pólo positivo. A separação proteica de elevada voltagem e deteção a 200 nm permite a separação das proteínas em seis zonas de migração: albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta 2 e gamaglobulinas. A albumina possui o maior número de cargas negativas e menor peso molecular, pelo que é a proteína que migra mais rápido, sendo separada em primeiro lugar. As globulinas com maior peso molecular movem-se de acordo com a carga, a menor velocidade. Desta forma, a albumina é seguida das frações α 1, α 2, β 1, β 2 e γ -globulinas. As γ -globulinas movem-se tão lentamente que praticamente permanecem no ponto de aplicação.

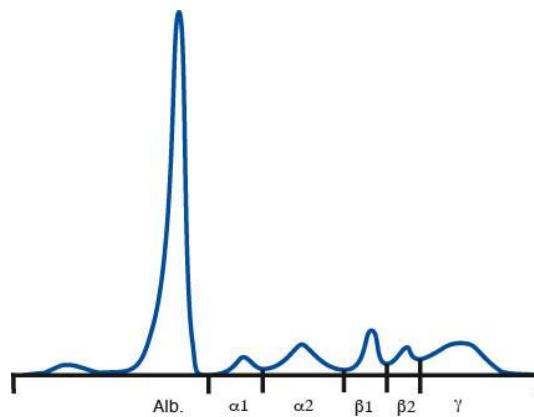


Figura 93 – Esquema representativo do perfil eletroforético proteico normal.

4.3.3. IMUNOFIXAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS

A imunofixação combina as técnicas de eletroforese e imunoprecipitação. Inicia-se pela separação eletroforética seguida da associação de anti-soros, anti-IgA, -IgG, -IgM e anti-cadeias leves kappa e lambda, sobre as frações separadas. Após lavagem, o imunoprecipitado é corado (Figura 94).

Este método é usado na caracterização de cadeias monoclonais de paraproteínas envolvidas em gamopatias, detetando quantidades de proteínas não medidas na eletroforese de proteínas. Os resultados anormais podem ser devido a mieloma múltiplo, gamopatias monoclonais de significado incerto, leucemia, linfoma, amiloidose, macroglobulinemia de Waldenstrom e outras neoplasias.

O laboratório de Imunologia utiliza o equipamento semi-automático HYDRASYS, que efetua uma eletroforese em gel de agarose com posterior imunofixação e coloração com violeta ácido.

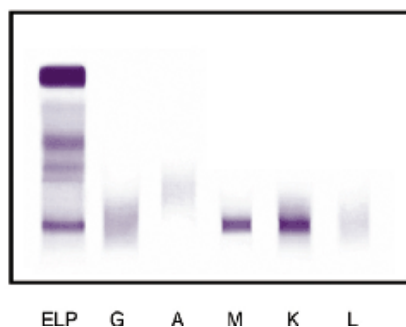


Figura 94 – Exemplo de um resultado de Imunofixação, sendo ELP - electroforese das proteínas séricas, G – IgG, A – IgA, M – IgM, K – cadeias kappa e L – cadeias lambda.

4.3.4. PESQUISA DE MARCADORES TUMORAIS

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, sangue periférico e outros líquidos biológicos, cujo aparecimento ou alteração na concentração é indicativa do aparecimento de células neoplásicas (Figura 95). Podem ser proteínas ou fragmentos de proteínas, citoplasmáticas ou antigénios de superfície, hormonas e enzimas.

O laboratório efetua a determinação de marcadores tumorais em amostras de soro, por quimioluminescência (CMIA) no equipamento Architect, descrito em 2.3.7. e electroquimioluminescência (ECL) no equipamento Cobas e411, descrito em 3.7.1. Por CMIA são efetuados ensaios para a determinação da concentração de alfafetoproteína (AFP), níveis hormonais, tais como a hormona estimuladora da tiróide (TSH), triiodotironina (T3), tiroxina (T4), frações livres FT3 e FT4, e os anticorpos anti-tiroideus, tais como anticorpos anti-tiroglobulina, anti-tireoperoxidase e anti-recetor de TSH. Por ECL é feita a pesquisa de antigénios cancerígenos 125 (CA125II, CA15-3, CA 19-9, CA 72-4), antigénio carcinoembriogénico (CEA), antigénio prostático específico (PSA) livre, PSA total, enolase específica neuronal (NSE) e antigénio S-100.

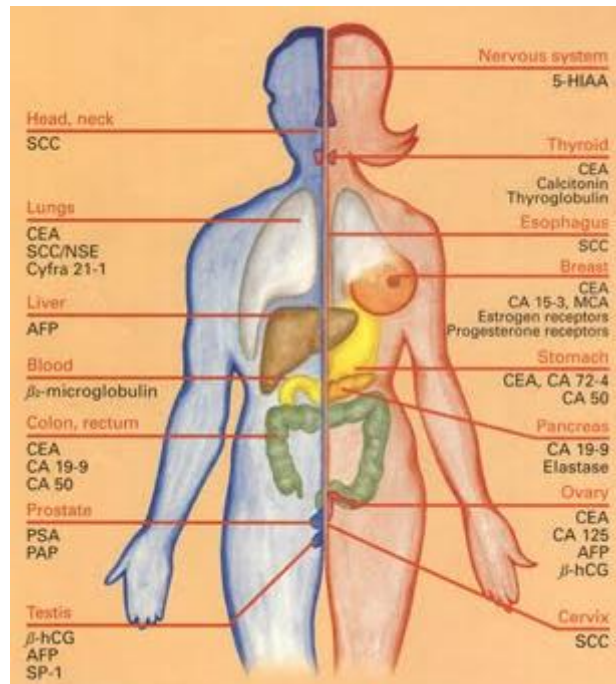


Figura 95 – Associação Clínica de alguns marcadores tumorais. Adaptado de <http://humanahealthcare>.

4.4. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma metodologia que permite identificar e contar células marcadas em suspensão. O laboratório de Imunologia executa esta técnica em inúmeras aplicações, tais como contagem das células CD34+ após mobilização de doentes para autotransplante⁴², contagens de leucócitos em unidades de componentes sanguíneos após desleucocitação⁴³, contagem das populações linfocitárias em doentes imunodeprimidos (Figura 96) e imunofenotipagem⁴⁴. Para isso, dispõe de dois citómetros de fluxo FACSCanto™ II, com carrossel de amostras acoplado.

As aplicações efetuadas implicam a marcação múltipla, ou seja, com diferentes fluorocromos no mesmo tubo de análise. Devido à sobreposição espectral intrínseca de alguns fluorocromos, é necessário executar uma compensação electrónica, de forma que a deteção da fluorescência de determinado fluorocromo seja efetuada apenas no detetor correto. Por este motivo, no início do dia de trabalho é efetuada a calibração dos citómetros com as microesferas CST, *Cytometer Setup & Tracking*.

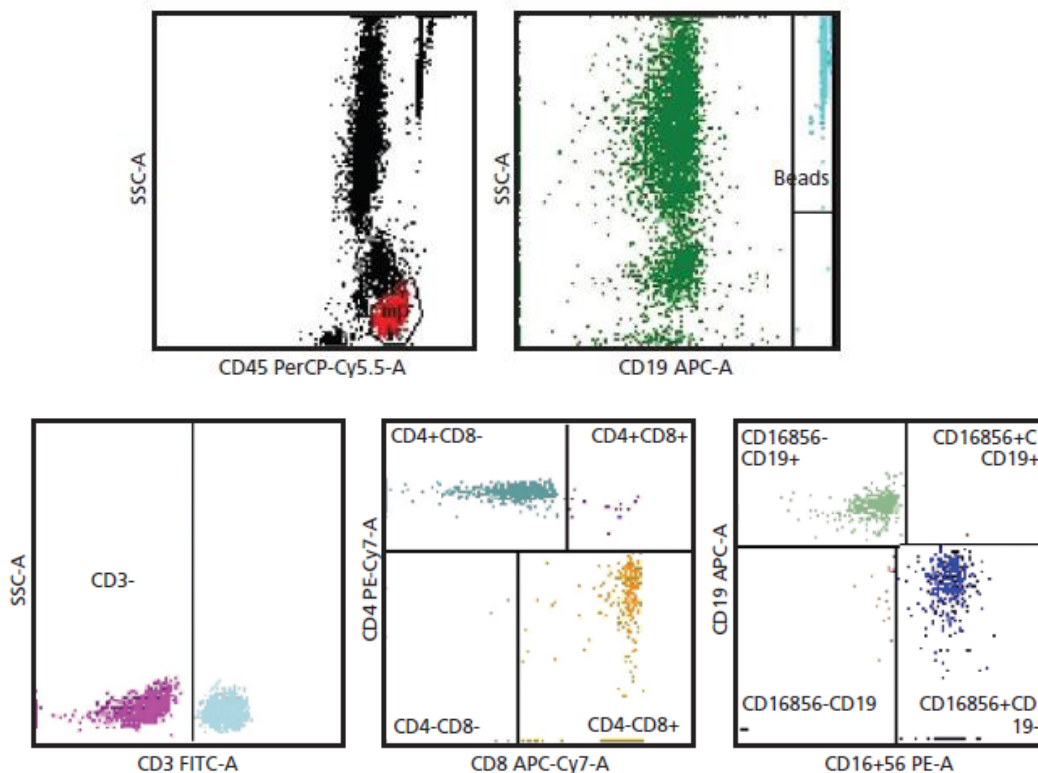


Figura 96 – Contagem absoluta das populações linfocitárias, BD Multitest™.

Os protocolos diferem consoante se pretende a marcação de antigénios de superfície ou intracelulares. Para a marcação de antigénios de superfície é efetuada uma incubação inicial de 15 minutos de amostra com os anticorpos monoclonais, protegendo da luz. Após incubação é adicionada a solução lisante, que incuba 15 minutos. Seguidamente podem ser efetuadas lavagens com tampão (FacsFlow), protocolo *lyse-wash*, ou ler de imediato, protocolo *lyse-no-wash*. O protocolo sem lavagens aplica-se a amostras em que se pretende uma contagem absoluta ou amostras com baixa celularidade, para que não ocorra perda de células. Pelo contrário, em amostras com elevada celularidade aplica-se o protocolo com duas lavagens, centrifugando 5 minutos a 1500 rpm.

No caso da marcação de estruturas intracelulares, como é o caso das cadeias leves kappa e lambda citoplasmáticas, é necessário efetuar a fixação e permeabilização das células (Fix & Perm, Invitrogen). No caso da marcação simultânea de antigénios de superfície e intracelulares, a marcação dos antigénios de superfície deve ser efetuada previamente ao protocolo de fixação e permeabilização. Desta forma, inicia-se pela incubação de 15 minutos dos anticorpos monoclonais, dirigidos contra antigénios de superfície, com a amostra a testar. Adiciona-se a solução fixadora que incuba 15 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem com 3 mL de tampão FacsFlow, que centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, o tubo é decantado e é adicionada a solução de permeabilização e os anticorpos monoclonais dirigidos contra os antigénios intracelulares. A mistura é agitada em *vórtex* e efetuada uma incubação durante 20 minutos. Após incubação, é feita uma lavagem e as células ressuspendidas para que possam ser analisadas no citómetro de fluxo.

A citometria de fluxo é uma metodologia revolucionária no diagnóstico, nomeadamente na área da hematologia, com uma panóplia de aplicações em que os limites são os anticorpos monoclonais desenvolvidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Tsuda I, Hino M, Takubo T, Katagami T, Kubota H, Kawai S, Tatsumi N. First basic performance evaluation of the XE-2100 haematology analyser. *J Autom Methods Manag Chem* 1999; 21 (4): 127–133.
- ² Walters J, Garrity P. Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. *Lab Hematol* 2000; 6: 83-92.
- ³ Perné A, Hainfellner JA, Womastek I, Haushofer A, Szekeres T, Schwarzingler I. Performance evaluation of the Sysmex XE-5000 hematology analyzer for white blood cell analysis in cerebrospinal fluid. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(2): 194-198.
- ⁴ Lehner J, Greve B, Cassens U. Automation in Hematology. *Transfus Med Hemother* 2007; 34: 328–339.
- ⁵ Paris A, Nhan T, Cornet E, Perol JP, Malet M, Troussard X. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2010; 32 (5): 539-547.
- ⁶ Herbert ME. Measuring white blood cells in the stools is useful in the management of acute diarrhea. *West J Med.* 2000; 172(6): 414.
- ⁷ Curvers J, Kooren J, Laan M, Van Lierop E, van de Kerkhof D, Scharnhorst V, Herruer M. Evaluation of the Ves-Matic Cube 200 erythrocyte sedimentation method: comparison with Westergren-based methods. *Am J Clin Pathol* 2010; 134 (4): 653-60.
- ⁸ Ibrahim H, Ismail AH, Ismail SB, Bebakar WM. The use of HbA1C in the diagnosis of diabetes mellitus type 2 in high risk subjects. *Int J Diabetes & Metab* 2010; 18: 25-28.
- ⁹ Huang TH, Liu YC, Tu HZ, Sy CL, Chen YS and Chen BC. Rapid Purity Check Method for Susceptibility Testing of *M. tuberculosis* Complex with the MGIT 960 System. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37 (4): 323-329.
- ¹⁰ Erjavec Z and Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Updat* 2002; 5: 3-10.
- ¹¹ Meador VP, Hagemoser WA, Deyoe BL. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am J Vet Res* 1988; 49: 274–280.
- ¹² Nicoletti P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1980;24:69–98.
- ¹³ Ariza J, Pellicer T, Pallare´s R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 131-140.
- ¹⁴ Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *Journal of Infection* 2004; 49: 102–108.
- ¹⁵ Lam Q, Black M, Youdell O, Spilsbury H, Schneider HG. Performance Evaluation and Subsequent Clinical Experience with the Abbott Automated Architect STAT Troponin-I Assay. *Clin Chem* 2006; 52 (2): 298-300.
- ¹⁶ Manoni F, Tinello A, Fornasiero L, Hoffer P, Temporin V, Valverde S, Gessoni G. Urine particle evaluation: a comparison between the UF-1000i and quantitative microscopy. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (8): 1107-1711.
- ¹⁷ Broeren MAC, Bahçeci S, Vader HL, Arents NLA. Screening for Urinary Tract Infection with the Sysmex UF-1000i Urine Flow Cytometer. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (3): 1025–1029.
- ¹⁸ Wang J, Zhang Y, Xu DW, Shao WJ, Lu Y. Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 577-582.
- ¹⁹ Beselt RC. Urine drug screening by immunoassay: Interpretation of results. In: Beselt RC, ed. *Advances in analytical toxicology*. Foster City, CA: Biomedical Publications 1984; 1: 81-123.
- ²⁰ Bravo EL, Tarazi RC, Gifford RW, Stewart BH. Circulating and urinary catecholamines in pheochromocytoma. Diagnostic and pathophysiologic implications. *N Engl J Med* 1979; 301: 682-686.

-
- ²¹ Lenders JW, Keiser HR, Goldstein DS, Willemsen JJ, Friberg P, Jacobs MC, Kloppenborg PW, Thien T, Eisenhofer G. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 1995; 123 (2): 101-119.
- ²² Alla Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Michael A, Nardi MA. HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. *Clin Chem* 2004; 50 (10): 1736–1747.
- ²³ Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* 2012; 86 (4): 521-534.
- ²⁴ Di Martino G, Matera MG, De Martino B, Vacca C, Di Martino S, Rossi F. Relationship between zinc and obesity. *J Med* 1993; 24 (2-3): 177-183.
- ²⁵ Mantzoros CS, Prasad AS, Beck FWJ, Grabowski S, Kaplan J, Adair C, Brewer GJ. Zinc May Regulate Serum Leptin Concentrations in Humans. *J Am Coll Nutr* June 1998; 17 (3): 3 270-275.
- ²⁶ Schuchter K, Hafner E, Strangl G, Metzenbaeur M, Hofinger D and Philipp K. The first trimester combined test for the detection of Down syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies. *Prenat Diagn* 2002; 22: 211-215.
- ²⁷ Spencer K, Cowans NJ, Avgidou K, Nicolaidis KH. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of impending fetal death. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 28 (5): 637-643.
- ²⁸ Cowans NJ, Stamatopoulou A, Hellström J, Mäkelä MM, Spencer K. PAPP-A and free ss-hCG stability in first trimester serum using PerkinElmer AutoDELFIA and DELFIA Xpress systems. *Prenat Diagn* 2010; 30 (2): 127-132.
- ²⁹ Cuckle H, Sehmi I. Calculating correct Down's syndrome risks. *Brit J Obstet Gynaec* 1999; 1106: 371-372.
- ³⁰ Rosalba Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem* 2009; 42 (12): 1205-1217.
- ³¹ Williams GH, Cain JP, Dluhy RG, Underwood RH. Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal man. I. Response to posture, acute and chronic volume depletion, and sodium loading. *J Clin Invest* 1972; 51 (7): 1731-1742.
- ³² Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245 (4922): 1073-1080.
- ³³ Mastella G, Di Cesare G, Borruso A, Menin L, Zanolla L. Reliability of sweat-testing by the Macroduct collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson and Cooke technique. *Acta Paediatr* 2000; 89 (8): 933-937.
- ³⁴ Rowe SM, Accurso F, Clancy JP. Detection of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activity in Early-Phase Clinical Trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4 (4): 387-398.
- ³⁵ Davis PB, Schluchter MD, Konstan MW. Relation of sweat chloride concentration to severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38(3): 204-209.
- ³⁶ Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010; 35 (3): 276–290.
- ³⁷ Salamunić I. Laboratory diagnosis of autoimmune diseases – new technologies, old dilemmas *Biochemia Medica* 2010; 20(1):45-56.
- ³⁸ Zhang FK, Jia JD, Wang BE. Clinical evaluation of serum antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3(2): 288-291.
- ³⁹ Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005 Jun;1050:295-303.

-
- ⁴⁰ Villalta D, Tonutti E, Tampoia M, Bizzaro N, Papisch W, Tozzoli R, Stella S. Analytical and diagnostic accuracy of the EliA™ automated enzyme fluoroimmunoassay for antineutrophil cytoplasmic autoantibody detection. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(10):1161–1167.
- ⁴¹ Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 2010:1–19.
- ⁴² Leuner S, Arland M, Kahl C, Jentsch-Ullrich K, Franke A, Höffkes H-G. Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (7): 699-706.
- ⁴³ Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Transfus Clin Biol.* 2001; 8(3): 297-302
- ⁴⁴ Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for Immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000; 243:77–97.