

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FÁRMACIA



## **RELATORIO DE ESTÁGIO**

**Catarina Carapucinha Cabeçadas**

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**2011**

Relatório e monografia apresentados à Faculdade  
de Farmácia da Universidade de Lisboa para  
candidatura ao grau de Mestre

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO  
INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA FRANCISCO GENTIL**

**ORIENTAÇÃO:**

Dr.<sup>a</sup> Maria Cesaltina Lourenço

Dr.<sup>a</sup> Cidália Vieira

Dr.<sup>a</sup> Carmo Ornelas

*Catarina Carapucinha Cabeçadas*

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2011**

## **RESUMO**

O Estágio profissional em Análises Clínicas é parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio consistiu num período de trabalho nos laboratórios inseridos no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia (IPO) nas áreas de Bioquímica, Imunologia e Virologia; o estágio na valência de Microbiologia foi feito no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira.

O presente relatório tem como objectivo transmitir a experiência adquirida durante o estágio nas várias valências laboratoriais de análises clínicas. O relatório encontra-se dividido por valências, fazendo referência aos equipamentos e métodos utilizados na execução das várias análises, ao interesse clínico da determinação de cada analito, eventuais interferentes bem como ao controlo de qualidade implementado em cada valência.

## **ABSTRACT**

The professional training in Clinical Analysis is integrated in plan of studies of the Masters Course in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon. The internship consisted of a period of work in the laboratories inserted in the Service of Clinical Pathology of the Instituto Português de Oncologia (IPO) in the areas of Clinical Biochemistry, Immunology and Virology; the internship at area of Microbiology was done in the laboratory of microbiology at the Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira. The purpose of this report is to transmit the experience gained during the internship in various laboratory areas of clinical analysis. The report is divided into the internship areas, making reference to the equipment and methods used in the execution of the various analyses, the clinical interest of each analyte determination, possible interferences as well as the quality control implemented in each area.

## ÍNDICE

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| INTRODUÇÃO AO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA FRANCISCO GENTIL ..... | 1   |
| 1. PRÉ-ANALÍTICA .....                                                | 2   |
| 1.1. Colheita.....                                                    | 2   |
| 1.2. Preparação das amostras .....                                    | 5   |
| 2. BIOQUÍMICA CLÍNICA .....                                           | 7   |
| 2.1. Objectivo.....                                                   | 7   |
| 2.2. Introdução .....                                                 | 7   |
| 2.3. Métodos .....                                                    | 7   |
| 2.4. Interesse Clínico.....                                           | 16  |
| 2.5. Calibração .....                                                 | 35  |
| 3. IMUNOLOGIA.....                                                    | 36  |
| 3.1. Objectivo.....                                                   | 36  |
| 3.2. Introdução .....                                                 | 36  |
| 3.1. Sector de Imunoquímica .....                                     | 36  |
| 3.2. Serologia .....                                                  | 53  |
| 3.3. Sector dos Marcadores tumorais .....                             | 62  |
| 3.4. Sector da Autoimunidade.....                                     | 64  |
| 4. VIROLOGIA .....                                                    | 70  |
| 4.1. Objectivo.....                                                   | 70  |
| 4.2. Introdução .....                                                 | 70  |
| 4.3. Herpesvírus .....                                                | 70  |
| 4.4. Hepadnavírus.....                                                | 74  |
| 4.5. Flavivírus .....                                                 | 76  |
| 4.6. Retrovírus.....                                                  | 77  |
| 4.7. Papilomavírus.....                                               | 78  |
| 4.8. Detecção Directa e Indirecta dos Agentes Virais.....             | 80  |
| 5. CONTROLO DE QUALIDADE.....                                         | 93  |
| 5.1. Controlo de qualidade interno.....                               | 93  |
| 5.2. Avaliação externa da qualidade.....                              | 109 |
| INTRODUÇÃO À CLÍNICA DE DIAGNÓSTICOS DR. FERNANDO TEIXEIRA.....       | 116 |
| 6. MICROBIOLOGIA .....                                                | 117 |

|      |                                    |     |
|------|------------------------------------|-----|
| 6.1. | Objectivo.....                     | 117 |
| 6.2. | Introdução .....                   | 117 |
| 6.3. | Laboratório de Microbiologia ..... | 118 |
| 6.4. | Produtos Biológicos.....           | 130 |
| 6.5. | Controlo de qualidade.....         | 186 |
| 7.   | CONCLUSÃO .....                    | 195 |
|      | BIBLIOGRAFIA .....                 | 196 |

## **INTRODUÇÃO AO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA FRANCISCO GENTIL**

O Instituto Português de Oncologia (IPO) foi fundado em 19 de Dezembro de 1923, com a designação de Instituto Português para o Estudo do Cancro. O instituto foi criado de acordo com vários objectivos, entre eles: organizar a luta contra o cancro, praticar o estudo do cancro, promovendo pesquisas científicas e divulgando conhecimentos e preceitos úteis ao público.

O projecto teve como principal mentor o director do instituto até 1961, o Prof. Francisco Gentil que cedo percebeu que o estudo do cancro e uma assistência atenta, personalizada de elevada qualidade aos doentes oncológicos, exigia uma organização dependente, tal como acontecia noutros países.

O Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil (IPOLFG) é a actual designação, sendo hoje uma unidade hospitalar distribuída por vários edifícios.

Actualmente, o IPO divide a sua actividade entre a investigação, ensino, prevenção, diagnóstico, tratamento e reabilitação no domínio da oncologia. O instituto dispõe dos meios de diagnóstico e terapêutica adequados ao cumprimento da sua missão, tanto nas áreas laboratoriais e de medicina nuclear, como nas terapêuticas cirúrgicas, médicas e pela radiação.

Os laboratórios, onde foi realizado o estágio nas diferentes valências, encontram-se inseridos no Serviço de Patologia Clínica (SPC), coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Margarida Silveira e, que por sua vez, se encontra incluído no Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO. O SPC engloba 5 laboratórios, cada um supervisionado por um responsável de laboratório, e 3 áreas de suporte. Os laboratórios são: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia, Virologia; As áreas de suporte são: Gestão de Qualidade, dirigida pelo responsável de qualidade, responsável pela coordenação do sistema de gestão de qualidade dos diferentes laboratórios; área de Urgência que assegura o atendimento dos doentes 24 horas por dia, 365 dias por ano; e Central de Colheitas, que é responsável pela sequência de actividades pré-analíticas, como sendo a colheita e a triagem de amostras.

O estágio descrito no presente relatório foi realizado nos laboratórios de Bioquímica, Imunologia e Virologia do SPC do IPO.

## 1. PRÉ-ANALÍTICA

Nas análises clínicas a fase pré-analítica é de grande importância por ser a etapa onde ocorrem a maior parte dos erros e por isso há que detectá-los a fim de evitar que se repitam. Os erros podem ter origem na solicitação da análise e na colheita. De seguida encontram-se alguns erros/critérios de rejeição:

- Identificação errada do paciente, troca de amostras;
- Amostra rejeitada (o paciente não respeitou os requisitos da análise ou a amostra colhida não é representativa);
- Uso de anticoagulante errado;
- Volume de amostra inadequado;
- Hemólise e lipémias intensas, estase prolongada;
- Transporte e armazenamento da amostra incorrecto;
- Contaminação de tubo, frascos e tampas;
- Amostra destruída/extraviada;
- Tubo partido na centrifugação;
- Colheita em falta.

### 1.1. Colheita

A colheita de amostras é uma das etapas mais importantes no âmbito das análises clínicas pois afecta a qualidade e credibilidade dos resultados. Tanto a competência do laboratório como a satisfação dos pacientes dependem muito da forma como a colheita é feita.

#### 1.1.1. Colheita de sangue

O sangue é o produto mais usado para análise. A maior parte dos analitos de interesse da bioquímica, por exemplo, encontram-se no plasma. Logo, a preparação do sangue para análise consiste em remover a porção que contém as células, o que é possível através da centrifugação.

Antes de dar início ao trabalho e entre cada colheita, o técnico deverá verificar se a sala está em boas condições e se tem disponível o material necessário. Posteriormente, deverá proceder à higienização das mãos, com água e sabão ou solução alcoólica a 70° ou colocar luvas novas. Depois de colocado o garrote deve-se seleccionar a zona da punção, segundo os seguintes critérios:

- Seleccionar uma veia que seja facilmente palpável;
- Não seleccionar o braço do lado de uma mastectomia;
- Nunca puncionar uma fístula;
- Não seleccionar um local do braço onde o doente foi submetido a uma infusão intravenosa;
- Não seleccionar um local com hematoma, edema ou contusão;
- Não seleccionar um local com múltiplas punções.

Após desinfectar o local da punção com álcool a 70° e com o garrote colocado, introduzir a agulha suave e rapidamente num ângulo de 15 a 45°, no centro da veia 1-1,5 cm ao longo da veia. Assim que o sangue começa a fluir no tubo da *butterfly* ou na seringa, pedir ao doente para abrir a mão. No caso de sistema *butterfly*, ajustar os tubos ao adaptador até ficarem cheios. Retirar o garrote o quanto antes. Ao retirar a agulha da veia colocar uma compressa embebida em álcool a 70° na zona puncionada. Colocar a agulha ou a *butterfly* num contentor de perfurantes, tipo IV. Em caso de colheita com agulha e seringa distribuir o sangue pelos tubos, evitando a hemólise, e colocar a seringa num contentor tipo III.

Nas colheitas em crianças, o técnico deve ser auxiliado por outro profissional, para minorar quaisquer dificuldades na colheita, nomeadamente na imobilização do braço da criança. O acompanhante deve assegurar a imobilização das pernas.

#### 1.1.2. Colheita de urina

A colheita de urina é relativamente fácil de executar pelo próprio paciente, a não ser em casos especiais como bebés ou acamados, em que são usados sacos colectores.

Na seguinte tabela encontram-se os diferentes tipos de urina, colheita e qual o objectivo da sua colheita. A urina asséptica não se encontra descrita por pertencer à valência de microbiologia (capítulo 6).

Tabela 1-1 – Tipos de urina analisados na Bioquímica, colheita e objectivos da sua colheita.

| Tipo de urina                           | Colheita                                                                                                                                                                                                    | Para que serve                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primeira urina da manhã (urina tipo II) | Primeira urina da manhã, colhida para frasco apropriado.                                                                                                                                                    | Urina concentrada que contém os metabolitos acumulados durante a noite Assegura um maior tempo da urina na bexiga sem variações diárias devido a alimentação e actividade física. Útil para detecção de proteínas e analitos pouco comuns. |
| Urina aleatória                         | Urina colhida a qualquer hora do dia para frasco apropriado.                                                                                                                                                | Útil para testes de diagnóstico de rotina.                                                                                                                                                                                                 |
| Urina temporizada                       | Rejeitar toda a 1. <sup>a</sup> urina da manhã e anotar a hora desta micção. Recolher em frasco apropriado, toda a urina, por exemplo, das 3 horas seguintes. O tempo depende do tipo de analito em estudo. | Para amostra representativa de um analito.                                                                                                                                                                                                 |
| Urina de 24 horas                       | Rejeitar toda a 1. <sup>a</sup> urina da manhã e anotar a hora desta micção. Recolher em frasco apropriado, toda a urina das 24 horas seguintes.                                                            | Semelhante à anterior. Usada para analitos cuja taxa de excreção possa variar durante as 24 h.                                                                                                                                             |

### 1.1.3. Colheita de outros líquidos biológicos

Líquidos como o líquido amniótico, sinovial, peritoneal, pleural céfalorraquidiano, entre outros, são solicitados para a análise de alguns analitos em especial. A sua colheita é, normalmente, feita por médicos, por ser mais exigente.

## 1.2. Preparação das amostras

Os vários tipos de amostra são recebidos na secção pré-analítica do serviço de Patologia Clínica do IPO e, a partir daí, são encaminhados para a central automática ou para os vários laboratórios. Na seguinte tabela encontram-se as várias etapas e acções realizadas na secção pré-analítica.

Tabela 1-2 – Etapas e acções da fase pré-analítica.

| Etapa                                                                    | Acções                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Avaliação de critérios de aceitação/rejeição de amostras                 | Avaliar a amostra de forma a verificar se cumpre os critérios de aceitação. Caso se verifique um dos critérios de rejeição (acima descritos), a amostra é dada como "falta de produto" no sistema informático, de maneira a solicitar nova colheita. |
| Entrada do produto                                                       | A entrada de produtos é efectuada no sistema informático, através do código de barras do produto. Após entrada os produtos são centrifugados e/ou colocados nos respectivos suportes.                                                                |
| Centrifugação de produtos (se aplicável)                                 | Os tubos de gel seco são centrifugados a 3500 rpm, 10 minutos após formação completa do coágulo. Os tubos com citrato de sódio (tubo de coagulação) são centrifugados, a 3500 rpm, 10 minutos em centrífuga refrigerada.                             |
| Rejeição após centrifugação                                              | As amostras hemolisadas são analisadas tendo em conta o grau de hemólise apresentado e dos parâmetros a efectuar.                                                                                                                                    |
| Orientação das amostras para os diferentes laboratórios                  | As amostras destinadas à central automática são colocadas nos suportes dos equipamentos. As amostras destinadas aos vários laboratórios são colocadas em suportes identificados, juntamente com as requisições.                                      |
| Conservações das amostras para os diferentes laboratórios após as 16h00, | Após as 16h, as amostras destinadas aos restantes laboratórios são conservadas na central automática. As amostras destinadas à central automáticas são                                                                                               |

| Etapa                                                                                          | Acções                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| em caso de avaria dos equipamentos ou no caso de amostras que não são processadas diariamente. | processadas até as 20h e após esta hora apenas são processadas as amostras urgentes. Em caso de avaria dos equipamentos ou no caso de análise dos imunossupressores e hemoglobina glicada, que não são processados diariamente, procede-se à sua conservação. |

## **2. BIOQUÍMICA CLÍNICA**

### **2.1. Objectivo**

O estágio na valência de Bioquímica Clínica é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Bioquímica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Cidália Vieira.

### **2.2. Introdução**

O Laboratório de Bioquímica está inserido no Serviço de Patologia Clínica do IPO e tem como principais actividades o doseamento de moléculas biologicamente importantes presentes nos fluidos corporais como electrólitos e proteínas bem como a monitorização de fármacos imunossupressores.

O laboratório de Bioquímica apresenta como metodologias Espectrofotometria, Turbidimetria, Potenciometria indirecta (ISE) e Imunoensaios como Quimioluminescência (CMIA) e Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA).

### **2.3. Métodos**

#### **2.3.1. Espectrofotometria**

##### Fundamento

A espectrofotometria é a medida da intensidade da luz, a determinados comprimentos-de-onda e depende da capacidade que o analito tem em absorver a luz. Esta metodologia baseia-se no facto de a intensidade da luz, ao passar pela amostra (cromogénio), diminuir por ser, em parte, absorvida. A concentração do analito em estudo é proporcional à fracção de luz não absorvida detectada pelo fotodetector.

Na seguinte tabela encontram-se os parâmetros, cujo sinal resultante de uma reacção enzimática, de oxidação-redução ou colorimétrica resulta numa alteração de absorvência detectada por espectrofotometria.

##### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott

### Parâmetros

Na tabela seguinte encontram-se os parâmetros determinados por espectrofotometria, bem como as amostras e metodologias.

Tabela 2-1 – Parâmetros, amostras e respectivas metodologias determinados por espectrofotometria

| <b>Parâmetro</b>           | <b>Amostra</b>            | <b>Metodologia</b>                                          |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Cálcio                     | Soro, plasma e urina      | Arsenazo III                                                |
| Fósforo                    | Soro, plasma e urina      | Fosfomolibdato                                              |
| Magnésio                   | Soro, plasma e urina      | Arsenazo                                                    |
| Ferro                      | Soro e plasma             | Ferene S                                                    |
| Ácido Úrico                | Soro, plasma e urina      | Uricase                                                     |
| Bilirrubina total          | Soro e plasma             | Reacção de Diazo                                            |
| Bilirrubina directa        | Soro e plasma             | Reacção de Diazo                                            |
| Colesterol                 | Soro e plasma             | Enzimática, colesterol esterase                             |
| Creatinina                 | Soro, plasma e urina      | Picrato alcalino                                            |
| Glucose                    | Soro, plasma, urina e LCR | Hexoquinase/G-6-PDH                                         |
| Triglicéridos              | Soro e plasma             | Glicerol fosfato oxidase                                    |
| Ureia                      | Soro, plasma e urina      | Urease                                                      |
| Proteínas Totais           | Soro e plasma             | Biureto                                                     |
| Albumina                   | Soro e plasma             | Verde de Bromocresol                                        |
| Alanina Aminotransferase   | Soro e plasma             | NADH (sem P-5'-P)                                           |
| Amilase                    | Soro, plasma e urina      | Substrato de CNPG3                                          |
| Aspartato Aminotransferase | Soro e plasma             | NADH (sem P-5'-P)                                           |
| Creatinina Quinase         | Soro e plasma             | NAC (N-acetil-L-cisteína)                                   |
| Fosfatase Alcalina         | Soro e plasma             | Para-nitrofenil fosfato                                     |
| Gama-Glutamil transferase  | Soro e plasma             | Substrato de L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida |
| Lactato desidrogenase      | Soro e plasma             | Lactato a Piruvato (NADH)                                   |
| Colesterol HDL             | Soro e plasma             | Detergente selectivo acelerador                             |

| Parâmetro      | Amostra       | Metodologia                                           |
|----------------|---------------|-------------------------------------------------------|
| Colesterol LDL | Soro e plasma | Detergente selectivo líquido, medido (Método Directo) |

#### 2.3.1.1. Urina tipo II

##### Fundamento

No Laboratório de Bioquímica do IPO, a urina tipo II é analisada com base na espectrofotometria de reflectância. A luz emitida por uma lâmpada LED, a um determinado comprimento-de-onda, incide sobre as “almofadas” da tira, a um ângulo pré-definido. A luz é reflectida com uma intensidade dependente da cor formada pela reacção entre os compostos da “almofada” e a urina e é captada pelo fotodetector. Após converter a luz detectada para valores de reflectância, o sistema compara-os com os limites de referência definidos para cada parâmetro e transmite resultados semi-quantitativos.

##### Equipamento

Urisys 2400 da Roche

##### Parâmetros

Na seguinte tabela encontram-se os parâmetros analisados no equipamento, bem como as suas metodologias específicas.

Tabela 2-2 – Parâmetros e metodologias analisados na urina tipo II.

| Parâmetro  | Metodologia                                                                                                                             |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH         | Os iões $H^+$ da urina reagem com a zona do teste que contém indicadores vermelho de metilo, fenoftaleína e azul de bromotimol.         |
| Leucócitos | Detecção de esterases granulocitárias que decompõem um éster indoxílico em idoxil que, ao reagir com sal diazónico, produz cor violeta. |
| Nitritos   | Teste de Griess. O teste revela a presença de nitritos e, indirectamente, de bactérias produtoras de nitritos.                          |

| Parâmetro        | Metodologia                                                                                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteína         | Baseado no princípio do erro proteico dos indicadores de pH. Teste particularmente sensível à albumina.                                    |
| Glucose          | Baseado na reacção específica da glucose oxidase/peroxidase                                                                                |
| Corpos Cetónicos | Teste de Legal: O ácido acetoacético e a acetona formam com o nitroprussiato de sódio, em meio alcalino, um complexo de cor violeta.       |
| Urobilinogénio   | O sal diazónico da tira reage com urobilinogénio, originando um corante azóico vermelho.                                                   |
| Bilirrubina      | Ligação da bilirrubina a um sal diazónico da tira produzindo uma cor rosa.                                                                 |
| Eritrócitos      | Reacção, semelhante à peroxidase, da hemoglobina e mioglobina, catalisa a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio da tira. |

### 2.3.2. Turbidimetria

#### Fundamento

A turbidimetria é a medida da diminuição de intensidade de luz incidente causada pela dispersão, reflexão e absorção do feixe de luz de uma dada intensidade. A turbidimetria baseia-se no facto da quantidade de luz, que atravessa uma solução de partículas, diminuir à medida que a turvação da solução aumenta. Esta turvação é medida ao ângulo de 0° em relação à luz incidente, tal como na espectrofotometria.

No âmbito das análises clínicas, a turbidimetria é usada na quantificação de imunoglobulinas e algumas proteínas através da formação de imunocomplexos insolúveis que provocam turvação (imunoturbidimetria). Na quantificação dos fármacos, moléculas mais pequenas que as proteínas, é usado o imunoensaio turbidimétrico homogéneo do tipo *microparticle-enhanced* (PETINIA). O ensaio baseia-se na competição entre o fármaco presente na amostra e o fármaco a revestir micropartículas de látex, relativamente a locais de ligação ao anticorpo. Os imunocomplexos resultantes da conjugação entre o fármaco das partículas e o anticorpo formam agregados maiores que os imunocomplexos formados pelo fármaco a analisar,

pelo que a turvação medida é inversamente proporcional à concentração do fármaco da amostra.

Na seguinte tabela encontram-se os parâmetros analisados através do método da turbidimetria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott

#### Parâmetros

Os parâmetros determinados pela metodologia de imunoturbidimetria são os seguintes:

Em sangue total:

- Hemoglobina A1c

Em soro plasma e urina:

- $\beta$ 2-Microglobulina

Em soro e plasma:

- Proteína C Reactiva
- Transferrina
- IgA
- IgG
- IgM
- Ácido Valpróico
- Digoxina
- Amicacina
- Vancomicina

### 2.3.3. Potenciometria

#### Fundamento

No Laboratório de Bioquímica Clínico, a potenciometria indirecta é a metodologia utilizada para determinar a concentração dos electrólitos (Sódio, Potássio e Cloro) no soro, plasma ou urina.

A potenciometria é a medida do potencial eléctrico entre dois eléctrodos de uma célula electroquímica, na ausência de correntes eléctricas apreciáveis. O eléctrodo de

referência tem potencial é constante, conhecido e insensível à composição da solução a analisar e o eléctrodo indicador é selectivo para o ião a analisar. Ambos os eléctrodos estão ligados a um voltímetro, que compara o potencial medido com o potencial do eléctrodo de referência. O potencial corresponde à actividade do ião e está directamente relacionado com a sua concentração na solução, sendo expresso pela equação de Nernst.

No âmbito das análises clínicas, são usados eléctrodos selectivos de iões (*ion selective electrodes*, ISE), que permitem medir o potencial de um único tipo de ião, sem interferência dos restantes iões da solução. Estes eléctrodos são constituídos por membranas de permeabilidade selectiva para a carga e tamanho do ião analisar.

Outro equipamento que tem a potenciometria como metodologia é o analisador de pH e gases sanguíneos. O eléctrodo de pH, sendo um ISE, é constituído por uma membrana de vidro, sensível e específica para iões de hidrogénio. O sensor de  $p\text{CO}_2$  trata-se de um eléctrodo de pH, revestido por uma solução de bicarbonato de cloro e com uma membrana permeável ao  $\text{CO}_2$  gasoso que separa esta solução da amostra. Para além da potenciometria, o RapidLab® 348 também utiliza a amperometria na determinação da  $p\text{O}_2$ . Este equipamento, para além de medir pH,  $p\text{CO}_2$  e  $p\text{O}_2$ , calcula também a concentração de bicarbonato padrão e real, excesso de base no sangue e saturação de oxigénio estimado.

#### Equipamentos

- Architect C8000/Ci8200 da Abbott
- RapidLab 348 de Siemens

#### Amostra

- Soro, plasma, urina (todos os electrólitos) e LCR (Cloro)
- Sangue arterial heparinizado (pH e  $p\text{CO}_2$ )

#### Parâmetros

- Sódio
- Potássio
- Cloro
- pH
- Pressão parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ )

#### 2.3.4. Amperometria

A amperometria é uma técnica electroquímica utilizada para dosar a quantidade de analito em solução, através da aplicação de uma tensão fixa entre dois eléctrodos numa célula electroquímica, medindo a corrente que a atravessa. Quando a amostra entra em contacto com os eléctrodos, é aplicada uma tensão conhecida ao cátodo, eléctrodo medidor. O analisador de pH e gases sanguíneos usa esta metodologia para medir a pressão parcial de oxigénio em sangue arterial heparinizado. O oxigénio dissolvido na amostra é reduzido no cátodo enquanto a prata do ânodo é oxidada, sendo a quantidade de oxigénio reduzido directamente proporcional ao número de electrões ganhos no cátodo. Assim, medindo a alteração da corrente (fluxo de electrões) entre o ânodo e o cátodo, determina-se a quantidade de oxigénio presente na amostra.

#### 2.3.5. Quimioluminescência

##### Fundamento

A quimioluminescência é a designação para a emissão de luz quando um electrão passa de um nível de energia superior ou excitado para um nível energético inferior. A excitação é causada por uma reacção química que envolve a oxidação de um composto orgânico. Num imunoensaio quimioluminescente, uma molécula quimioluminescente é usada como marcador para detectar e quantificar reacções imunológicas.

No Laboratório de Bioquímica, muitos dos parâmetros são determinados com a tecnologia de imunoensaio (em dois passos) de micropartículas por quimioluminescência (CMIA). No primeiro passo ocorre a combinação e incubação entre as micropartículas paramagnéticas revestidas com o anticorpo e o analito da amostra. Após lavagem para eliminar o que não ficou ligado, é adicionado o conjugado de anticorpos marcado com derivado de acridínio, formando um complexo *sandwich*. Para que haja produção de luz são adicionadas as soluções activadora (NaOH) e pré-activadora ( $H_2O_2$ ). A reacção quimioluminescente é medida em unidades relativas de luz (RLUs) em que existe uma relação directa entre a concentração de antígeno na amostra e as RLUs detectadas pelo fotómetro.

##### Equipamento

Architect Ci8200 da Abbott

### Parâmetros

Na tabela seguinte encontram-se os parâmetros analisados pela tecnologia CMIA.

Tabela 2-3 – Parâmetros determinados no laboratório de Bioquímica, por quimioluminescência, bem como o respectivo equipamento e metodologias

| Parâmetro    | Amostra                          |
|--------------|----------------------------------|
| CEA          | Soro e plasma                    |
| CA 125       | Soro e plasma                    |
| CA 19-9      | Soro e plasma                    |
| CA 15-3      | Soro e plasma                    |
| SCC          | Soro e plasma                    |
| AFP          | Soro, plasma e líquido amniótico |
| PSA Total    | Soro                             |
| Ciclosporina | Sangue total                     |
| Tacrolimus   | Sangue total                     |
| Vitamina B12 | Soro e plasma                    |
| Ácido fólico | Soro, plasma e sangue total      |
| Ferritina    | Soro e plasma                    |
| Troponina I  | Soro e plasma                    |
| CK- MB       | Soro e plasma                    |

### 2.3.6. Imunoensaio enzimático homogéneo competitivo

#### Fundamento

O imunoensaio enzimático homogéneo competitivo baseia-se na competição entre o fármaco presente na amostra e o fármaco exógeno marcado com a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) relativamente a locais de ligação ao anticorpo (anticorpos monoclonais de ratinho anti-fármaco).

Uma vez que a actividade da G6PDH diminui à medida que o fármaco da amostra se une aos anticorpos, a concentração do fármaco na amostra pode ser quantificada em termos de actividade enzimática. A G6FDH activa converte o NAD em NADH originando uma alteração na absorvência, medida espectrofotometricamente.

Equipamento

Architect Ci8200 da Abbott

Amostra

Soro e plasma

Parâmetros

- Carbamazepina
- Fenitoína
- Fenobarbital
- Teofilina

### 2.3.7. Imunoensaio de Fluorescência Polarizada

Fundamento

O imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) trata-se de um imunoensaio de fluorescência competitivo homogêneo em que o analito (Ag) compete com o antigénio marcado com fluoresceína (Ag-F), pelos locais de ligação ao anticorpo (Ac). Este imunoensaio depende do tamanho molecular, ou seja, quanto maior a molécula, menor é a sua rotação, pelo que a luz absorvida é emitida no mesmo plano, ocorrendo polarização. No caso de a amostra conter baixa concentração de analito, há alta concentração do complexo Ac-Ag-F e a polarização é alta. Se a amostra contém alta concentração de analito, há baixa concentração do complexo Ag-F-Ac e a polarização é baixa. Neste imunoensaio, o sinal (luz polarizada) é inversamente proporcional à do analito na amostra.

Equipamento

TDxFLx da Abbott

Amostra

Soro e plasma

Parâmetros

## Metotrexato

**2.4. Interesse Clínico****2.4.1. Electrólitos e Iões**

Electrólitos e iões são pequenas partículas carregadas positivamente, catiões ou negativamente, aniões. Estas partículas são encontradas em todos os fluidos, quer intra ou extracelularmente. São responsáveis pela manutenção da pressão osmótica, homeostase e são importantes em muitos processos metabólicos.

Electrólitos

Os electrólitos ajudam no equilíbrio hídrico e ácido-base do corpo. Normalmente, a determinação de electrólitos como sódio, potássio e cloro é pedida numa só análise – ionograma - para avaliar o balanço electrolítico geral. O ionograma é importante em casos como edema, fraqueza, confusão, arritmias cardíacas, pressão sanguínea elevada, insuficiência cardíaca, doença hepática e renal.

Na tabela 2-7, encontra-se uma breve descrição de cada electrólito, os intervalos de referência para adultos e as diversas situações patológicas.

Tabela 2-4 – Descrição, intervalos de referência e situações patológicas dos electrólitos determinados no laboratório.

| <b>Parâmetro</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)</b>                                                                         |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sódio            | Principal catião extracelular responsável por manter a distribuição normal de água e pressão osmótica no compartimento de fluído extracelular. Os seus níveis no sangue são controlados pela excreção e reabsorção nos rins. | ↑ - Desidratação, Síndrome de Cushing, Diabetes insipidus.<br>↓ - Diarreia e vômitos, Doença de Addison, doença renal.   |
| Potássio         | Principal catião intracelular responsável pela contracção muscular e por manter o batimento cardíaco normal.                                                                                                                 | ↑ - Choque, falha circulatória, doença renal.<br>↓ - Diarreia e vômitos, uso de medicamentos diuréticos, alguns cancros. |

|         |                                                                                                                                                                                                                     |                                                                   |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Cloreto | Principal anião extracelular. Mesmas funções que sódio. Juntamente com o sódio é um constituinte osmoticamente activo, por isso, alterações nas suas concentrações reflectem alterações nas concentrações do sódio. | ↑ - Desidratação.<br>↓ - Valor baixo de sódio no sangue, vómitos. |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|

### Gasimetria arterial

A gasimetria arterial é uma análise clínica que determina o pH e as concentrações de oxigénio, dióxido de carbono e, assim, determina o equilíbrio ácido-base. Esta análise é importante, por exemplo, na monitorização de terapia em pacientes com respiração assistida, em que é administrada uma mistura de gases cujas quantidades dependem dos resultados desta análise. Na tabela seguinte encontram-se descritos os analitos determinados na gasimetria arterial, a razão para a sua determinação e os respectivos valores de referência.

Na tabela 2-8, encontra-se uma breve descrição de cada parâmetro determinado na gasimetria.

Tabela 2-5 – Descrição, determinação e valores de referência dos analitos determinados na gasimetria arterial.

| Parâmetro        | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH               | O pH exprime a actividade dos iões de hidrogénio numa solução. Permite a detecção de desequilíbrios ácido-base.                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| pCO <sub>2</sub> | O dióxido de carbono é produzido durante o metabolismo celular e libertado no sangue, onde é transportado para os rins e pulmões para ser excretado. Transportado sob a forma de bicarbonato (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), CO <sub>2</sub> dissolvido e ácido carbónico (H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ). Juntamente com o pH constitui uma ferramenta de diagnóstico na avaliação da função respiratória |
| pO <sub>2</sub>  | A pO <sub>2</sub> exprime a eficácia das trocas de oxigénio nos pulmões; depende da pressão parcial de oxigénio no alvéolo, capacidade de difusão pulmonar desse gás, existência de <i>Shunt</i> anatómicos e da relação ventilação/perfusão pulmonar. Permite a avaliação do grau de hipoxémia.                                                                                                               |
| Bicarbonato      | Principal anião com poder tampão. Manutenção do nível de pH no sangue.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

| Parâmetro                                       | Descrição                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]<br>(calculado) | Juntamente com os valores de pH, podem ajudar a determinar se os desequilíbrios de acidose ou alcalose são de origem metabólica                                                                   |
| Excesso de Base                                 | O excesso de base é uma expressão empírica que permite estimar o número de equivalentes de bicarbonato de sódio ou de cloreto de amônio necessários para corrigir o pH do paciente para o normal. |

Na tabela seguinte encontram-se descritas as várias situações que podem levar a acidose ou alcalose respiratória e acidose ou alcalose metabólica

Tabela 2-6 – Situações de desequilíbrio ácido-base

| Situações             |                                                                                  | pCO <sub>2</sub> | pH | [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------|----|----------------------------------|
| Acidose respiratória  | Problemas respiratórios que levem à retenção de CO <sub>2</sub> – Hipoventilação | ↑                | ↓  | Normal                           |
| Alcalose respiratória | Perda excessiva de CO <sub>2</sub> - Hiperventilação                             | ↓                | ↑  | Normal                           |
| Acidose metabólica    | Diabetes, Insuficiência cardíaca, renal, diarreia.                               | Normal           | ↓  | ↓                                |
| Alcalose metabólica   | Perda líquida de iões H <sup>+</sup> , por exemplo, vômitos                      | Normal           | ↑  | ↑                                |

### Outros iões

Muitos outros iões, não fazendo parte do ionograma, são testes comuns no âmbito das análises clínicas uma vez que também eles fazem parte de muitos tecidos e funções metabólicas.

Na Tabela 2-7, encontra-se uma breve descrição de cada ião e as diversas situações patológicas.

Tabela 2-7 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas dos produtos dos iões.

| Parâmetro | Descrição                                                                                                                                                                                                   | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cálcio    | Mineral necessário na formação do osso e coagulação do sangue; importante na função nervosa e muscular.                                                                                                     | ↑ - Hiperparatiroidismo, alguns cancros, ingestão excessiva de vitamina D.<br>↓ - Hipoparatiroidismo, deficiência de vitamina D, doença renal crónica, pancreatite. |
| Fósforo   | Mineral importante no metabolismo ósseo, produção de energia e função nervosa e muscular. Ajuda no diagnóstico de problemas do metabolismo do cálcio                                                        | ↑ - Insuficiência renal, overdose de vitamina D, alto consumo de fosfato.<br>↓ - Uso excessivo de diuréticos ou antiácidos, hiperparatiroidismo.                    |
| Magnésio  | Mineral essencial para a actividade de muitas enzimas, principalmente, as que convertem energia em função muscular. Importante na estrutura óssea. <i>follow-up</i> de valores baixos de cálcio e potássio. | ↑ - Doença renal, desidratação severa.<br>↓ - Má absorção, pancreatite, diarreia, alcoolismo.                                                                       |
| Ferro     | Componente importante da hemoglobina e mioglobina. Componente de muitas enzimas envolvidas no metabolismo energético.                                                                                       | ↑ - Transfusões sanguíneas múltiplas, injeções de ferro, hemocromatose hereditária.<br>↓ - Dieta pobre em ferro, perda de sangue.                                   |

#### 2.4.2. Metabolitos

A formação e degradação de moléculas biológicas são o centro da vida, pois todo o ser vivo usa moléculas como fontes de energia, na formação de células e tecidos e como sensores metabólicos no controlo dos metabolismos. Por dia, milhares de moléculas são formados e degradados nos processos metabólicos. O interesse clínico destas moléculas deve-se ao facto de reflectirem o estado nutricional, a eliminação dos produtos residuais e o controlo metabólico.

### Metabolismo energético

Na tabela seguinte encontram-se descritos produtos do metabolismo energético e as respectivas situações patológicas cujos valores podem elevados e baixos.

Tabela 2-8 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas das moléculas participantes no metabolismo energético.

| <b>Parâmetro</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)</b>                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glucose          | A principal fonte de energia de muitos tecidos; regulada pela insulina, cortisol e glicogénio. Determinado na prova de tolerância à glucose para diagnóstico de diabetes.                                                                                                                                                     | ↑ - Diabetes, Doença de Cushing, stress.<br>↓ - Excesso de insulina, fome, insuficiência adrenal |
| HbA1c            | Molécula de hemoglobina ligada covalentemente a uma molécula de glucose. Nos doentes diabéticos, dá uma estimativa do controlo da glucose até 3 meses depois. (tempo de vida de um glóbulo vermelho)                                                                                                                          | ↑ - Diabetes                                                                                     |
| Vitamina B12     | Necessário para a função do glóbulo vermelho. Importante na função nervosa. Permite a identificação de deficiência quando a concentração de ferro é baixa e há presença de glóbulos vermelhos grandes (anemia macrocítica)                                                                                                    | ↑ - Algumas leucemias.<br>↓ - Má nutrição, má absorção, anemia perniciosa.                       |
| Ácido fólico     | Necessário para a função do glóbulo vermelho; importante na divisão celular; muito importante no desenvolvimento do feto. Deficiência pode causar defeitos no tubo neural. Medido juntamente com vitamina B12 para determinar a causa da anemia macrocítica; monitorização da terapia para baixar os valores de ácido fólico. | ↑ - Anemia perniciosa.<br>↓ - Má nutrição, má absorção (exemplo: doença celíaca e alcoolismo)    |

### Produtos de degradação

Na tabela seguinte encontram-se descritos produtos de degradação e as respectivas situações patológicas cujos valores podem elevados e baixos.

Tabela 2-9 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas dos produtos de degradação.

| Parâmetro                       | Descrição                                                                                                                                                                                                            | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                                     |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bilirrubina total               | Produto proveniente da destruição da hemoglobulina, excretado pelo fígado para a bÍlis. A bilirrubina é libertada para o sangue na forma livre ou glicuroconjugada. Determinada para a avaliação da função hepática. | ↑ - Hepatite, cirrose, doenças hemolítica (ex: incompatibilidade feto-maternal), obstrução dos ductos hepáticos e biliares.                                                   |
| Bilirrubina directa (conjugada) | Hidrossolúvel, excretado pelo sistema biliar para o intestino onde é metabolizada a estercobilinogénio. Permite a avaliação da capacidade do fígado para conjugar a bilirrubina e excretá-la.                        | ↑ - Obstrução dos ductos hepáticos e biliares, Síndrome de Dubin-Johnson                                                                                                      |
| Ácido úrico                     | Produto proveniente da degradação das purinas e é excretado pelos rins. Permite a avaliação da inflamação da articulação.                                                                                            | ↑ - Gota, doença renal, leucemia.                                                                                                                                             |
| Creatinina                      | Produto proveniente da degradação no músculo da creatina; excretada pelos rins. Permite avaliação da função renal, monitorização do tratamento para doença renal.                                                    | ↑ - Disfunção renal devido a: toxicidade por fármacos, diabetes mal controlada ou fluxo sanguíneo insuficiente nos rins devido a choque ou insuficiência cardíaca congestiva. |
| Ureia                           | Produto proveniente da degradação proteica, formado no fígado e excretado pelos rins. Determinada juntamente com a creatinina para avaliar a função renal.                                                           | ↑ - Disfunção renal, stress, dieta rica em proteína.<br>↓ - Dieta pobre em proteína, doença hepática.                                                                         |

### 2.4.3. Proteínas

As proteínas são macromoléculas – polímeros formados por aminoácidos essenciais – que fazem parte de todas as células, fluidos e órgãos.

As proteínas que são o foco da Bioquímica são aquelas que circulam no sangue: proteínas do plasma, proteínas de transporte, proteínas do sistema imunitário, enzimas e proteínas da coagulação. Contudo, existem outras proteínas que têm, principalmente, funções intracelulares e por isso, a sua presença no sangue pode reflectir algum dano celular.

#### Proteínas de transporte e gerais

Na tabela seguinte encontram-se descritas as várias proteínas de transporte e gerais determinadas no laboratório, bem como as razões da sua determinação, intervalos de referência para adultos e situações patológicas.

Tabela 2-10 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas das proteínas de transporte e gerais.

| Parâmetro             | Descrição                                                                                                                                                | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                             |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteínas totais      | Medição da quantidade de proteínas, principalmente albumina e globulinas, no soro ou plasma.                                                             | ↑ - Desidratação, infecções, alguns cancros como os mielomas e linfomas.              |
| Proteínas urinárias   | Normalmente o valor de proteínas na urina é muito baixo. Determinada para avaliação da função renal e monitorização de fármacos nefrotóxicos.            | ↑ - Insuficiência renal (síndrome nefrótica), diabetes                                |
| Albumina, soro/plasma | Maior proteína do sangue. Forma-se no fígado, liga-se e transporta muitas substâncias. Indicador de estado de saúde e nutricional.                       | ↑ - Desidratação, infecção.<br>↓ - Jejum, queimaduras, doença renal, doença hepática. |
| Albumina urinária     | A albumina é uma proteína muito grande para passar do plasma para a urina. A sua presença na urina indica algum problema na filtração glomerular do rim. | ↑ - Doença renal.                                                                     |

| Parâmetro                                     | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                               | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ -2-microglobulina                     | A $\beta$ -2 M constitui a cadeia leve dos HLA de classe I. Exprime-se em todas as células nucleadas, particularmente nos linfócitos B e encontram-se em todos os líquidos biológicos: soro, saliva, sinovial, LCR e urina. Determinada para monitorização de mielomas. | ↑ - Alguns cancros, mielomas, leucemias linfóides crónicas, linfomas das células B, infecções por CMV e VIH, lúpus, doença de Crohn, Síndrome de Sjogren |
| Ferritina                                     | Proteína de armazenamento do ferro, maioritariamente intracelular. Normalmente testado com o ferro e transferrina para avaliar o <i>status</i> do ferro.                                                                                                                | ↑ - Excesso de ferro, inflamação, transfusões sanguíneas múltiplas<br>↓ - Deficiência em ferro.                                                          |
| Transferrina                                  | Principal proteína transportadora de ferro; formada no fígado. Permite a avaliação no <i>status</i> do ferro                                                                                                                                                            | ↑ - Anemia hemolítica, anemia perniciosa, hepatite.<br>↓ - Deficiência em ferro, infecção, doença hepática.                                              |
| Capacidade latente da fixação do ferro (UIBC) | Capacidade de reserva da transferrina para transporte adicional de ferro. Determinada para monitorização do tratamento da toxicidade do ferro                                                                                                                           | ↑ - Tratamento de excesso de ferro                                                                                                                       |
| Proteína C Reactiva (PCR)                     | Proteína produzida como resposta a uma infecção ou processos inflamatórios                                                                                                                                                                                              | ↑ - Infecção ou processo inflamatório.                                                                                                                   |
| Troponina I                                   | Proteínas intracelulares encontradas principalmente no músculo cardíaco; libertadas quando há danos nas células cardíacas. Auxilia o diagnóstico de um ataque cardíaco (enfarto do miocárdio)                                                                           | ↑ - Enfarte do miocárdio                                                                                                                                 |

### Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são anticorpos essenciais na defesa do organismo contra substâncias estranhas. A defesa ocorre através do reconhecimento das estruturas

antigénicas específicas nas proteínas, vírus ou bactérias. O reconhecimento e ligação das imunoglobulinas a estas estruturas desencadeiam uma série de reacções (resposta imunitária) com o objectivo de destruir o antigénio.

As imunoglobulinas podem ser designadas de monoclonais ou policlonais. Imunoglobulinas monoclonais são produzidas por uma única linha de células T e têm exactamente a mesma composição química, sequência e estrutura. Imunoglobulinas policlonais é a designação para agregados de imunoglobulinas monoclonais produzidas por diferentes linhas de células T. Níveis elevados de imunoglobulinas policlonais ocorrem em infecções e inflamações, reflectindo uma resposta imune mais ampla; enquanto níveis elevados de imunoglobulinas monoclonais são encontrados em situações como mieloma múltiplo, Macroglobulinémia de Waldenstrom e alguns linfomas.

Na tabela seguinte encontra-se a descrição das imunoglobulinas.

Tabela 2-11 – Descrição e intervalos de referência das imunoglobulinas estudadas no laboratório.

| Parâmetro | Descrição                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgA       | Protege as membranas mucosas; encontrada na saliva, lágrimas e suor. Constitui cerca de 10-15% das imunoglobulinas do sangue.                                                                                       |
| IgG       | Confere imunidade a longo prazo; atravessa a placenta para dar protecção passiva ao feto. Constitui 75-80% das imunoglobulinas do sangue.                                                                           |
| IgM       | IgM é a imunoglobulina maior e a primeira a formar-se em resposta a uma infecção; responsável por activar factores do complemento para destruir invasores. Constitui cerca de 10-15% das imunoglobulinas do sangue. |

### Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam reacções químicas sem sofrerem degradação ou alterações. No corpo humano actuam principalmente dentro das células e são responsáveis por regular as reacções metabólicas. A sua presença no sangue pode ser então resultado da fuga de enzimas da célula causada por dano celular.

Na tabela seguinte encontra-se descrito o significado clínico de cada enzima e as respectivas situações patológicas.

Tabela 2-12 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas de enzimas.

| Parâmetro | Descrição                                                                                                                                                                                                                                         | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALT       | Principalmente encontrada no fígado. Permite a avaliação da doença hepática.                                                                                                                                                                      | ↑ - Hepatite, cirrose, Síndrome de Reye, hepatoma, dano hepático induzido por drogas.                                    |
| AST       | Grande parte presente no fígado, coração e músculo esquelético. Permite a avaliação da doença hepática.                                                                                                                                           | ↑ - Doença hepática, ataque cardíaco, trauma.                                                                            |
| ALP       | Encontrada nos ossos, intestino, rins e fígado. Permite a avaliação de doenças ósseas e hepáticas                                                                                                                                                 | ↑ - Doença hepática, óssea e em períodos de crescimento ósseo.<br>↓ - Baixo fosfato, hipotireoidismo, anemia perniciosa. |
| GGT       | Presente no fígado e noutros tecidos. Indicador desordem hepática                                                                                                                                                                                 | ↑ - Obstrução biliar, doença hepática alcoólica                                                                          |
| LD        | Grande parte distribuída por tecidos como coração, pulmões, fígado, rins, músculo esquelético. Existe em 5 formas, de LD-1 a LD-5, predominando diferentemente pelos tecidos. Indicador geral do dano tecidular                                   | ↑ - Ataque cardíaco, doença hepática, pulmonar, trauma<br>↓ - Deficiência em ferro.                                      |
| CK        | Enzima do músculo. Diferentes formas da enzima são específicas para diferentes tipos de tecido. CK-BB é encontrada principalmente no tecido e tecido neurológico; CK-MB no tecido cardíaco; CK-MM no tecido muscular. Indicador de dano muscular. | ↑ - Dano muscular, exercício extremo, trauma.<br>↓ - Baixa massa muscular.                                               |
| Amilase   | Enzima digestiva segregada pelo pâncreas, glândulas salivares; responsável pela degradação de triglicéridos. Auxilia no diagnóstico da pancreatite,                                                                                               | ↑ - Pancreatite aguda, ductos pancreáticos bloqueados.<br>↓ - Algumas doenças hepáticas.                                 |

Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são proteínas selectivamente produzidas e libertadas por células tumorais mas não, normalmente, por células normais. O seu interesse clínico deve-se ao facto de poderem ser usados para rastreio, auxílio no diagnóstico, determinação da fase da doença, monitorização da terapia e previsão da recaída. Contudo, nem todos os marcadores tumorais podem ser, por exemplo, utilizados no rastreio de populações, pelo que a maioria é usado principalmente para monitorização da terapêutica e previsão da recaída.

Na tabela seguinte encontra-se descrito o significado clínico de marcador tumoral, tipos de cancro em que está presente, razões da sua determinação, valores de referência para adultos.

Tabela 2-13 – Descrição de marcadores tumorais, objectivo da sua determinação, valores de referência e tipos de cancro em que estão presentes

| Parâmetro | Descrição e utilidade                                                                                                                                                                                            | Cancro em que está presente.                      |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| PSA       | Glicoproteína, encontrada no citoplasma das células epiteliais dos ductos da glândula prostática. Rastreio de doentes assintomáticos; Confirmação de diagnóstico; Monitorização de terapia; Previsão de recaída. | Próstata                                          |
| CEA       | Glicoproteína normalmente encontrada nas células epiteliais embrionárias e fetais. Monitorização de tratamento; Prevenção de recaída.                                                                            | Colorectal, tracto gastrointestinal, pulmão, mama |
| CA 125    | Antigénio glicoproteico de superfície do tipo mucinoso encontrado nos epitélios fetais e no epitélio brônquico. Confirmação de diagnóstico; Monitorização de tratamento; Prevenção de recaída.                   | Ovários e Carcinoma do endométrio                 |
| CA 15-3   | Antigénio glicoproteico do tipo mucina, produto do gene MUC-1. Determinação da fase da doença. Monitorização do tratamento. Determinação de recaída.                                                             | Mama, ovários                                     |
| CA 19-9   | Antigénio glicolipídico encontrado nos epitélios do tracto gastrointestinal fetal em muitas células de mucosas do adulto. Monitorização de tratamento. Prevenção de recaída.                                     | Pâncreas, cólon                                   |

| Parâmetro | Descrição e utilidade                                                                                                                                                                             | Cancro em que está presente.                   |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| SCC       | Glicoproteína, fracção do TA-4, molécula descoberta a partir do cancro do colo do útero. Monitorização de tratamento                                                                              | Pele, esófago, bexiga, próstata, pulmões, etc. |
| AFP       | Glicoproteína sintetizada no fígado, saco embrionário e tracto gastrointestinal fetal. Substitui a albumina na manutenção da pressão osmótica. Monitorização do tratamento. Prevenção de recaída. | Fígado, ovários, testicular                    |

#### 2.4.4. Lípidos e Lipoproteínas

Os lípidos são biomoléculas constituídas por carbono, hidrogénio e oxigénio, caracterizadas como insolúveis em água e solúveis em solventes não polares como o álcool. As lipoproteínas são complexos de lípidos-proteínas nos quais os lípidos são transportados na corrente sanguínea. No âmbito das análises clínicas, os lípidos e as lipoproteínas são principalmente usados como indicadores do risco de doença cardiovascular. Alguns destes parâmetros podem estar elevados como resultado de doenças como hipotireoidismo, diabetes ou doença renal, pelo que a interpretação dos resultados das análises tem que ter em conta vários factores a fim de evitar tratamentos desnecessários.

Na tabela seguinte encontra-se descrito o significado clínico dos lípidos e lipoproteínas.

Tabela 2-14 – Descrição, objectivo da sua determinação, valores de referência e situações patológicas para os lípidos e lipoproteínas.

| Parâmetro        | Descrição                                                                                                                                                                                                    | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                               |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colesterol total | Lípido esteróide importante, formado no fígado e usado na produção de hormonas esteróides e paredes celulares.                                                                                               | ↑ - Hipotiroidismo, diabetes descontrolado, doença renal.<br>↓ - Doença hepática, fome, anemia.                         |
| Colesterol HDL   | HDL remove o excesso de colesterol do tecido para o disponibilizar; HDL elevado tem sido associado à protecção contra a doença da artéria coronária. Útil na avaliação do risco cardiovascular.              | ↑ - Terapia de estrogénios, consumo de álcool.<br>↓ - Tabaco                                                            |
| Colesterol LDL   | LDL transporta o colesterol do fígado para o tecido periférico. LDL contribui para a formação de placas que entopem artérias e levam à doença cardíaca coronária. Útil na avaliação do risco cardiovascular. | ↑ - Dieta rica em gordura saturada, desordens hereditárias do metabolismo do colesterol.<br>↓ - Alto consumo de fibras. |
| Triglicéridos    | Forma química dos ácidos gordos para o transporte e armazenamento no tecido adiposo. Útil na avaliação do risco cardiovascular.                                                                              | ↑ - Hipotiroidismo, alcoolismo, doença hepática, diabetes descontrolado.                                                |

#### 2.4.5. Monitorização de Fármacos

O conhecimento dos níveis de certos fármacos no sangue é crucial para o controlo do tratamento de certas doenças para evitar problemas de toxicidade ao nível renal ou hepático.

Os fármacos a monitorizar são aqueles que têm uma janela terapêutica estreita, ou seja, um intervalo de concentrações estreito no qual o fármaco é activo, eficiente sem provocar toxicidade. A determinação dos níveis destes fármacos é requerida quando é esperado que se tenha atingido a concentração máxima sérica e quando se espera ter

atingido a mínima, normalmente, imediatamente antes de ser administrada a próxima dose.

A determinação dos níveis dos parâmetros da tabela.... Permite então ao médico seguir o tratamento, ajustando-o às necessidades do paciente.

Na tabela seguinte encontra-se descrito a acção de cada fármaco e o intervalo terapêutico a ter em conta.

Tabela 2-15 – Intervalo terapêutico e respectivo objectivo dos vários fármacos avaliados na monitorização terapêutica.

| Parâmetro       | Acção                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Ácido Valpróico | Tratamento de convulsões                                              |
| Amicacina       | Antibiótico                                                           |
| Carbamazepina   | Controlo de convulsões                                                |
| Ciclosporina    | Imunossupressor                                                       |
| Digoxina        | Tratamento de fibrilhação auricular crónica e insuficiência cardíaca. |
| Fenobarbital    | Sedativo e tratamento de epilepsia                                    |
| Fenitoína       | Tratamento de arritmias ventriculares e convulsões                    |
| Tacrolimus      | Imunossupressor                                                       |
| Teofilina       | Antiasmático                                                          |
| Vancomicina     | Antibiótico para tratar infecções resistentes a outros antibióticos   |

#### 2.4.6. Urina tipo II

O exame à urina tipo II implica um exame físico-químico e microscópico da, preferencialmente, primeira urina da manhã.

O exame físico-químico da urina é usado com os seguintes objectivos:

**Identificar sintomas de doença renal e do tracto urinário.** Parâmetros de diagnóstico:

- Leucócitos
- Nitritos
- Proteína

- Eritrócitos
- pH.

**Identificar sintomas de desordens do metabolismo dos carboidratos (diabetes mellitus).** Parâmetros de diagnóstico:

- Glucose
- Cetonas

**Identificar sintomas de doenças hepáticas e hemolíticas.** Parâmetros de diagnóstico:

- Urobilinogénio
- Bilirrubina.

**Monitorização de tratamento.** A monitorização de tratamento através das tiras de teste permite que o clínico siga os resultados da terapia e, caso necessária, introduza alterações na estratégia terapêutica.

#### Exame físico

No exame físico da urina tipo II são avaliados aspecto, cor e odor.

O aspecto pode variar entre límpido, ligeiramente turvo ou muito turvo ou leitoso e pode dever-se à presença de eritrócitos, leucócitos, bactérias ou cristais

A cor da urina pode variar entre transparente e preta. Na tabela seguinte encontram-se algumas causas e associações clínicas para as diferentes cores que a urina pode apresentar.

Tabela 2-16 – Causas e associações clínicas das diferentes colorações que a urina pode apresentar.

| Cor                       | Causa                   | Associação clínica            |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Sem cor ou amarelo pálido | Poliúria                | Diabetes mellitus             |
| Laranja                   | Bilirrubina             | Bilirrubinemia                |
| Castanho avermelhado      | Hemoglobina; Mioglobina | Hemoglobinúria; Mioglobínúria |
| Vermelha                  | Porfirinas              | Porfíria                      |
| Verde                     | Bílis                   | -                             |

| Cor   | Causa                                   | Associação clínica                                             |
|-------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Preta | Hemoglobina; Melanina;<br>Homogentisato | Hemólise massiva no caso da malária;<br>Melanoma; Alcaptonúria |

O odor da urina também pode variar com o estado de saúde do doente. A título de exemplo, uma urina com odor doce/frutado deve-se à presença de cetonas e é característica de doentes com diabetes *mellitus*.

### Exame Químico

Na seguinte tabela encontram-se descritos os vários parâmetros avaliados no exame químico da urina tipo II.

Tabela 2-17 – Parâmetros analisados no exame químico da urina tipo II, factores de influência e interferência, significado clínico e intervalo de referência.

| Parâmetros | Factores de influência e interferência                                                                            | Significado clínico                                                                                                                                                                                   |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH         | ↓ - Dieta pobre em carne;<br>↑ - Dieta vegetariana                                                                | Ácido – acidose diabética, jejum, insuficiência renal, acidose tubular renal, acidose respiratória.<br>Alcalino – vômitos, deficiência severa de potássio, diuréticos, infecção do tracto urogenital. |
| Leucócitos | ↑ - Forte cor da urina, alguns antibióticos.<br>↓ - Altos valores de glucose e de proteínas. Alguns antibióticos. | Infecções bacterianas, a leveduras fungos, vírus e parasitas; glomerulopatites, nefropatias causadas por analgésicos, intoxicações.                                                                   |
| Nitritos   | ↑ - Presença de bactérias.<br>↓ - Ácido ascórbico.                                                                | Infecção bacteriana do tracto urinário                                                                                                                                                                |
| Proteína   | ↑ - Actividade física; gravidez                                                                                   | Doenças renais (pouco específico, fazer diagnóstico diferencial)                                                                                                                                      |
| Glucose    | ↑ - Gravidez; febre; idosos.                                                                                      | Diabetes mellitus (ajuda no diagnóstico e monitorização)                                                                                                                                              |

| Parâmetros       | Factores de influência e interferência                           | Significado clínico                                                                                                   |
|------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | ↓ - Bactérias                                                    |                                                                                                                       |
| Corpos Cetónicos | ↑ - Fenilcetonas, ftaleínas, compostos de enxofre, jejum, febre. | Lipólise, lipogénese, descompensação metabólica em diabetes mellitus                                                  |
| Urobilinogénio   | ↑ - Forte cor da urina.<br>↓ - Luz                               | Distúrbio da função hepática; aumento da degradação da hemoglobina devido a doença hemolítica primária ou secundária. |
| Bilirrubina      | ↓ - Luz, ácido ascórbico.                                        | Aumento de pressão intracanalicular devido a obstrução intra ou extrahepática.                                        |
| Eritrócitos      | ↑ - Menstruação, actividade física                               | Glomerulonefrite; cálculo urinário; cistite; pielonefrite; carcinoma da bexiga; adenoma da próstata; tumor renal.     |

#### Exame microscópico/sedimento urinário

##### **Eritrócitos**

Discos redondos sem núcleo, com dupla margem. Mais de 30% de eritrócitos dismórficos indicam origem glomerular.

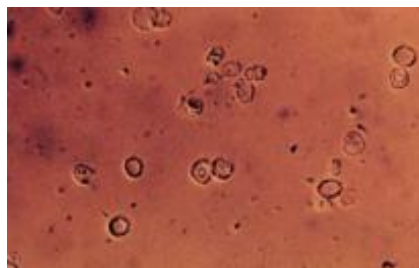


Figura 2-1 – Vários tipos de eritrócitos dismórficos (x1000)

### Leucócitos

Os leucócitos presentes na urina são maioritariamente granulócitos. Intervalo de referência: 0-5/campo.



Figura 2-2 – Leucócitos, eritrócitos e bactérias (x1000)

### Células epiteliais pavimentosas

- Células epiteliais escamosas são de origem uretral ou genital externa e são consideradas contaminação.
- Células epiteliais transicionais são mais pequenas que as anteriores provêm de tracto urinário eferente.
- Células epiteliais renais são distinguidas pelo seu grande núcleo redondo, provêm dos túbulos encontram-se muitas vezes junto de leucócitos. São as únicas com significado clínico.



Figura 2-3 – Células epiteliais pavimentosas (x1000)

### Cilindros

- Cilindros contêm proteínas e provêm dos túbulos renais;
- Cilindros hialinos são transparentes, são formações de proteína Tamm-Horsfall, uma mucoproteína produzida pelos túbulos distais. Não têm significado clínico. Normalmente estão presentes na urina a seguir a exercício físico, imobilização prolongada, febre.

- Cilindros granulares presentes normalmente na glomerulonefrite crónica. A matriz é constituída por células lisadas e proteínas plasmáticas.
- Cilindros eritrocitários são constituídos por eritrócitos embebidos numa matriz homogénea. Apontam para uma origem renal de hematúria.
- Cilindros epiteliais consistem em epitélio tubular descamativo e são indicativo de necroses tubulares.

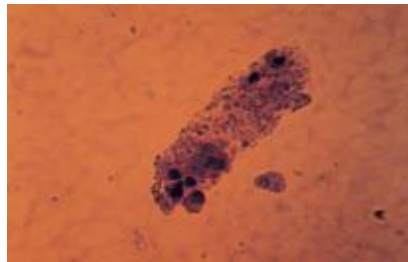


Figura 2-4 – Cachos de eritrócitos (x1000)

### **Microrganismos**

- Bactérias podem ser contaminação mas juntamente com leucocitúria são indicativo de infecção;
- *Trichomonas* melhor observadas a fresco para se observar o seu movimento.



Figura 2-5 – Bactéria numa célula epitelial pavimentosa. (x1000)

### **Artefactos**

O reconhecimento de artefactos é essencial para evitar interpretações erradas.

- Gotas de gordura são contaminação devido a cremes, resíduos de supositórios ou lubrificantes de cateteres.
- Cristais são, normalmente, considerados artefactos porque são causados pelo pH alterado devido à refrigeração da urina. Os cristais apenas têm significado clínico quando são cristais de cistina, leucina e tirosina.
- Fungos são contaminação pois as infecções fúngicas são raras.

- Fibras são contaminantes

## 2.5. Calibração

A calibração trata-se de um procedimento que permite fazer correspondência entre o sinal analítico obtido no equipamento, com a concentração do parâmetro. A calibração é feita através da análise, nas mesmas condições que as amostras, do sinal obtido por uma série de soluções com concentrações conhecidas de analito. Os resultados são expressos numa curva de calibração. Através da interpolação (ligação dos pontos através de uma linha de ajuste) da curva é estabelecido um sinal esperado para a faixa de concentrações do analito que se situam entre o calibrador de concentração menor e maior. Assim, o sinal obtido pela amostra pode ser comparado com esta curva a fim de se determinar a sua concentração.

Os limites inferior e superior da curva dependem das propriedades do método e das propriedades do equipamento. No entanto, podem ser estabelecidos pelo laboratório ou pelo fabricante os limites de detecção pelo que, quando um sinal se encontra fora desses limites, a concentração do analito não pode ser determinada com confiança. No entanto, o resultado pode ser dado como “inferior ou superior aos limites mínimo e máximo mensuráveis”, respectivamente. Alternativamente, a amostra pode ser diluída para que a sua concentração esteja dentro dos limites mensuráveis. O valor obtido tem de ser multiplicado pelo factor de diluição para determinar a concentração original da amostra.

Nos laboratórios do IPO, a periodicidade da calibração é determinada pelas especificações da técnica, do equipamento e do fornecedor. A calibração é necessária especialmente em situações como mudança de lote de reagente, expiração da curva de calibração, alteração da técnica, controlo de qualidade não conforme e quando são feitos procedimentos de manutenção como a mudança de uma lâmpada do equipamento. A calibração encontra-se ordenada por equipamento.

### 3. IMUNOLOGIA

#### 3.1. Objectivo

O estágio na valência Imunologia faz parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Maria Cesaltina Lourenço.

O objectivo do presente relatório é apresentar o local do estágio, fazendo referência aos parâmetros executados, equipamentos utilizados, respectivas metodologias e controlo de qualidade.

#### 3.2. Introdução

O Laboratório de Imunologia está inserido no Serviço de Patologia Clínica do IPO e tem como principais actividades o diagnóstico e monitorização de doenças de proliferação plasmocitária, patologias autoimunes, avaliação imunitária, serologia infecciosa, determinação de alguns marcadores tumorais e avaliação proteica de alguns líquidos biológicos.

O laboratório encontra-se organizado nos seguintes sectores:

- Imunoquímica – nefelometria, electroforese, imunofixação e técnicas manuais;
- Serologia – técnicas manuais, microelisa;
- Autoimunidade – imunofluorescência, microelisa e *immunoblot*;
- Marcadores tumorais – electroquimioluminescência.

#### 3.1. Sector de Imunoquímica

##### 3.1.1. Nefelometria

###### Fundamento

O método de nefelometria, tal como a turbidimetria (explicada no capítulo 2) baseia-se na turvação provocada pelos imunocomplexos formados entre o analito a estudar e o anticorpo anti-analito (imunonefelometria). Estes imunocomplexos são capazes de dispersar ou reflectir a luz incidente para um detector coloca num ângulo diferente da luz incidente. A intensidade de luz dispersa é directamente proporcional da concentração de analito existente na amostra e esta é determinada por comparação com

padrões de concentração conhecida. Na tabela seguinte encontram-se as proteínas individuais estudadas no laboratório de imunologia, tipo de amostra e metodologia usada.

#### Equipamento

BN ProSpec (Siemens)

#### Amostra

Soro, urina, LCR e outros líquidos biológicos.

#### Parâmetros e interesse clínico

Nas tabelas seguintes encontram-se as proteínas determinadas no Laboratório de Imunologia por nefelometria e o respectivo interesse clínico, ordenadas por regiões da electroforese do soro.

Tabela 3-1 – Interesse clínico proteínas da região da pré-albumina e albumina.

| <b>Parâmetro<br/>(Amostra)</b>    | <b>Descrição</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)</b>                                                                                                                    |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pré-albumina<br>(Soro)            | Glicoproteína de transporte de hormonas tiroideias, da proteína de ligação de retinol (Rbp) e da vitamina A. Marcador nutricional.                                                                                 | ↑ - Anti-inflamatórios, síndrome nefrótico, stress, depressão.<br>↓ - Resposta de fase aguda, doença hepática, desnutrição calórico-proteica.                       |
| Albumina<br>(Soro, plasma ou LCR) | Proteína mais abundante do plasma. Transporta cálcio, ácidos gordos, bilirrubina, hormonas, etc. Contribui para a manutenção da pressão osmótica. Marcador nutricional. Reflete a capacidade de síntese do fígado. | ↑ - Desidratação aguda (raro).<br>↓ - Resposta de fase aguda, inflamação, desnutrição calórico-proteica, analbuminémia genética., doença hepática, edema e ascites. |

| Parâmetro (Amostra)   | Descrição                                                                                               | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Microalbumina (Urina) | Albumina presente na urina. A membrana basal do glomérulo renal não permite normalmente a sua passagem. | ↑ - Danos na barreira de filtração glomerular |

Tabela 3-2 – Interesse clínico proteínas da região das  $\alpha 1$ -globulinas.

| Parâmetro (Amostra)                 | Descrição                                                                                                                                                            | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha 1$ - antitripsina (Soro)    | Proteína (glicoproteína) da fase aguda com actividade anti-proteásica. Inactiva a elastase e collagenase dos neutrófilos                                             | ↑ - Resposta de fase aguda, doença hepática, estrogénios.<br>↓ - Deficiência genética, síndrome do desconforto respiratório neonatal, pancreatite severa, doenças que impliquem perda de proteínas. |
| $\alpha 1$ – microglobulina (Urina) | Glicoproteína da região $\alpha 1$ sintetizada no fígado. Filtrada no glomérulo e reabsorvida no túbulo proximal. Associada à resposta imunitária humoral e celular. | ↑ - Lesão tubular, nefropatias.                                                                                                                                                                     |

Tabela 3-3 – Interesse clínico proteínas da região das  $\alpha 2$ -globulinas.

| Parâmetro (Amostra)                 | Descrição                                                                                                         | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                      |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha 2$ – macroglobulina (Urina) | Glicoproteína inibidora de proteases. Transporta hormonas e inibe componentes do sistema complemento e hemostase. | ↑ - Estrogénios.<br>↓ - Pancreatite, úlcera péptica coagulação intravascular disseminada, fibrinólise, resposta de fase aguda. |

|                          |                                                                            |                                                                                                                                                                    |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Haptoglobulina<br>(Soro) | Liga-se e transporta a oxihemoglobina livre no plasma.                     | ↑ - Resposta de fase aguda (tardia), anti-inflamatórios, stress, depressão, síndrome nefrótica.<br>↓ - Hemólise intravascular, eritropoiese ineficiente, crianças. |
| Ceruloplasmina<br>(Soro) | Proteína de fase aguda. Principal proteína de transporte do cobre no soro. | ↑ - Resposta de fase aguda, estrogénios.<br>↓ - Doença de Wilson, Síndrome de Menke, insuficiência hepática, síndrome de perda de proteínas.                       |

Tabela 3-4 – Interesse clínico proteínas da região das  $\beta$ -globulinas.

| Parâmetro<br>(Amostra)              | Descrição                                                                                                                                                                                                                         | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Complemento C3c<br>(Soro ou plasma) | Forma inactivada de C3b. O C3 é o componente mais abundante e está presente nas vias de activação do complemento clássica e alternativa. Factor essencial para a lise celular mediada pelo complemento, opsonização e fagocitose. | ↑ - Resposta de fase aguda (tardia), obstrução biliar.<br>↓ - Doença autoimune (Lupus eritematoso sistémico, LES), glomerulonefrite aguda e membrano-proliferativa, sépsia, coagulação intravascular disseminada. |
| Complemento C4<br>(Soro ou plasma)  | Proteína da região $\beta$ . Factor essencial na via de activação do complemento clássica.                                                                                                                                        | ↑ - Resposta de fase aguda (tardia).<br>↓ - Deficiência genética (associada a deficiência de IgA). LES, sépsia e angioedema hereditário, crioglobulinémias.                                                       |

Tabela 3-5 – Interesse clínico proteínas da região das  $\gamma$ -globulinas.

| Parâmetro (Amostra)       | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                                       | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgA (Soro, plasma)        | Constitui cerca de 10-15% das imunoglobulinas do soro. Migra na região $\beta$ - $\gamma$ . A IgA secretória (dímero) é encontrada nas lágrimas, suor, saliva, leite e secreções gastrointestinais e brônquicas. Tem papel antimicrobiano. Existe em 2 subclasses: IgA1 e IgA2. | <p>↑ - Proliferação policlonal ou oligoclonal: hepatopatias, infecções agudas ou crônicas, doenças auto-imunes, infecções intra-uterinas ou perinatais (soro do cordão umbilical). Proliferação monoclonal: plasmocitomas, macroglobulinemia de Waldenstrom, e a doença das cadeias pesadas.</p> <p>Concentrações aumentadas de IgG na urina indicam proteinúria glomerular não selectiva.</p> <p>↓ - Insuficiências imunitárias secundárias (tumores malignos avançados, leucemia linfática ou mieloma múltiplo).</p> |
| IgM (Soro, plasma)        | Primeira imunoglobulina produzida na infecção primária e terceira imunoglobulina mais abundante do soro. Activa o complemento.                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| IgG (Soro, plasma, urina) | Principal imunoglobulina produzida pelas células plasmáticas. Neutraliza toxinas, activa o complemento e tem função antimicrobiana. Encontram-se caracterizadas 4 subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| IgD (Soro ou plasma)      | Constitui apenas 1% das imunoglobulinas do soro. Juntamente com a IgM é a principal imunoglobulina expressa pelos linfócitos B. Receptor de antígeno da superfície celular.                                                                                                     | ↑ - Mieloma de IgD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| IgE                       | Normalmente ligada aos mastócitos pelo que a sua concentração no soro é baixa. IgE é responsável pelo quadro clínico observado em alergias.                                                                                                                                     | ↑ - Mieloma de IgE, doenças parasitárias, imunodeficiências herdadas.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

| Parâmetro (Amostra)                                          | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Valores elevados (↑) e valores baixos (↓)   |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| IgA, IgG e IgM (LCR)                                         | As concentrações de proteínas séricas no LCR pelo que a detecção de variações podem indicar processos inflamatórios., perturbações da barreira e síntese de intratecal, usando a relação LCR/soro para albumina.                                                                                                                                                                                                                   | ↑ - Síntese intratecal                      |
| Cadeias leves livres e ligadas - $\kappa$ e $\lambda$ (Soro) | Constituintes da molécula de imunoglobulina. Produzidas numa proporção constante de $2\kappa:1\lambda$ . O ↑ da produção de Igs monoclonais ou de cadeias leves livres monoclonais altera esta proporção. Ao contrário das imunoglobulinas completas, as cadeias leves livres são filtradas no glomérulo e reabsorvidas a nível tubular logo, a sua presença na urina (proteína de Bence Jones) é indício de gamapatia monoclonal. | ↑ - Gamapatia monoclonal (mieloma múltiplo) |

### 3.1.2. Electroforese

#### 3.1.2.1. Electroforese das proteínas séricas

##### Fundamento

A electroforese é uma técnica que consiste na migração de partículas ou solutos carregados, em meio líquido, sob a influência do campo eléctrico. Nesta técnica, as proteínas carregadas migram em bandas, normalmente num meio de suporte poroso, como o gel de agarose, depois de a amostra ser misturada com solução tampão. As bandas das proteínas são quantificadas por densitometria. O fundamento da electroforese de proteínas consiste no facto de as proteínas, em solução aquosa, se comportarem tanto como ácidos ou bases, consoante o pH do tampão. As proteínas, em solução aquosa, possuem grupos carregados positivamente, (resíduos  $\text{NH}_3^+$ ) e grupos carregados negativamente (resíduos  $\text{COO}^-$ ). A pH ácido, o excesso de  $\text{H}^+$  vai impedir a

dissociação de ácido carboxílico (COOH), mantendo a proteína carregada positivamente, pelo que a sua migração ocorre para o cátodo. A pH alcalino (o usado) sai um próton de  $\text{NH}_3^+$  passando a  $\text{NH}_2$ , deixando a proteína carregada negativamente, pelo que a sua migração ocorre para o ânodo. Além disso, a mobilidade electroforética, não só depende da carga mas também do peso molecular das proteínas, migrando mais depressa as que têm menor peso molecular. A resolução da electroforese depende do potencial eléctrico aplicado, temperatura, pH (composição e força iónica de tampão), tipo de meio de suporte, quantidade e modo de aplicação da amostra e tempo corrida.

Na electroforese de proteínas séricas, as proteínas são separadas em meio alcalino (pH 9,1) e coradas com negro de amido, sendo o excesso de corante eliminado em meio ácido. No final é obtido um perfil electroforético (Figura 3-1) das proteínas séricas em 5 bandas: albumina,  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas,  $\gamma$ -globulinas.

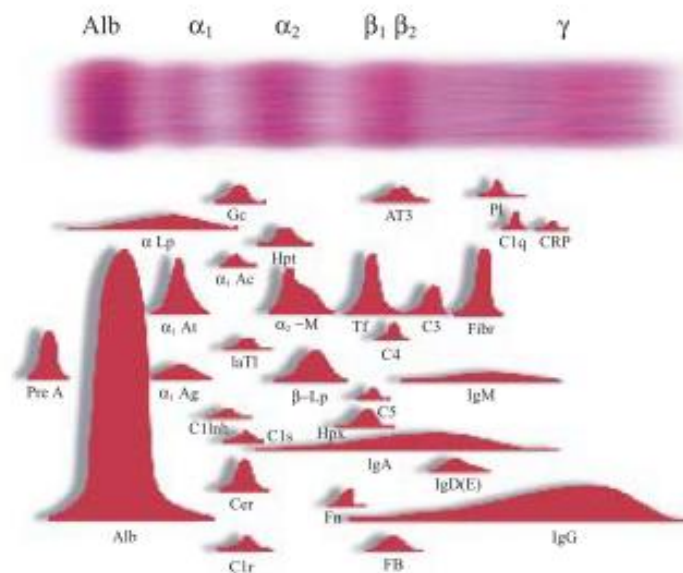


Figura 3-1 – Perfil electroforético das proteínas séricas.

### Amostra

Soro

### Equipamento e reagentes

- Aplicador de amostras automático – Hydraplus (Sebia);
- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia);
- Densitómetro/scanner com software Phoresis (Sebia);

- Kit HYDRAGEL 54 PROTEIN (E) da Sebia.

### Parâmetros

As proteínas séricas visualizadas e quantificadas por electroforese são:

- Albumina;
- $\alpha_1$ -globulinas -  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida,  $\alpha_1$ -fetoproteína;
- $\alpha_2$ -globulinas -  $\alpha_2$ -macroglobulina, haptoglobulina e ceruloplasmina.
- $\beta$ -globulinas – transferrina, ferritina, proteínas do complemento C3 e C4;
- $\gamma$ -globulinas – imunoglobulinas e proteína C reactiva (PCR).

Em soros frescos, poderá ser possível visualizar uma 6ª banda junto à banda  $\beta$  ( $\beta_2$ ) ou imediatamente antes da banda da albumina, correspondente à pré-albumina. A quantificação relativa (em percentagem) das fracções proteicas é feita por densitometria.

### Interesse clínico

Na seguinte tabela encontra-se a descrição e interpretação de cada banda visualizada no gel.

Tabela 3-6 – Descrição e interesse clínico de cada banda da electroforese de proteínas séricas (Bula).

| Banda                 | Interpretação                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Albumina              | Banda homogénea e bem definida. Duplicação da banda ocorre no caso de bisalbuminémia, uma condição genética hereditária. Diminuição da banda juntamente com diminuição de $\gamma$ e aumento de $\alpha_2$ globulinas poderá indicar proteinúria selectiva no síndrome nefrótico. |
| $\alpha_1$ -globulina | Banda homogénea e bem definida. Duplicação pode indicar variante genética ou componente monoclonal. Aumento da banda juntamente com $\alpha_2$ sugere reacção de fase aguda.                                                                                                      |
| $\alpha_2$ -globulina | Banda larga e intensa. Variações associadas à reacção de fase aguda.                                                                                                                                                                                                              |
| $\beta$ -globulina    | Banda difusa. Proteína Bence Jones apresenta mobilidade $\beta$ .                                                                                                                                                                                                                 |

| Banda       | Interpretação                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| γ-globulina | Banda difusa com intensidade maior no centro. Um aumento equivale a hipergamaglobulinémia policlonal devido ao aumento de imunoglobulinas. Várias bandas finas podem corresponder ao padrão oligoclonal transitório no início da doença infecciosa. Um aumento difuso da zona ocorre na cirrose, e uma ligação β e γ à cirrose alcoólica. Uma banda fraca no início da banda pode corresponder à PCR numa reacção de fase aguda. |

### 3.1.2.2. Electroforese de hemoglobinas

As hemoglobinas (Hb) humanas são tetrâmeros constituídos por dois pares de diferentes globinas (duas do tipo α e duas do tipo β). Um adulto normal possui Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e hemoglobina fetal (Hb F) residual ( $\alpha_2\gamma_2$ ). No entanto, devido a mutações genéticas, podem ocorrer variantes estruturais de hemoglobina ou diminuição/anulação da expressão de um gene. Nas mutações *missense* ocorre alteração estrutural da proteína, o que leva a uma variante de hemoglobina, designada de hemoglobinopatia do tipo qualitativo, como é o exemplo das Hb S, Hb C, Hb D. Nas mutações *frameshift*, *nonsense* e *splicing*, ocorre ausência ou diminuição de síntese de uma cadeia globínica, o que leva a ocorrência de talassémia, sendo as patologias designadas de hemoglobinopatias do tipo quantitativo. A persistência hereditária de hemoglobina fetal também se trata de uma hemoglobinopatia do tipo quantitativo.

#### Fundamento

A electroforese de hemoglobinas consiste na separação, em meio alcalino (pH 8,5), das hemoglobinas normais (A e A<sub>2</sub>) permitindo a detecção das variantes de hemoglobina (HbS, HbC, HbE e HbD) e das anomalias do tipo talassémia que apresentam alterações quantitativas das hemoglobinas normais. A electroforese é feita com hemolisado de eritrócitos. As hemoglobinas são coradas com uma solução de negro de amido e o excesso de corante removido com uma solução de ácido. As electroforeses resultantes são avaliadas por densitometria, o que dá uma quantificação relativa e precisa das hemoglobinas com interesse particular, como é o caso da HbA<sub>2</sub> no diagnóstico da β-Talassémia.

Na figura seguinte encontram o perfil electroforético das hemoglobinas que podem ser visualizadas:



Figura 3-2 – Perfil electroforético das hemoglobinas normais e anormais. A<sub>0</sub>- fracção não glicosilada da hemoglobina A normal do adulto. A<sub>1</sub>- fracção glicosilada da hemoglobina A normal do adulto.

### Amostra

Amostras de sangue colhidas com anticoagulante.

### Equipamento e reagentes

- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia);
- Densitómetro/scanner com software Phoresis (Sebia);
- Kit HYDRAGEL7 HEMOGLOBIN (E) da Sebia.

### Interpretação

Nas tabelas seguintes está descrito o interesse clínico da determinação e quantificação das hemoglobinopatias qualitativas (tabela 1-7) e hemoglobinopatias quantitativas (tabela 1-8) estudadas no laboratório de imunologia.

Tabela 3-7 – Descrição e fenótipo de algumas hemoglobinopatias qualitativas.

| Hemoglobinopatia | Mutação                                                                              | Fenótipo/Patologia                                                                                                                                                                                           |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hb S             | G <u>A</u> G>G <u>T</u> G (Ácido Glutâmico > Valina) no codão 6 do gene da β-globina | Heterozigotia - indivíduos clinicamente normais;<br>Homozigotia – anemia hemolítica crónica com gravidade variável: vaso-oclusões recorrentes, AVC, necrose da cabeça do fémur e húmero, úlceras nas pernas. |

| Hemoglobinopatia | Mutação                                                                                                                                       | Fenótipo/Patologia                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hb D             | <u>G</u> AA> <u>C</u> AA (Ácido Glutâmico > Glicina) no codão 121 do gene da $\beta$ -globina.                                                | Heterozigotia – indivíduos clinicamente normais;<br>Homozigotia – fenótipo clínico suave devido a uma anemia hemolítica suave. Alguns apresentam esplenomegália;<br>Hb D + $\beta$ -talassémia – fenótipo de talassémia suave a moderada;<br>Hb D + Hb S - anemia hemolítica crónica tipo drepanocitose mais suave. |
| Hb C             | <u>G</u> AG> <u>A</u> AG (Ácido glutâmico > Lisina) no codão 6 do gene $\beta$ -globina                                                       | Heterozigotia – fenótipo normal ou ligeira microcitose.<br>Homozigotia – anemia hemolítica crónica, microcitose                                                                                                                                                                                                     |
| Hb E             | <u>G</u> AG> <u>A</u> AG, (Ácido glutâmico > Lisina) no codão 26 do gene $\beta$ -globina. Síntese ↓ da globina por afectar o <i>splicing</i> | Heterozigotia – Talassémia com microcitose e hipocromia.<br>Homozigotia - Anemia moderada com microcitose e hipocromia acentuadas.                                                                                                                                                                                  |

Tabela 3-8 - Descrição e fenótipo das hemoglobinopatias quantitativas.

| Hemoglobinopatia                                 | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Fenótipo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ - talassémia                             | Síntese deficiente da cadeia $\beta$ -globina, com redução de tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ . As cadeias $\alpha$ -globina em excesso precipitam nos precursores eritrocitários formando corpos de inclusão.                                                                                  | Talassémia major – anemia muito grave, eritropoiese ineficaz. HbA <sub>2</sub> pode estar normal ou ligeiramente aumentada.<br>Talassémia minor – geralmente assintomático. Quadro hematológico típico: GV $\uparrow$ , microcitose, hipocromia, HbA <sub>2</sub> > 3,5%.                                               |
| $\alpha$ - Talassémia                            | Síntese deficiente da cadeia $\alpha$ -globina, com redução de tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ . As cadeias $\beta$ em excesso agregam-se formando homotetrâmeros $\beta_4$ (HbH) que precipitam à medida que o eritrócito envelhece. Anemia devido à redução do tempo de vida dos eritrócitos. | Delecções:<br>- $\alpha/\alpha\alpha$ – Assintomático ou ligeira microcitose, hipocromia e Hb A <sub>2</sub> normal.<br>-- $\alpha/\alpha$ – Ligeira anemia, microcitose e hipocromia e Hb A <sub>2</sub> normal.<br>-- $\alpha$ – anemia microcítica e hipocrômica moderada a grave.<br>--- - Incompatível com a vida. |
| Persistência hereditária de hemoglobina F (HPFH) | Níveis elevados de Hb F devido a delecções nos genes $\delta$ e $\beta$ -globina ou mutações pontuais nos promotores dos genes $\gamma$ -globínicos, impedindo a ligação de factores silenciadores de expressão desses genes na vida adulta.                                                | Parâmetros hematológicos normais com Hb F aumentada.                                                                                                                                                                                                                                                                    |

### 3.1.3. Imunofixação

#### 3.1.3.1. Imunofixação do soro

##### Fundamento

A imunofixação é executada com o objectivo de identificar as bandas monoclonais detectadas na electroforese das proteínas séricas. Estas bandas, normalmente situadas na zona  $\beta$  ou  $\lambda$  globinas, correspondem a imunoglobulinas monoclonais, marcadores de gamopatias (cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM) e cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (livres e ligadas)).

A imunofixação consiste na separação das proteínas por electroforese e posterior fixação com antisoro monoespecífico (anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-kappa e anti-lambda) que é depositado directamente sobre a superfície do gel, ao longo do eixo de migração electroforética, para que ocorra a formação do imunocomplexo. Os complexos antígeno-anticorpo resultantes são retidos na estrutura porosa do gel e corados com violeta ácido, sendo o excesso removido em meio ácido. De maneira a identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais, as amostras são testadas simultaneamente em seis pistas. Uma pista é usada como referência (ELP), usando-se um antisoro poliespecífico de forma a produzir um padrão de referência electroforético de proteínas enquanto as restantes cinco pistas permitem a caracterização das bandas monoclonais graças aos antisoros específicos. A interpretação é feita através da observação visual das bandas coradas.

##### Equipamento e reagentes

- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia);
- Densitómetro/scanner com software Phoresis (Sebia);
- Kit HYDRAGEL 4 IF da Sebia.

##### Amostra

Soro

##### Interpretação

As bandas possíveis de se observar na imunofixação do soro são:

**Ausência de banda monoclonal** - zona corada difusa de imunoglobulinas policlonais em todas as pistas, sendo característica de um soro normal. Uma

hipergamaglobulinémia é caracterizada por uma zona difusa fortemente corada, sem apresentar bandas estreitas.

**Presença de uma banda monoclonal** - Banda estreita detectada com um dos antisoros anti-cadeias pesadas ( $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ) e/ou com um dos antisoros anti-cadeias leves,  $\kappa$  ou  $\lambda$ . A banda monoclonal detectada, geralmente estreita e bem visível, deve estar localizada ao mesmo nível de migração que a banda presente na pista de referência (ELP). Ausência de reacção com qualquer dos antisoros anti-cadeias pesadas e reacção com um dos antisoros anti-cadeias leves pode dever-se a:

- Presença de uma cadeia leve livre (confirmada com o antisoro anti-cadeias leves livres);
- Gamapatia a IgD ou IgE (confirmada com o antisoro anti-cadeias pesadas  $\delta$  e  $\epsilon$ ).

**Presença de duas ou mais bandas monoclonais** - A presença de duas ou mais bandas monoclonais pode-se dever a:

- Proliferação de vários clones de células B, que se caracteriza pela presença de duas cadeias pesadas (idênticas ou diferentes) e duas cadeias leves (idênticas ou diferentes)
- Polimerização de imunoglobulinas em que se verificam várias bandas na pista de uma mesma cadeia pesada e na pista de uma mesma cadeia leve (necessário despolimerizar e repetir a imunofixação para confirmar a presença de uma anomalia monoclonal);
- Gamapatia oligoclonal caracterizada pela presença de múltiplas bandas de um ou mais tipos de cadeias pesadas e por um ou dois tipos de cadeias leves.

**Casos especiais** – Uma fracção do tipo monoclonal é observada na electroforese do soro (faixa ELP) mas não confirmada por imunofixação pode dever-se a presença de fibrinogénio. Uma fracção do tipo monoclonal observada em todas as pistas e ao mesmo nível pode dever-se a presença de crioglobulina ou de IgM polimerizada.

#### 3.1.3.2. Imunofixação de Bence-Jones

A proteína Bence Jones é a designação para cadeias leves livres detectadas na urina. Nas gamopatias monoclonais os plasmócitos neoplásicos podem produzir cadeias leves livres em grande quantidade. Estas proteínas, de baixo peso molecular, têm uma semi-vida de 2-6 horas e são rapidamente filtradas pelo glomérulo renal e posteriormente

reabsorvidas pelos túbulos proximais dos nefrónios, só aparecendo na urina quando a sua quantidade está muito aumentada de forma a saturar os mecanismos de reabsorção.

### Fundamento

A imunofixação de Bence-Jones é usada para detectar e identificar as proteínas Bence Jones, ou cadeias leves livres monoclonais ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ) no soro e urina. O fundamento é idêntico ao da imunofixação do soro, diferindo apenas nos antisoros aplicados que são: antisoro trivalente anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (Ig G),  $\alpha$  (Ig A) e  $\mu$  (Ig M), anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (livres e ligadas), anti-cadeias leves livres  $\kappa$  e  $\lambda$ .

### Amostra

Soro e urina

### Equipamento e reagentes

- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia);
- Densitómetro/scanner com software Phoresis (Sebia);
- Kit HYDRAGEL 4 IF da Sebia.

### Interpretação

Os resultados possíveis são:

**Presença de proteína de Bence Jones** - banda monoclonal de cadeias leves (livres e ligadas)  $\kappa$  ou  $\lambda$  (pistas K ou L) e outra nas cadeias leves livres (Kf e Lf).

**Presença de uma paraproteína do soro eliminada na urina associada à proteína de Bence Jones:**

- Uma banda monoclonal detectada com o antisoro trivalente;
- Duas bandas nas cadeias leves (livre e ligada)
- Uma banda numa das cadeias leves livres (pista Kf, por exemplo) e outra noutra cadeia leve livre (Lf) e uma banda detectada por um dos antisoros anti-cadeia leve livre.

**A presença de uma paraproteína do soro na urina, não estando presente uma proteína de Bence Jones** - banda monoclonal detectada com o antisoro trivalente; uma banda monoclonal que migrou ao mesmo nível da anterior detectada com um dos

antisoros anti-cadeias leves (livre e ligada) e ausência de banda na pista do antisoro anti-cadeia leve livre correspondente.

**A presença de uma proteína de Bence Jones polimerizada** - várias bandas reveladas com um dos antisoros anti-cadeias leves livre e ligada ou várias bandas, que migram ao mesmo nível, detectadas com o antisoro anti-cadeia leve livre correspondente.

### 3.1.3.3. Imunofixação do LCR

#### Fundamento

A imunofixação do LCR permite a comparação da migração electroforética das IgG, IgA e IgM e das cadeias leves ligadas  $\kappa$  e  $\lambda$  no soro e LCR do mesmo doente e têm como objectivo pôr em evidência um perfil oligoclonal específico das imunoglobulinas do LCR. A técnica é um procedimento de imunofixação realizado com anti-soros anti-IgG marcados com uma enzima, após electroforese em gel de agarose. Um perfil diferente das imunoglobulinas no LCR e no soro ou a presença de bandas suplementares, monoclonais ou oligoclonais no LCR, permite concluir que houve uma síntese intratecal de imunoglobulinas associada na maioria dos casos à classe IgG.

A imunofixação do LCR permite o diagnóstico de doenças desmyleinizantes do SNC, especialmente a esclerose múltipla.

#### Equipamento e reagentes

- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia);
- Kit HYDRAGEL 3 CSF da Sebia.

#### Amostra

Soro e LCR

#### Interpretação

Os resultados possíveis encontram-se na seguinte figura:

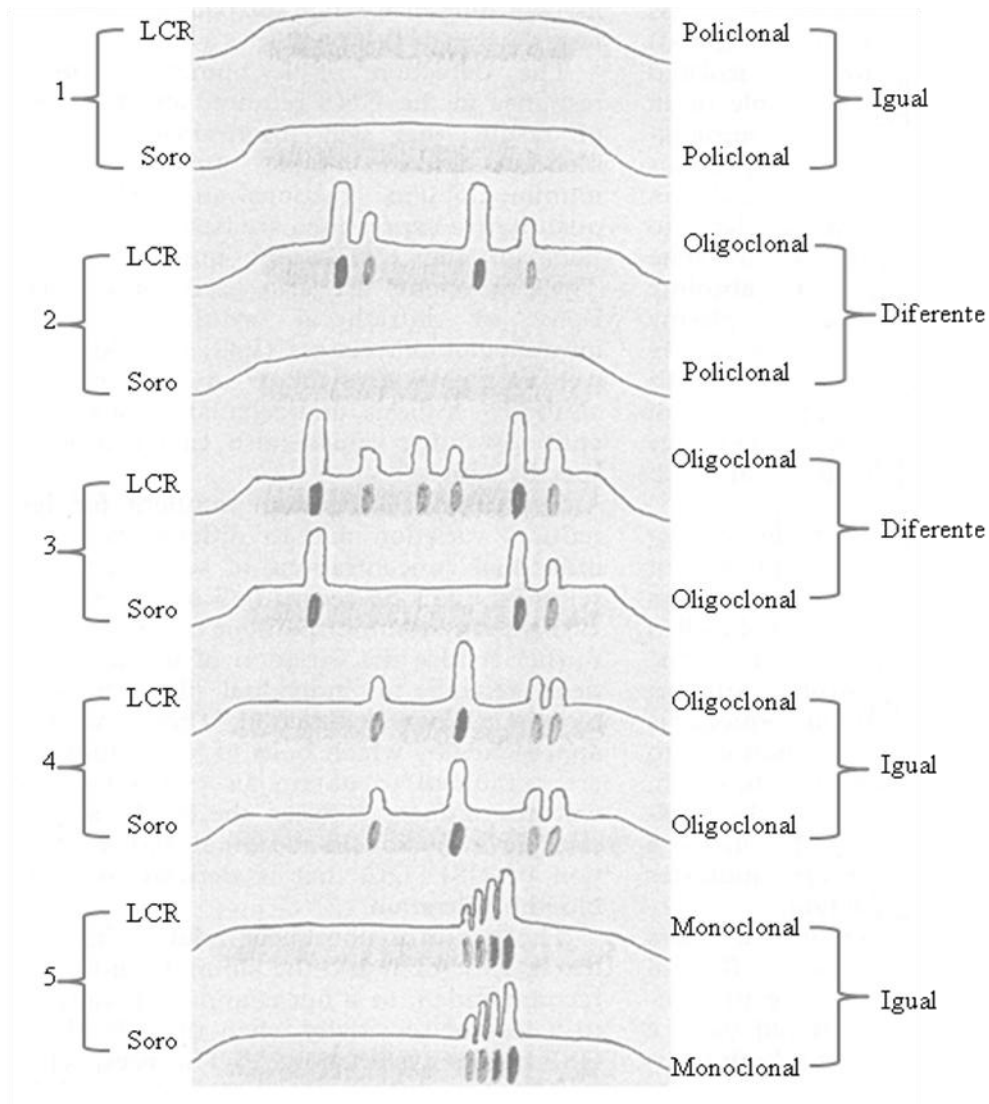


Figura 3-3 – Perfis possíveis de imunofixação no soro e LCR. 1- Normal; 2- Esclerose múltipla; 3 – Esclerose múltipla e inflamação cerebral na doença sistêmica; 4 – Inflamação sistêmica; 5- Mieloma ou gamapatia monoclonal. Adaptado de sebia

#### 3.1.4. Estudo das proteínas do LCR

A maioria das proteínas do LCR (80%) provém do plasma por ultrafiltração e as restantes são sintetizadas *de novo* pelas células dos plexos coróides.

A elevação das proteínas no LCR pode indicar uma ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) e/ou síntese intratecal de imunoglobulinas. A alteração da permeabilidade da BHE ocorre por exemplo no caso de meningite, encefalite, tumor e hemorragia intracraniana.. A síntese intratecal de imunoglobulinas ocorre em doenças do sistema nervoso central (SNC) como a esclerose múltipla, neurosífilis, linfoma, etc.

Para determinar a origem dos níveis elevados de IgG, IgA ou IgM, efectua-se o doseamento das imunoglobulinas e da albumina, por nefelometria, no soro e LCR e

calcula-se a razão imunoglobulina/albumina e o índice de imunoglobulina. Uma vez que a albumina não é produzida no SNC, valores elevados de imunoglobulinas e albumina indicam lesão da BHE e a razão será semelhante à do LCR normal. Pelo contrário, se houver produção intratecal, a razão imunoglobulina/albumina encontra-se aumentada.

### 3.2. Serologia

#### 3.2.1. Serologia para *Salmonella*

A *Salmonella* é um bacilo gram negativo, transmitido através da ingestão de comida e água contaminada, responsável por intoxicações alimentares, febres tifóides e paratifóides.

A febre tifóide é causada por *Salmonella typhi* e as febres paratifóides por *Salmonella paratyphi* A, B ou C.

O género *Salmonella* é subdividido em mais de 1500 serótipos, com diferentes combinações de antigénios. Os antigénios podem ser divididos em dois tipos: somáticos e flagelares. Os antigénios somáticos são o antigénio O, presente em todas as espécies de *Salmonella* e o antigénio vi, presente apenas na *S. typhi* e *S. paratyphi* C. Os antigénios flagelares H estão ligados aos flagelos.

##### 3.2.1.1. Reacção de Widal

###### Fundamento

No laboratório de imunologia o diagnóstico da febre tifóide e paratifóide é feito através da Reacção de Widal. A técnica consiste na aglutinação directa em placa entre antigénios somáticos (O) e flagelares (H) de *Salmonella typhi*, grupo D e *Salmonella paratyphi*, grupo A e B e as aglutininas do soro do paciente, usando diluições de soro 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320.

###### Equipamento/material/reagentes

- Teste de antigénios febris (BD);
- Placas de vidro para técnicas de aglutinação directa.

###### Amostra

Soro

### Interpretação

A aglutinação positiva pode ocorrer em pacientes saudáveis devido a imunização prévia causada por uma infecção do passado ou a presença de antígenos relacionados (reação cruzada). No entanto, a titulação nestes casos é, no geral, menor e sem grandes variações. No caso de infecção activa ou imunização recente, as titulações detectadas são mais elevadas e tendem a aumentar, pelo que é necessário avaliar duas ou mais amostras de soro colhidas em intervalos de 3 a 5 dias do início da doença. Um aumento progressivo do título de anticorpos é a principal evidência de infecção activa ou imunização recente.

### 3.2.2. Serologia para *Treponema pallidum*

A sífilis, infecção sexualmente transmissível, é causada pela espiroqueta *Treponema pallidum*. A infecção é, normalmente, adquirida por contacto sexual, podendo também ser transmitida ao feto (infecção congénita) no caso de infecção primária durante a gravidez. Trata-se de doença de evolução crónica que se caracteriza pelo aparecimento de lesões granulomatosas ulceradas na pele e mucosas na região genital, perianal, inguinal e, eventualmente, noutros órgãos internos.

A doença, na ausência de diagnóstico e tratamento, tem a seguinte evolução: sífilis primária caracterizada pelo aparecimento de uma lesão ulcerada, não dolorosa, de base endurecida, com secreção serosa escassa (cancro duro); sífilis secundária, em que predominam as manifestações sistémicas, que se podem complicar afectando o sistema nervoso e cardiovascular na fase terciária.

O diagnóstico da sífilis pode ser feito através da detecção de anticorpos que reagem *in vitro* com uma suspensão coloidal de lípidos (métodos não treponémicos) ou com antígenos de *Treponema pallidum* (métodos treponémicos).

#### 3.2.2.1. Testes não treponémicos

Os métodos não treponémicos são inespecíficos e detectam anticorpos IgG e IgM contra lípidos (cardiolipina, lecitina e colesterol) da superfície celular de *Treponema pallidum*. Os testes mais usados são o VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*). Ambos medem a floculação dos antígenos lipídicos com o soro dos doentes infectados. O RPR utiliza partículas de carvão activado com os antígenos adsorvidos levando a uma reacção visível a olho nu. Os testes não treponémicos são utilizados na

monitorização da eficácia da terapêutica com antibióticos e no diagnóstico da neurosífilis. Permitem diagnosticar sífilis apenas a partir da 2ª ou 3ª semana pós-infecção. Podem ocorrer falsos positivos devido ao aparecimento de anticorpos antilipídicos, em resposta a doenças não treponémicas, pelo que requerem a confirmação dos resultados pelos métodos treponémicos. Com estes testes, os resultados tornam-se negativos 6 a 20 meses após tratamento eficaz.

#### 3.2.2.2. Testes treponémicos

Os testes treponémicos utilizam como antígeno *Treponema pallidum*, sendo mais específicos que os anteriores. Os testes usados são o FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*), o TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination*) e a metodologia imunoenzimática (ELISA).

O TPHA é um imunoensaio, em microplaca, que utiliza as propriedades aglutinantes específicas dos anticorpos anti-*Treponema*. A presença de anticorpos anti-*Treponema* nas amostras de soro provoca hemaglutinação do reagente revelador (hemácias de galinha sensibilizadas com antígenos de *T. pallidum*) que se traduz na formação de um halo mais ou menos alargado de cor vermelho acastanhado que cobre a cúpula da placa. Deste teste podem resultar ocasionalmente falsos positivos, devido a situações como toxicod dependência, lepra, mononucleose infecciosa e doenças autoimunes.

O teste ELISA é usado para a determinação quantitativa *in vitro* de anticorpos IgG/IgM anti-*Treponema pallidum* em soro ou plasma humano. O teste é em tudo semelhante ao método ELISA explicado noutros capítulos.

#### 3.2.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico clínico de Sífilis não deve realizar-se tendo em conta o resultado de um único ensaio, mas deve resultar de um conjunto integrado de dados clínicos e laboratoriais. De acordo com as últimas *guidelines* publicadas, o laboratório de imunologia estabeleceu o seguinte protocolo para o diagnóstico serológico da sífilis:

##### Teste de diagnóstico

Testes recomendados – EIA (IgG e IgM) ou TPHA.

Não são recomendados testes não-treponémicos como testes de rastreio devido ao elevado número de falsos negativos associados ao fenómeno pró-zona. O laboratório

optou por um teste de MicroElisa (IgG e IgM) por ser sensível na infecção primária e automatizado (MAGO da Diamedix).

#### Teste confirmatório

Testes recomendados – TPHA (Quilaban).

Após o diagnóstico, é recomendado como teste confirmatório, um teste treponémico diferente do usado no rastreio (de preferência com sensibilidade semelhante e maior especificidade).

#### Monitorização terapêutica

Teste recomendado – teste não treponémico semi-quantitativo.

O laboratório optou pelo teste RPR. O *follow-up* deve ser feito 1,2,3,6 e 12 meses após o início do tratamento e o título deve diminuir quatro vezes nos primeiros 6 meses

### 3.2.3. Serologia para *Brucella*

A brucelose, também conhecida por febre do Mediterrâneo, febre de Malta, febre de Gibraltar, febre de Chipre, doença de Bang e febre ondulante é uma infecção bacteriana causada pelo bacilo gram negativo intracelular *Brucella*. A *Brucella* é endémica de animais de quinta como a vaca, cabra, carneiro e porco. A doença é transmitida aos humanos através de contacto directo com os animais infectados ou através da ingestão de leite ou produtos lácteos contaminados. A brucelose é muitas vezes assintomática, sendo a manifestação mais frequente a febre acompanhada de cefaleia, mialgias, artralgias, astenias, calafrios e suores.

Na luta contra a doença, o organismo induz a resposta inflamatória que termina na formação de granulomas principalmente no fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea. Pode haver orquite intersticial com áreas de fibrose e atrofia fibróide, endocardite, lesões granulomatosas no miocárdio e envolvimento do cérebro (sintomas psiconeuróticos), rins e pele. O período de incubação dura 10 a 14 dias mas a doença pode ser assintomática, podendo, após um período de incubação de uma a três semanas, ou até de vários meses, surgir manifestações iguais às encontradas em todas as doenças febris: febre contínua ou intermitente, artralgia, fraqueza, fadiga, perda de peso, falta de apetite, dor de garganta e tosse seca que surgem subitamente em três dias ou mais gradualmente, em uma semana.

A 3 espécies de *Brucella* patogénicas para o Homem são a *B. abortus*, que infecta a vaca, *B. melitensis* que infecta a cabra e *B. suis* que infecta o porco.

O diagnóstico da brucelose é normalmente dirigido para a *Brucella abortus* e pode ser feito através de isolamento e identificação da bactéria a partir de hemoculturas ou mieloculturas (valência de microbiologia) ou com base nos anticorpos anti-*Brucella* que o organismo produz

#### 3.2.3.1. Pesquisa de anticorpos totais anti-*Brucella abortus* (BrucellaCapt)

##### Fundamento

A pesquisa de anticorpos totais anti-*Brucella* consiste na detecção de anticorpos aglutinantes e não aglutinantes ou incompletos em relação à *Brucella abortus*. Os anticorpos incompletos são da classe IgG e IgA e surgem de forma persistente em níveis séricos elevados na brucelose crónica, pelo que a sua pesquisa é utilizada na detecção das formas crónicas de brucelose. Estes anticorpos não apresentam capacidade de aglutinação, pelo que é necessário adicionar um anticorpo anti-imunoglobulina humana de forma a detectar reacção. O teste consiste num método de imunocaptura e aglutinação executado em microplacas com poços em U revestidos com imunoglobulinas anti-humanas. A aglutinação é positiva quando há captura dos anticorpos do soro da amostra pela imunoglobulinas da placa e quando há ligação dos anticorpos com o antígeno posteriormente adicionado.

##### Amostra

Soro

#### 3.2.3.2. Reacção de Huddleson

##### Fundamento

A reacção de Huddleson é uma reacção de aglutinação directa em placa para a detecção de anticorpos aglutinantes (aglutininas). O teste consiste na aglutinação directa entre as aglutininas do soro do paciente e o antígeno homólogo, neste caso, *B. abortus* do reagente. É um teste rápido, recomendado para pesquisar presença de anticorpos anti-*Brucella* essencialmente da classe IgM mas também IgG no soro dos doentes com suspeita clínica de brucelose.

### Amostra

Soro

### Interpretação

A aglutinação positiva pode ocorrer em pacientes saudáveis devido a imunização prévia causada por uma infecção do passado ou a presença de antígenos relacionados (reação cruzada). No entanto, a titulação nestes casos é, no geral, menor e sem grandes variações. No caso de infecção activa ou imunização recente, as titulações detectadas são mais elevadas e tendem a aumentar.

#### 3.2.4. Serologia para *Streptococcus pyogenes*

O género *Streptococcus* engloba um grupo de cocos gram positivo, normalmente dispostos em cadeia ou em pares. O *Streptococcus* do grupo A de Lancefield, conhecido como *Streptococcus pyogenes* é o principal agente causal de infecções bacterianas da garganta (faringite e tonsilite) e da pele (piodermite e impetigo). Além disso é responsável por sequelas não supurativas como a escarlatina, febre reumática, endocardite bacteriana e glomerulonefrite aguda.

Esta bactéria possui uma elevada virulência, muitas vezes mediada pela proteína M, no entanto podem ainda ser produzidas toxinas e enzimas que vão aumentar a resposta inflamatória.

##### 3.2.4.1. Determinação do título de anticorpos anti-estreptolisina O (TASO)

O *Streptococcus pyogenes* produz várias proteínas, algumas com actividade enzimática, entre as quais, a estreptolisina O. A estreptolisina O é uma proteína hemolítica no estado reduzido mas que é rapidamente inactivada na presença de oxigénio. Trata-se de uma proteína fortemente antigénica.

### Fundamento

A estreptolisina O é um parâmetro sensível que se encontra elevado em 80 a 85% dos casos de doença. A resposta de anticorpos só ocorre na segunda ou terceira semana após uma infecção aguda e atinge o máximo após 4 a 5 semanas. O método de detecção da estreptolisina O é imunonefelometria reforçada com partículas de polistireno – látex. As partículas de poliestireno carregadas com estreptolisina O, ao reagirem com os

anticorpos anti-estreptolisina O, formam agregados, que dispersam a luz radiada. A concentração do analito é então proporcional à intensidade de luz dispersa que é detectada por um espectrofotómetro.

#### Equipamentos e reagentes

BN ProSpec (Siemens)

#### Amostra

Soro

### 3.2.5. Serologia para *Aspergillus*

O *Apergillus* é um fungo saprófito capaz de causar da doença no Homem. A espécie mais comum de causar infecção é *Aspergillus fumigatus*, para além de *A. flavus*, *A. niger*. A doença é causada pela inalação dos esporos de *Aspergillus* e manifesta-se consoante o estado imunológico do hospedeiro, desde asma extrínseca, aspergilose broncopulmonar alérgica, apergiloma pulmonar a aspergilose invasiva ou disseminada. A aspergilose invasiva ou disseminada é uma condição que afecta, mais frequentemente, pacientes imunodeprimidos. Trata-se de uma patologia muitas vezes fatal que se apresenta, inicialmente, como pneumonia aguda que, posteriormente, dissemina para o tracto gastrointestinal, cérebro, fígado, rins, coração e pele.

#### 3.2.5.1. Deteccção do antígeno galactomananos do *Aspergillus*

No laboratório de imunologia, o diagnóstico de aspergilose invasiva consiste na detecção do antígeno galactomanano, um componente da parede do *Aspergillus*, através da técnica ELISA-sandwich Platelía executada no equipamento Evolis Twin Plus (Bio-Rad). Inicialmente procede-se a um tratamento prévio das amostras de soro pelo calor em presença de EDTA para dissociar os complexos imunes e precipitar as proteínas que possam interferir com o teste. Os resultados são semi-quantitativos e apresentados sob a forma de um índice a partir do qual é possível estabelecer um resultado qualitativo (positivo ou negativo). O resultado não deve ser utilizado isoladamente mas sim em conjunto com os dados clínicos que suportem a interpretação.

### 3.2.6. Serologia para *Echinococcus granulosus*

A hidatidose é causada por o parasita helminta, *Echinococcus granulosus*. Trata-se de um parasita obrigatório do intestino dos carnívoros, hospedeiro definitivo do cão e tem como hospedeiro intermediário os herbívoros e, acidentalmente, o Homem.

O resultado da infecção por *Echinococcus granulosus* é um quisto hidático constituído pela larva (hidátide) fixada num órgão (fígado, pulmões, músculo, baço, etc) e uma membrana adventícia, devido á reacção do órgão infectado. Esta membrana adventícia tende a fixar sais de cálcio, formando placas calcárias visualizadas por raio X.

#### 3.2.6.1. Hemaglutinação indirecta

No laboratório de imunologia é usada a reacção de hemaglutinação indirecta entre anticorpos específicos do soro da amostra com eritrócitos sensibilizados com antígenos do parasita, usando o kit *Echinococcus Fumouze* (Fumouze Diagnostics). A técnica é em tudo semelhante ao teste TPHA usado no teste confirmatório da sífilis. Os títulos inferiores 1/160 indicam reacções não significativas ou quisto antigo calcificado e pouco evolutivo. Os títulos iguais ou superiores a 1/160 são clinicamente significativos e os títulos superiores a 1/320 indicam reacção significativa e sugerem hidatidose evolutiva.

### 3.2.7. Serologia para o vírus Epstein-Barr

A mononucleose infecciosa (MI) é a infecção mais comum causada pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Mais frequente nos jovens adultos, tem como sintomas febre constante, faringite e linfadenopatia difusa, além de fadiga, astenia e hepatoesplenomegália, também muitas vezes presentes. A infecção é transmitida através de saliva.

O vírus entra no organismo através da cavidade oral e replica-se no epitélio da orofaringe e glândulas salivares. Os linfócitos B infectados difundem-se, a partir da orofaringe, quer pela via linfática, quer pela sanguínea, atingindo locais distantes onde formam focos de infoproliferação. Após a primo-infecção, o vírus permanece latente num pequeno número de linfócitos B, podendo ser reactivado e eliminado de forma intermitente. Os linfócitos T respondem às células B infectadas especialmente através

da activação e proliferação das células T supressoras (CD8), levando ao aparecimento de linfócitos atípicos no sangue periférico.

#### 3.2.7.1. Monospot

##### Fundamento

No laboratório de imunologia o diagnóstico da MI é feito através da determinação semi-quantitativa de anticorpos heterófilos associados à MI, usando o kit Avitex (Omega diagnostics). Trata-se de um teste de aglutinação em lâmina, que utiliza as propriedades aglutinantes específicas dos anticorpos do soro (ou plasma) do doente, em presença dos antigénios extraídos das hemácias bovinas, comuns a antigénios do EBV, que revestem partículas de látex. A presença de anticorpos específicos no soro do doente provoca aglutinação do reagente, que se traduz na formação de floculação.

##### Equipamento e reagentes

Kit Avitex (Omega diagnostics)

##### Amostra

Soro

##### Interpretação

Com este teste podem surgir falsos negativos, associados a situações em que o paciente permanece negativo para anticorpos heterófilos ou, eventualmente, apresenta resposta tardia a este tipo de anticorpos. A interpretação dos resultados deve ser cuidadosa e enquadrada no contexto clínico pois estes anticorpos têm ainda sido associados a patologias mais graves como: Linfoma de Burkitt, carcinoma pancreático; hepatites virais; infecções por citomegalovírus (CMV), entre outras. Além disso, a prevalência destes anticorpos pode estender-se a meses ou anos depois do desaparecimento dos sintomas e da fase aguda da doença resultando de uma cicatriz imunológica e não um marcador de doença.

#### 3.2.8. Titulação do factor reumatóide

O FR trata-se de um anticorpo, predominantemente IgM, que reage com a porção Fc de IgG humana. Encontra-se aumentado em doenças autoimunes como a artrite

reumatóide mas também, por exemplo, na macroglobulinémia de Waldenstrom, em que 10% das paraproteínas M produzidas têm características FR.

No laboratório de imunologia, o factor reumatóide é determinado por duas técnicas: uma técnica mais sensível, RA teste (nefelometria) e outra técnica mais específica, reacção de Waller-Rose.

#### 3.2.8.1. Reacção de Waller-Rose

A reacção de Waller-Rose consiste numa técnica de hemaglutinação indirecta, um imunoensaio que se baseia nas propriedades hemaglutinantes específicas do factor reumatóide (IgM anti IgG) e usa hemácias de carneiro sensibilizadas com uma fracção de gamaglobulina de coelho anti-hemácias de carneiro como reagente revelador. Na presença do factor reumatóide, ocorre hemaglutinação do reagente revelador que se traduz na formação de um halo mais ou menos alargado de cor vermelho acastanhado que cobre a cúpula da placa. Na ausência de aglutinação as hemácias do reagente sedimentam no fundo da cúpula sob a forma de um botão punctiforme. Usa-se também um reagente testemunha para assegurar que não há aglutinação espontânea.

### 3.3. **Sector dos Marcadores tumorais**

Um marcador tumoral, tal como referido no capítulo 2, Bioquímica, é uma proteína que serve como indicador bioquímico da presença de um tumor por ser, normalmente, produzido pelas células tumorais. Estes marcadores são a expressão de fenómenos de transformação neoplásica. O marcador ideal deveria as seguintes características: específico, sendo apenas produzido pelo tecido tumoral em questão; sensível, permitindo detectar a presença de um tumor, mesmo nos estádios precoces; deveria ter interesse no diagnóstico, prognóstico e na monitorização terapêutica e possuir valores correlativos à fase da doença. No entanto, os marcadores actuais não satisfazem estas exigências.

Os marcadores tumorais revelaram grande importância na monitorização da terapêutica. A diminuição da concentração do marcador é uma indicação do sucesso do tratamento. A velocidade de diminuição da concentração do marcador deve estar de acordo com a prevista tendo em conta a semi-vida do marcador, pelo que uma diminuição mais lenta do que a esperada poderá indicar que o tumor não foi totalmente eliminado. Após um tratamento bem sucedido, é recomendado continuar a monitorizar o

marcador mesmo após os níveis terem estabilizado. Um posterior aumento pode indicar uma recorrência.

Os marcadores tumorais raramente são usados como ferramentas de diagnóstico, podendo apenas, num contexto clínico, auxiliar o diagnóstico.

Actualmente, neste laboratório de imunologia apenas se faz o doseamento sérico de três marcadores tumorais: NSE, Cyfra 21.1, e CA 72.4.

### 3.3.1. Fundamento

A metodologia usada para a determinação dos marcadores tumorais é imunoensaio electroquimioluminescente (ECLIA), que tem como base a quimioluminescência, já descrita no capítulo 2. O método consiste na formação de um complexo *sandwich* entre um anticorpo monoclonal anti-marcador tumoral biotinilado, marcador tumoral e um anticorpo monoclonal anti-marcador tumoral marcado com ruténio. Após a incorporação de micropartículas revestidas de estreptovidina, o complexo liga-se à fase sólida através da ligação da biotina à estreptovidina. A mistura de reacção é então aspirada para a câmara de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície de um eléctrodo. No eléctrodo, após a aplicação de corrente eléctrica, ocorre uma reacção electroquimioluminescente do ruténio que emite luz medida por um fotomultiplicador. A concentração do marcador tumoral é proporcional à luz medida.

### 3.3.2. Parâmetros

#### Enolase específica dos neurónios (NSE)

A NSE é uma isoenzima glucolítica enolase que intervém na glicólise anaeróbia e está presente no tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino. A NSE é descrita como o marcador de primeira escolha na monitorização do carcinoma brônquico das células pequenas e neuroblastomas. Em resposta à terapêutica, observa-se um aumento temporário do nível de NSE 24 a 72 horas após o primeiro ciclo de terapêutica, em resultado da citólise das células tumorais. Na NSE, não existe qualquer correlação com a zona de metástases nem com metástases cerebrais, mas existe uma boa correlação com a fase clínica, ou seja, a extensão da doença. São detectadas concentrações aumentadas de NSE em doentes com doença benigna no pulmão e do cérebro.

### CYFRA 21-1

CYFRA 21-1 é a designação para o conjunto de fragmentos solúveis de uma proteína do citoesqueleto das células dos epitélios simples, a citoqueratina 19. O teste CYFRA 21-1 tem como principal indicação a monitorização da evolução do carcinoma pulmonar das células não pequenas (*non-small cell lung cancer*, NSCLC). Também é marcador do carcinoma da bexiga de formas músculo invasivas. Níveis séricos elevados deste marcador indicam um tumor num estágio avançado e mau prognóstico ou podem surgir na insuficiência renal e na doença hepática. A terapêutica bem sucedida é documentada por uma descida rápida do nível sérico de CYFRA 21-1 para o intervalo normal. As doenças pulmonares benignas como a doença obstrutiva crónica e doenças infecciosas apresentam valores elevados.

### CA 72-4

O CA 72-4 é uma glicoproteína presente em adenocarcinomas digestivos. Este marcador tem como principal característica a sua elevada especificidade. É usado como marcador do carcinoma gástrico e também do ovário, encontrando-se elevado também em situações benignas como pancreatite, cirrose hepática, pneumopatias, doenças reumáticas, doenças ginecológicas, quistos ováricos e doenças gastrointestinais.

## **3.4. Sector da Autoimunidade**

A autoimunidade consiste na reacção do sistema imunitário (SI) contra os seus próprios constituintes. Sabe-se que o sistema imunitário tem a capacidade de distinguir o *self* do não *self*, através do processo de selecção clonal e que, apenas uma anomalia do SI, conduziria a uma resposta autoimune. No entanto, tem sido demonstrado que o reconhecimento do *self* é essencial para a normal fisiologia do SI e que os auto-anticorpos não são necessariamente destrutivos e que fazem parte integral do funcionamento do SI, envolvidos na cura de lesões, limpando os restos celulares, células envelhecidas, etc. Estas respostas auto-reactivas são transitórias na natureza e predominantemente de isótipo IgM. Uma produção não controlada de auto-anticorpos poderá resultar numa doença autoimune.

A doença autoimune é o resultado de resposta imunitária desapropriada contra antígenos próprios, com consequentes danos no hospedeiro, como infiltrações mononucleares e/ou sistémicas e destruição do tecido, devido à persistência da doença.

A doença autoimune pode ter origem citotóxica (reações tipo II), em imunocomplexos (reações tipo III) e celular (reações tipo IV).

Os factores associados às doenças autoimunes são:

- Genéticos – autoimunidade associada a herança genética; alteração dos genes do complexo major de histocompatibilidade;
- Hormonais – autoimunidade associada aos estrogénios (sexo feminino);
- Químicos – autoimunidade associada a medicamentos por estes poderem modificar a estrutura dos antígenos, desencadear respostas contra eles ou modificar o equilíbrio imunológico.
- Físicos – a luz UV pode lesar as células apresentadoras de antígeno.
- Biológicos – as infecções por vírus ou bactérias com o efeito de superantígeno podem activar células T e levar à segregação de citocinas e/ou expandir a população autopatogénica de células T.
- Perda de tolerância do SI devido a: falha na selecção das células T auto-reactivas; reacção cruzada entre antígenos próprios e exógenos; função de célula B excessiva; defeitos na apoptose.

As doenças autoimunes dividem-se em doenças autoimunes específicas de órgãos e doenças autoimunes sistémicas. As **doenças autoimunes específicas de órgãos** como a *Diabetes mellitus*, cirrose biliar, anemia perniciosa e doença celíaca, ocorrem quando há uma resposta imunitária específica contra um antígeno específico de um órgão. As **doenças autoimunes sistémicas** como doença de Sjogren, polimiosite, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), entre outras, afectam simultaneamente vários órgãos, originando lesões disseminadas e actuam contra elementos celulares e proteínas circulantes. Apesar de muito diferentes entre si, apresentando sintomas em comum como fadiga, febre, mialgias, perda de peso e, muitas vezes, artralgias.

### 3.4.1. Métodos de diagnóstico

#### 3.4.1.1. Imunofluorescência indirecta

A IFI é usada para a determinação semi-quantitativa do auto-anticorpo em estudo. Na amostra em estudo os auto-anticorpos eventualmente presentes fixam-se aos antígenos do substrato. O anti-soro polivalente conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) adicionado ao substrato fixa-se ao anticorpo ligado, formando um complexo *sandwich*. Depois da lavagem para remover o conjugado em excesso, a preparação é

vista ao microscópio de fluorescência Olympus BH2-RFCA e os kits que fornecem as lâminas com os substratos são da Euroimmun, excepto o kit para os anticorpos anti-DNA que é FLUORO nDNA Test (MBL) e ANA, cujo kit é da Diamedix.

Um resultado é positivo quando se observa uma fluorescência brilhante verde-maçã no organelo ou tecido que se está a estudar, ao microscópio de fluorescência.

Esta técnica é normalmente a primeira técnica usada para pesquisa da maior parte dos auto-anticorpos. Tem como vantagens a fácil execução, elevada sensibilidade e possibilidade de detectar simultaneamente mais do que um auto-anticorpo. No entanto, trata-se de uma técnica subjectiva, difícil de padronizar e os resultados são semi-quantitativos.

A escolha do substrato depende do tipo de anticorpo que se pretende pesquisar. Os substratos são os seguintes:

**Células HEp-2** – As células HEp-2 são células epiteliais humanas de carcinoma laringe (*Human Epithelioma type 2 cells*). Estas células são utilizadas na pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA). Estas células têm como vantagens o facto de possuírem um núcleo grande e complexo, grande diversidade de antígenos nucleares, elevada sensibilidade e especificidade e células nas diferentes fases da mitose, permitindo a detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos apenas expressos durante o ciclo celular. Os ANA é um grupo de auto-anticorpos que reagem com diversos constituintes do núcleo:

- dsDNA
- Histonas
- Nucleossoma
- Antígenos nucleares extraíveis (ENA) – Sm, U1-snRNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl70 e Jo-1
- Nucléolo
- Membrana nuclear
- Aparelho mitótico

A identificação dos ANA tem grande importância no diagnóstico, monitorização terapêutica, prognóstico e estudo da evolução de doenças como lúpus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, síndrome de Sjögren (SS), polimiosite (PM), dermatosite (DM), doença conectiva mista do tecido conjuntivo (MCTD), artrite reumatóide (AR), entre outras.

Os diferentes ANA detectados com as células HEp-2 produzem diferentes padrões nucleares, pelo que estes têm associações clínicas diferentes, como se encontra descrito na Tabela 3-9.

Tabela 3-9 – Padrões nucleares comuns e as respectivas associações clínicas.

| Padrões nucleares | Descrição                                                                             | Associação clínica                                       |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Homogéneo         | Fluorescência difusa e uniforme de núcleos em interfase. Mitoses positivas.           | LES, lúpus induzido por fármacos, AR e esclerose dérmica |
| Mosqueado         | Fluorescência granular fina ou grosseira dos núcleos em interfase. Mitoses negativas. | LES, MCTD, SS, PM, esclerodermia.                        |
| Centrómero        | 40 a 60 pontos fluorescentes distribuídos nos núcleos em interfase.                   | Síndrome CREST, cirrose biliar primária                  |
| Nucleolar         | Fluorescência apenas nos nucléolos, mitoses positivas ou negativas.                   | Esclerodermia, miosite, LES                              |

Alguns ANA são muitas vezes associados especificamente a certas doenças, sendo considerados marcadores destas. Como exemplo, o anticorpo contra o antígeno Smith (Sm) e o anticorpo anti-dsDNA estão fortemente associados ao LES, enquanto o ANA anti-centrómero está associado a CREST (Síndrome de calcinose, fenómeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia, telangiectasias).

***Crithidia luciliae*** – protozoário monoflagelado que possui uma mitocôndria gigante, o cinetoplasto, que contém uma dsDNA circular muito condensada. Esta massa parece ser livre de histonas ou de quaisquer auto-antígenos. Na presença de anticorpos anti-dsDNA, é detectada fluorescência no cinetoplasto e, mais fracamente, no núcleo. Este substrato tem como vantagem a sua grande especificidade, devido à natureza do dsDNA circular no cinetoplasto.

**Neutrófilos** – As preparações de neutrófilos são utilizadas para a pesquisa de auto-anticorpos anti citoplasma de neutrófilos (ANCA). Anti-mieloperoxidase (MPO) e anti-proteinase 3 (PR3) são os principais anticorpos detectados. As preparações são de

neutrófilos fixados com etanol e é possível observar um padrão citoplasmático (C-ANCA) e detectar antígeno PR3; ou um padrão perinuclear (P-ANCA) e detectar o MPO. Existem também preparações de neutrófilos fixados com formol para distinguir os anticorpos anti-MPO dos ANA. Nalgumas situações recorre-se a neutrófilos fixados em metanol para classificar o padrão X-ANCA.

**Substrato triplo (rim, estômago e fígado de roedores)** – O uso dos tecidos rim, estômago e fígado de roedores tem como objectivo a pesquisa de anticorpos anti-mitochondria (AMA), anticorpos anticélula parietal (APCA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA) e anticorpos anti-microsomas hepáticos e renais (anti-LKM). Os diferentes anticorpos são identificados de acordo com o aspecto e localização da fluorescência ao nível dos três tecidos.

**Células VSM47** – As células VSM47 são células musculares lisas (*vascular smooth muscle*) e são usadas na pesquisa de anticorpos anti-filamentos de actina (F-actina), por exemplo do caso de um ASMA positivo.

**Estômago de primata e suspensão de factor intrínseco** – Esta preparação é utilizada na pesquisa de anticorpos anti-Factor Intrínseco (FI) e anti-célula parietal (APCA). As lâminas contêm secções de estômago de primata e gotas de microscópicas de uma suspensão que contem FI.

#### 3.4.1.2. MicroElisa

A MicroElisa é usada para a identificação e quantificação de auto-anticorpos e/ou confirmar resultados positivos obtidos por IFI. A técnica está automatizada e é realizada no aparelho MAGO da Diamedix.

Trata-se de um método imunoenzimático em *sandwich*. Utilizam-se anticorpos monoclonais, quer para revestir as microplacas, que se unirão ao auto-anticorpo presente na amostra, quer para detectar o anticorpo ligado nas microplacas sensibilizadas (reagente conjugado: anticorpos monoclonais ligados à peroxidase). Após lavagem para eliminar o excedente, é adicionado o substrato da enzima (TMB) que reagirá com o complexo formado, originando uma reacção de cor azul, que passa a amarelo com a adição da solução de paragem (ácido). A quantidade de auto-anticorpo

estudado é proporcional ao produto da reacção enzimática e à luz emitida, medida por um espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 450 nm.

Esta técnica é usada, no laboratório de imunologia para pesquisar os seguintes autoanticorpos:

- Anti-dsDNA;
- Anti-célula parietal;
- Anti-antígenos mitocondriais M2;
- Antifosfolípidos (anti- $\beta$ 2-glicoproteína I e anti-cardiolipina).

#### 3.4.1.3. *Immunoblot Dot*

A metodologia *Immunoblot* no laboratório de imunologia é usado para identificação qualitativa e/ou confirmar alguns diagnósticos feitos pelas técnicas anteriores. A técnica é automatizada e executada no aparelho EUROBlotMaster da Euroimmun, O kit, fornecido pela Euroimmun, contém tiras teste de nitrocelulose revestidas por antígenos altamente purificados. Cada tira contém vários antígenos, o que permite a identificação simultânea de vários autoanticorpos. O princípio deste teste é semelhante ao da ELISA. As tiras são postas a incubar com as amostras diluídas e, caso haja anticorpos, estes ligam-se aos respectivos antígenos, sendo as ligações não específicas são removidas pela lavagem. Estes complexos são detectados pelo enzima-conjugado IgG (anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina) e revelados pela adição do substrato (NBT/BCIP- cloreto de azul de nitrotetrazolium / 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato). A avaliação é feita digitalmente usando o EUROLIne Scan da Euroimmun.

Esta técnica é usada, no laboratório de imunologia para pesquisar os seguintes autoanticorpos:

- ANA;
- Anticorpos contra antígenos hepáticos;
- Auto-anticorpos associados a miosites;
- Auto-anticorpos associados a esclerose sistémica;
- Auto-anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO), anti-proteinase 3 (PR3) e anti-membrana basal glomerular.

## 4. VIROLOGIA

### 4.1. Objectivo

A valência de Virologia, segundo o regulamento do estágio, está incluída na valência de Imunologia. No entanto, como o estágio em Virologia foi feito num laboratório, diferente do Laboratório de Imunologia, optei por separar as áreas.

O estágio decorreu no Laboratório de Virologia (acreditado desde 2005) do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil sob a orientação da Dr<sup>a</sup> Carmo Ornelas.

O objectivo do presente relatório é apresentar o local do estágio, fazendo referência a alguns parâmetros executados, equipamentos utilizados, respectivas metodologias e controlo de qualidade.

O Laboratório de Virologia está inserido no Serviço de Patologia Clínica do IPO e é responsável por estudar e detectar vírus oncológicos, com especial destaque para o Vírus do Papiloma Humano (HPV).

No presente relatório irão ser apresentados alguns vírus das seguintes famílias:

- Herpesviridae;
- Hepadnaviridae;
- Flaviviridae;
- Retrovírus
- Papilomaviridae.

### 4.3. Herpesvírus

Os Herpesvírus são vírus cujas características se resumem a: genoma DNA de dupla cadeia linear, cápside icosaédrica e invólucro. Existem 8 Herpesvírus (Família *Herpesviridae*) que infectam o Homem, divididos em 3 sub-famílias:

- *Alphaherpesvirinae*: Vírus Herpes Simplex 1 (HSV-1), Vírus Herpes Simplex 2 (HSV-2), Vírus Varicela-Zona (VZV).
- *Betaherpesvirinae*: Citomegalovírus (CMV), Herpesvírus Humano 6 (HHV-6), Herpesvírus Humano 7 (HHV-7).

- *Gamaherpesvirinae*: Vírus Epstein-Barr (EBV), Herpesvírus Humano 8 (HHV-8).

Destes, apenas tive conhecimento sobre os métodos de detecção de alguns.

#### 4.3.1. Citomegalovírus

O Citomegalovírus (CMV) é responsável por infecções que apresentam risco significativo quando contraídas por grávidas, recém-nascidos e indivíduos imunosuprimidos. A transmissão pode ser oral, sexual, intrauterina, perinatal, via transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Apesar de ser geralmente assintomática em crianças e adultos (se houver sintomatologia, consiste em mononucleose com febre, hepatite e mal-estar geral), é uma das infecções congénitas mais frequentes e graves, provocando lesões no SNC, hepatite, trombocitopénia, bronquite, atraso psicomotor e mental e surdez progressiva no recém-nascido. Assim sendo, é de grande importância determinar se a infecção é primária ou não, na grávida, uma vez que a taxa de transmissão mãe-filho é maior do que na infecção secundária. O vírus pode atravessar a barreira placentária, mas a infecção pode igualmente ser perinatal, devido ao contacto com sangue materno ou secreções vaginais, ou pós-natal, através do leite materno.

Em qualquer infecção, a resposta imunitária humoral envolve a síntese de anticorpos classe IgM algumas semanas após a infecção e, uma semana após, dos anticorpos da classe IgG. Os níveis de IgM anti-CMV aumentam em geral por algumas semanas e depois diminuem lentamente no decorrer de quatro a seis meses. Ocasionalmente, a IgM pode permanecer na circulação por anos. O teste de IgM é um instrumento essencial no diagnóstico da infecção primária por CMV, a qual é difícil de identificar apenas pelos sintomas. Além disso, nem sempre é fácil de distinguir entre a infecção primária e secundária, pois a reactivação pode induzir a síntese de IgM em pacientes imunocomprometidos. O teste de IgG é útil para distinguir os indivíduos com a doença adquirida daqueles que não a adquiriram uma vez que é, geralmente, um marcador de infecção passada.

#### 4.3.2. Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) é o agente patogénico responsável pela mononucleose infecciosa (MI) e é capaz de infectar células epiteliais e linfócitos. Também se encontra envolvido no linfoma de Burkitt, no carcinoma da nasofaringe e no síndrome

linfoproliferativo ligado ao cromossoma X. O EBV transmite-se principalmente por via oral. O vírus replica-se no epitélio orofaríngeo e é libertado na saliva pelos linfócitos B infectados. Durante a infância, a infecção primária por EBV é assintomática mas na adolescência ou na idade adulta, apresenta-se como mononucleose infecciosa com sintomas como dor de garganta, febre, linfadenite, mal-estar geral, associados a manifestações hematológicas (linfocitose) e serológicas (presença de anticorpos heterófilos circulantes e/ou anticorpos dirigidos contra as proteínas específicas de EBV. Várias doenças como infecções por citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus de hepatite, vírus de imunodeficiência humana (HIV), entre outros, apresentam sintomatologia semelhante. Contudo, este teste apresenta alguns falsos negativos e o diagnóstico de MI aguda pode ser feito, detectando-se anticorpos dirigidos contra proteínas específicas do EBV, como o antígeno da cápside viral (Viral Capsid Antigen VCA) e o antígeno precoce difuso (Early Antigen-Diffuse, EA(D)). A presença de anticorpos IgM anti-VCA é essencial para estabelecer diagnóstico de MI aguda. No entanto, recomenda-se confirmar com anticorpos IgG anti-EA(D) ou IgG ou IgM anti-EBNA-1. Na figura seguinte, está demonstrado a evolução dos títulos dos anticorpos anti-VCA, anti-EA e anti-EBNA ao longo da doença.

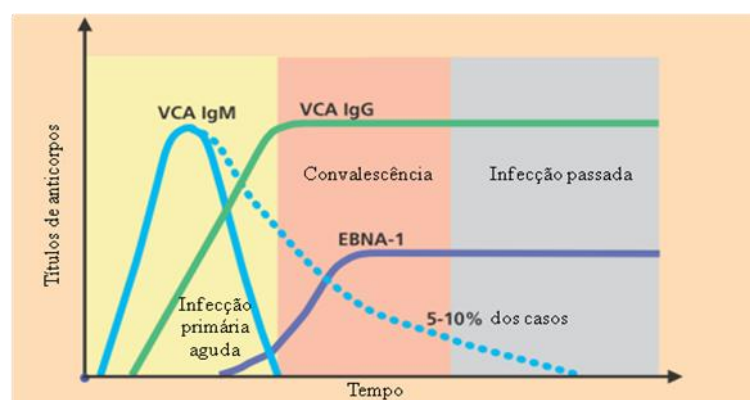


Figura 4-1 – Títulos de anticorpos contra proteínas específicas do EBV ao longo da infecção.

Os testes serológicos para as infecções por EBV permitem detectar respostas imunitárias características em função do tempo. Na tabela seguinte, encontram-se os vários diagnósticos possíveis conforme os anticorpos detectados:

Tabela 4-1 – Diagnóstico possível para as diferentes prevalências de anticorpos.

| <b>IgG anti-VCA</b> | <b>IgM anti-EBV</b> | <b>IgG anti-EBNA</b> | <b>IgG anti-EA</b> | <b>Diagnóstico</b>         |
|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------|----------------------------|
| -                   | -                   | -                    | -                  | Sem exposição ao vírus     |
| -                   | +                   | -                    | -                  | Fase precoce da infecção   |
| +                   | +                   | -                    | +/-                | Infecção primária aguda    |
| +                   | +                   | +                    | +/-                | Fase transição/Reactivação |
| +                   | -                   | +                    | +/-                | Infecção passada           |

#### 4.3.3. Vírus Herpes Humano 6

O Herpesvírus Humano 6 (HHV-6), inicialmente descrito em 1986, foi isolado em doentes com disfunções linfoproliferativas. O HHV -6 tem tropismo para os linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e é o agente etiológico responsável pela doença infantil, exantema súbito e foi associado com várias manifestações de doenças em crianças, incluindo hepatite fulminante, encefalite, linfadenite necrotizante histiocitária e infecção fatal disseminada. Nos imunodeficientes pode ter consequências mais graves como mononucleose, linfoproliferação policlonal atípica, esclerose múltipla, encefalites e retinites. A seroprevalência é aproximadamente de 100% na infância, deixando poucos adultos susceptíveis a infecção primária. A transmissão ocorre por contacto directo com saliva, secreções vaginais e vertical (intrauterina e perinatal).

#### 4.3.4. Vírus Hepres Humano 8

O Herpes Vírus Humano 8 (HHV-8) é classificado como gamaherpesvírus, com tropismo para as células B, macrófagos e células epiteliais e com grande capacidade para existir em estado latente, sob a forma de epissoma que se replica juntamente com o DNA celular. A transmissão ocorre por contacto sexual, transplante de órgãos, saliva e transfusão de sangue e o período de incubação é variável, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Ao contrário de vírus como EBV, HHV-6, HHV-7, CMV ou HSV-1, onde mais de 80% da população é positiva para anticorpos para estes vírus, para o HHV-8, são observados títulos elevados de IgG em doentes com Sarcoma de Kaposi, mas não em dadores.

#### 4.4. Hepadnavírus

##### 4.4.1. Vírus da Hepatite B

O único vírus, pertencente à família *Hepadnaviridae*, capaz de infectar os humanos é o Vírus da Hepatite B. O Vírus da Hepatite B tem como principais características possuir genoma DNA e tropismo para os hepatócitos.

A sua transmissão é sanguínea, sexual e perinatal sendo este último, um dos modos mais graves e eficientes de transmissão. Os hepadnavírus infectam, principalmente, hepatócitos e têm capacidade para induzir infecções persistentes e crónicas, estando associados ao desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma celular. A virémia dos indivíduos infectados é elevada ( $> 10^6/\text{mL}$ ) e pode ser encontrado no plasma, no sêmen, fluidos vaginais e saliva.

Quanto à patogénese da infecção causada por HBV, o vírus causa inicialmente hepatite aguda, geralmente assintomática, apenas com aumento de transaminases e alguns sintomas ligeiros como gastrointestinais e gripe. A hepatite aguda pode, no entanto, apresentar-se na forma ictérica com náuseas, anorexia, febre ligeira, fezes claras e urina escura. Pode ainda ocorrer hepatite fulminante, rara mas fatal devido a falha generalizada da função hepática. A hepatite causada pelo HBV pode evoluir para hepatite crónica, em que há lesão crónica do fígado, que pode, a longo prazo, conduzir a cirrose e carcinoma hepatocelular. O carcinoma hepatocelular pode ser causado por alterações cromossomais, mutações genéticas, proteínas virais oncogénicas ou integração do genoma viral no genoma dos hepatócitos.

Durante a infecção por HBV podem ser detectados vários antígenos e anticorpos:

**AgHBs** – Antígeno de superfície de HBV. O AgHBs é o primeiro marcador serológico após a infecção pelo HBV e pode ser detectado durante infecção aguda como crónica, desaparecendo no período de convalescença. A determinação de AgHBs é usada para identificar pessoas infectadas a fim de evitar a transmissão do vírus, bem como para monitorizar o estado da infecção, juntamente com outros marcadores serológicos.

**Anti-HBs** – anticorpos anti-antígeno de superfície, AgHBs. Os ensaios para determinação de anticorpos anti-HBs são frequentemente utilizados para monitorizar o sucesso da vacinação contra a hepatite B, monitorizar a convalescença de indivíduos infectados. A presença de Anti-HBs num indivíduo assintomático pode indicar exposição anterior ao HBV.

**Core total** - anticorpos IgM e IgG anti-antigénio do *core*. Aparecem no início da sintomatologia e persistem para o resto da vida. A presença de anti-HBc total indica infecção prévia ou actual durante um período de tempo indefinido.

**AgHBc** - Antigénio do *core* que é usado como marcador de infecção activa.

**Anti-HBc IgM** – anticorpos IgM anti-antigénio do *core*. Os anticorpos virais específicos da classe IgM são detectados na maioria das infecções virais agudas, pelo que são considerados como marcador fiável da fase aguda da doença. Na fase de convalescença, os anticorpos IgM anti-HBc mantêm níveis detectáveis após o desaparecimento de AgHBs.

**AgHBe** – antigénio encontrado no core do virião, detectado na fase inicial da infecção após o aparecimento do antigénio de superfície. A sua determinação pode ser utilizada para monitorizar o progresso da infecção pelo vírus da hepatite B. Juntamente com o AgHBs pode persistir nos casos de infecção crónica pelo vírus da hepatite B. Um resultado negativo para AgHBe pode indicar: fase inicial da infecção aguda antes do pico da replicação viral ou início da convalescença, com níveis de AgHBe indetectáveis.

**Anti-HBe** – anticorpos anti-antigénio HBe. A seroconversão de AgHBe para anticorpos anti-HBe durante a infecção aguda pelo vírus da hepatite B é normalmente indicativa de resolução da infecção, de um nível reduzido de infecciosidade ou da resposta virológica no tratamento de doentes com infecção crónica. A presença de anticorpos anti-HB permite distinguir as duas fases, descritas acima, em que o AgHBe é negativo.

Na tabela seguinte encontra-se um resumo do que foi descrito acima em relação aos vários marcadores serológicos de hepatite B.

Tabela 4-2 – Perfis possíveis para os antígenos e anticorpos de HBV

| AgHBs | AgHBe | Anti-HBc IgM | Anti-HBc Total | Anti-HBe | Anti-HBs | Perfil                  |
|-------|-------|--------------|----------------|----------|----------|-------------------------|
| +     | -/+   | -            | -              | -        | -        | Fase de incubação       |
| +     | +     | -            | -              | -        | -        | Fase aguda precoce      |
| +     | +     | +            | +              | -        | -        | Fase aguda              |
| +     | -     | +            | +              | +        | -        | Início da seroconversão |

| AgHBs | AgHBe | Anti-HBc IgM | Anti-HBc Total | Anti-HBe | Anti-HBs | Perfil                                                                |
|-------|-------|--------------|----------------|----------|----------|-----------------------------------------------------------------------|
| +     | -     | -            | +              | +        | -        | Portador crónico com seroconversão tardia                             |
| +     | +     | -            | +              | -        | -        | Portador crónico sem seroconversão                                    |
| -     | -     | -            | +              | -        | -        | Período de janela, início de recuperação ou anti-HBs com título baixo |
| -     | -     | +            | +              | +        | -        | Fase de convalescença                                                 |
| -     | -     | -            | +              | +/-      | +        | Imunidade após infecção pelo HBV                                      |
| -     | -     | -            | -              | -        | +        | Imunidade após vacinação                                              |
| -     | -     | -            | -              | -        | -        | Ausência de contacto prévio                                           |

#### 4.5. Flavivírus

Grupo de vírus ao qual pertence o Vírus da Hepatite C, com genoma RNA.

##### 4.5.1. Vírus da Hepatite C

O HCV foi descoberto na década de 70, quando foi reconhecida uma forma de hepatite com características de hepatite B mas seronegativa para HBV. As principais vias de transmissão são a via sanguínea e vertical. O período de incubação é cerca de 45 dias e apenas 5% dos infectados apresentam sintomas, como anorexia e náuseas. Tal como o HBV, o HCV tem tropismo para os hepatócitos e tem capacidade para induzir infecções persistentes, estando também associado ao desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma celular. Sem tratamento, 80% dos infectados desenvolve hepatite crónica, podendo evoluir para cirrose hepática, muitas vezes precursora de carcinoma hepatocelular. No entanto, esta evolução é lenta, podendo durar 20 anos. O carcinoma hepatocelular parece ser uma consequência directa da cirrose, em vez de ser causado

pela integração de sequências de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira (mutagénese mutacional), como acontece com a hepatite C.

#### 4.6. Retrovírus

Os Retrovírus são um grupo de vírus (família *Retroviridae*) que possuem genoma RNA, invólucro e transcriptase reversa, que usa o RNA viral como *template* para originar cópias de DNA. Os retrovírus podem ainda dividir-se em duas sub-famílias de vírus que causam doença nos humanos:

- Retrovírus HTLV, que contém HTLV-I e HTLV-II. Estes vírus distinguem-se pelas características do genoma e a sua capacidade para causar tumores em vez de imunossupressão.
- *Lentivirus*, que contém os vírus HIV-1 e HIV-2. Caracterizam-se pela forma cónica do virião, ausência de oncogenicidade e a presença de sintomas e sinais clínicos de longa duração.

##### 4.6.1. Vírus T-Linfotrópicos Humano tipo I e II

O HTLV foi o primeiro retrovírus humano a ser descoberto por Robert Gallo. O HTLV-I está etiológicamente associado à leucemia/linfoma de células T do adulto e paraparésia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I. O HTLV-II encontra-se associado à leucemia a tricoleucócitos e neuromielopatia crónica. O HTLV-I possui características endémicas na zona sudoeste do Japão, Caraíbas e em algumas regiões de África enquanto o HTLV-II é endémico em algumas populações indígenas americanas. A transmissão requer contactos repetidos mas pode ocorrer através do leite materno, sexual e sanguínea.

##### 4.6.2. Vírus da Imunodeficiência Humana

O HIV trata-se de um retrovírus de genoma RNA de dupla cadeia linear, com invólucro e é o agente etiológico da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A sua transmissão pode ser por contacto sexual, exposição a sangue ou produtos sanguíneos, infecção pré-natal ou perinatal.

A classificação actual distingue dois tipos, HIV-1 e HIV-2, estando estes separados em grupos e sub-grupos. O HIV-1 está dividido pelos grupos M, O e N, sendo o M

responsável pela pandemia global enquanto os restantes são relativamente raros e endémicos da África ocidental central.

O HIV-1 é responsável por uma infecção crónica que evolui progressivamente para uma depleção da população dos linfócitos T CD4+. A primo-infecção é, geralmente, assintomática e quando sintomática declara-se duas ou três semanas após a contaminação e reveste, frequentemente, um quadro de síndrome pseudo-gripal ou mononucleósico, com febre, astenia, adenopatias, erupção cutânea, cefaleias, faringite, entre outras. Esta sintomatologia regride espontânea e rapidamente para um estado de portador assintomático que pode durar anos. Após este período, podem surgir uma variedade de sintomas que pode traduzir a deterioração clínica: febre crónica, perda de peso, diarreia e candidíase oral. Paralelamente, ocorre linfopenia CD4 e surgem as infecções oportunistas como pneumocistose, toxoplasmose, infecções por micobactérias ou proliferações celulares (doença de Kaposi, linfomas B, cancro), que assinalam a entrada em SIDA. A virémia é geralmente elevada ( $> 10^6$  cópias de genoma viral/mL) na primo-infecção, diminuindo muito rapidamente para se estabilizar num nível variável, dependendo da resposta imunitária. O nível dessa carga viral é preditivo da evolução da doença, tanto mais rápida quanto mais a carga viral for elevada.

A proteína imunogenética principal e o alvo antigenémico para a detecção sérica é a proteína transmembranar TMP. Os anticorpos anti-TMP encontram-se normalmente entre os primeiros a aparecer quando se dá a seroconversão dos indivíduos infectados pelo HIV. Pouco tempo depois da infecção pelo HIV mas antes da seroconversão, o antigénio do HIV pode ser detectado em amostras de soro ou plasma. A proteína estrutural do HIV mais frequentemente utilizada como marcador de antigenémia é a proteína do core, p24, diminuindo desta forma a janela de seroconversão e melhorando a detecção precoce da infecção pelo HIV. São estes os dois parâmetros determinados para o diagnóstico de HIV (tabela 4-14)

#### **4.7. Papilomavírus**

Os Papilomas vírus Humanotrata-se de um grupo de vírus oncogénicos de DNA circular de dupla cadeia, com cápside icosaédrica e sem invólucro. Destes, o vírus responsável por causar tumor no humano é o Vírus do Papiloma Humano (HPV).

#### 4.7.1. Vírus do Papiloma Humano

O HPV, inicialmente, reconhecido como a causa das verrugas cutâneas, é um dos géneros da família *Papillomaviridae*, com genoma DNA. São conhecidos mais de 200 genótipos de HPV, sendo alguns oncogénicos. As vias de transmissão deste vírus são: sexual (a principal via de transmissão das verrugas genitais), vertical (via de transmissão de papiloma laríngeo e de verrugas nas crianças) e contacto directo com material infectado, normalmente, através de feridas.

O HPV tem tropismo para o epitélio cutâneo e mucoso. Os vírus infecta a camada basal da derme, replicando-se nas células epiteliais causando lesões na pele e nas mucosas. Os tipos cutâneos do HPV são epidermotróficos e afectam a pele das mãos e pés, enquanto os tipos mucosos infectam o epitélio da boca, garganta, tracto respiratório e epitélio anogenital. Os diferentes genótipos podem estar associados a diferentes locais anatómicos e clínicos, embora haja uma sobreposição (tabela 4-8). A manifestação clínica mais grave do HPV é o carcinoma do cérvix associado aos genótipos 16, 18, 31, 33, entre outros, designados de genótipos oncogénicos.

Tabela 4-3 – Genótipos de HPV e as respectivas lesões associadas e descrição.

|                     | <b>Lesão</b>      | <b>Genótipo HPV associado</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lesões não-malignas | Verrugas comuns   | 1,2 e 4                       | Pequenas e em grande número, em qualquer parte do corpo mas, mais frequentemente, nas mãos e pés com superfície áspera. Dolorosas quando na sola dos pés.                                                                   |
|                     | Verrugas planas   | 3                             | Verrugas planas e lisas/suaves. Afectam, normalmente as crianças.                                                                                                                                                           |
|                     | Verrugas genitais | 6 e 11                        | Verrugas genitais ( <i>condylomata acuminata</i> ) são a infecção sexualmente transmitida (IST) mais comum e, normalmente, ocorrem associadas a outras ISTs. As lesões ocorrem como pápulas com tamanho variável. Afectam o |

|                     |                                |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                |                                                       | pénis, uretra, ânus, vulva, vagina e cérvix.                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                     | Papiloma laríngeo              | 6 e 11                                                | Verrugas na boca e laringe, principalmente em crianças como resultado da transmissão perinatal.                                                                                                                                                                                                                                           |
| Lesões pré-malignas | Epidermodisplasia verruciforme | 2,3 e outros                                          | Ocorrência de múltiplas lesões planas por todo o corpo, associado a deficiência de células T.                                                                                                                                                                                                                                             |
| Lesões malignas     | Cancro cervical                | 16,18,31,33,35 e outros (genótipos HPV de alto risco) | O HPV é o agente etiológico do carcinoma do colo do útero. Cerca de 70% dos casos estão associados aos genótipos 16 e 18 e os restantes associados aos genótipos 31, 33 e 35, etc. E6 e E7 (proteínas de replicação) ligam-se, respectivamente, a duas proteínas celulares, p53 e pRB, levando à proliferação celular excessiva e cancro. |

#### 4.8. Detecção Directa e Indirecta dos Agentes Virais

A detecção dos agentes virais no Laboratório de Virologia pode ser directa ou indirecta. A detecção directa consiste na detecção dos antígenos dos respectivos agentes virais, no soro do paciente e no seu DNA/RNA; enquanto a detecção indirecta consiste na detecção dos anticorpos contra os antígenos, no soro do paciente.

##### 4.8.1. Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência

###### Fundamento

Esta metodologia (CMIA), já descrita no capítulo 2, é um imunoensaio de dois passos, em que os anticorpos IgM/IgG anti-vírus, presentes em soro ou plasma, ligam-se às micropartículas revestidas de lisado viral e às micropartículas revestidas de antígeno recombinante do vírus em estudo. Posteriormente, é adicionado o conjugado de anticorpos anti-IgG humana, marcado com acridínio e as soluções pré-activadora e activadora, provocando uma reacção quimioluminescente, medida em unidades de luz relativas (RLUs). A quantidade de anticorpos IgM/IgG anti-vírus presentes na amostra é directamente proporcional às RLUs medidas.

#### Equipamento

- Liaison da Diasorin
- Architect i2000Sr da Abbott

#### Parâmetros

- CMV (IgG e IgM) - Liaison
- HIV-1/2 (Antigénio p24 do HIV-I e anticorpos HIV-1 e HIV-2) - Architect
- HBV (AgHBs, Anti-HBs, Core total, Anti-HBc IgM, AgHBe e Anti-HBe) - Architect.
- HCV (IgM/IgG) - Architect

### 4.8.2. Imunoensaio de Quimioluminescência

#### Fundamento

A metodologia CLIA é muito semelhante à metodologia acima descrita, excepto no conjugado de anticorpo anti-IgM/IgG humana que se encontra marcado com isoluminol, em vez de acridínio.

#### Equipamento

- Liaison da Diasorin
- Architect i2000Sr da Abbott

#### Parâmetros

- CMV (IgG e IgM) - Architect;
- EBV (IgG anti-VCA, IgM anti-EBV, IgG anti-EBNA, IgG anti-EA) - Liaison;
- HTLV-I/II (IgG) - Architect

#### 4.8.3. Antigenémia CMV pp65

##### Fundamento

A determinação de antigenémia CMV pp65 trata-se da identificação da fosfoproteína estrutural pp65 em leucócitos de sangue periférico, utilizando anticorpos monoclonais marcados com peroxidase. O método consiste na separação dos leucócitos, coloração, colocação em poços de lâminas, adição de anticorpo primário de ratinho anti-pp65 e um anticorpo secundário marcado com peroxidase. Posteriormente, é adicionado peróxido de hidrogénio e é corada a lâmina para a detecção da proteína pp65. Este método permite um diagnóstico precoce, geralmente, antes de sintomatologia clínica e permite controlar a evolução da infecção e do tratamento.

#### 4.8.4. PCR em Tempo Real

##### Fundamento

Para monitorização de tratamento, é pedido um teste de carga viral, determinada por PCR em Tempo Real. O PCR em Tempo Real consiste numa reacção de polimerase em cadeia, ou seja, a amplificação de regiões específicas do genoma, em que o produto amplificado é detectado através de corantes fluorescentes. Esta tecnologia permite a monitorização das intensidades de fluorescência durante a corrida de PCR e assim acompanhar a detecção e quantificação do produto acumulado, em tempo real.

O PCR em Tempo Real permite a quantificação do ácido nucleico à medida que este é amplificado. No PCR em Tempo Real, tal como no PCR clássico, com a ajuda da enzima DNA-polimerase, ocorre a replicação de uma cadeia de DNA a partir do ponto em que o primer está ligado à cadeia molde. Os primers definem a sequência a ser replicado e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência com muitas cópias. No PCR em Tempo Real, o produto amplificado é detectado através de corantes fluorescentes (não-específicos) que estão normalmente ligados a sondas de oligonucleótidos (sondas *Minor Groove Binder*) que se ligam especificamente ao produto amplificado - como é o caso do SYBR Green - ou através de sondas fluorescentes específicas - como é o caso da TaqMan. As moléculas de SYBR Green, durante a polimerização catalisada pela enzima DNA polimerase, ligam-se ao DNA recentemente sintetizado, inespecificamente. Com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, há emissão de fluorescência verde que aumenta à medida que o DNA é amplificado. No ciclo seguinte, na desnaturação do DNA, as

moléculas de SYBR Green são libertadas e o sinal de fluorescência diminui. A sonda TaqMan é utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados por PCR. Esta sonda tem numa extremidade um fluoróforo e noutra, um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Durante o PCR em Tempo Real, a sonda hibridiza com a sequência de cadeia molde para a amplificação. Durante a amplificação, a sonda é degradada devido à actividade exonuclease 5'→3' da DNA polimerase, separando o *quencher* do fluoróforo, resultado num aumento de intensidade de fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esta tecnologia permite então a monitorização das intensidades de fluorescência durante a corrida de PCR e assim acompanhar a detecção e quantificação do produto acumulado, em tempo real.

No Laboratório de Virologia, o PCR em Tempo Real é usado para determinar a carga viral em soro e plasma com o objectivo de fazer a monitorização de um tratamento. O PCR em Tempo Real também se encontra inserido na detecção do HPV presente na infecção. No caso de determinação da carga viral, são usadas sondas específicas (TaqMan) e o ensaio é quantitativo, em que são usados calibradores com sequências semelhantes às das amostras, com o objectivo de se quantificar o número de cópias virais no soro. No caso do diagnóstico da infecção por HPV, trata-se de um ensaio qualitativo e são usados corantes inespecíficos (SYBR Green) uma vez que o objectivo é apenas detectar o vírus e não obter valores.

### Equipamento

Abi Prism Sequence Detection Systems da Applied Biosystems

### Parâmetros

- CMV (carga viral)
- HHV-6 (carga viral)
- HBV (carga viral)
- HCV (carga viral)
- EBV (carga viral)

#### 4.8.5. Imunofluorescência Indirecta

##### Fundamento

O ensaio de imunofluorescência indirecta de anticorpos utiliza o método indirecto de marcação de anticorpos por fluorescência. Na primeira fase, o soro e o plasma humanos a serem testados, são postos em contacto com células fixadas, infectadas e não infectadas. Caso o anticorpo esteja presente na amostra, ir-se-á formar um complexo com o antigénio, no substrato celular. Caso contrário, não se formam complexos e todos os componentes do soro são lavados no ciclo de passagem por água. A reacção positiva (fluorescência verde) é revelada com a adição de um anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína, aquando da observação da lâmina ao microscópio de fluorescência. Uma amostra é considerada positiva se apresentar fluorescência verde maçã nas células infectadas, para uma dada diluição e com padrão semelhante ao controlo positivo. Caso se observe fluorescência em células infectadas e não infectadas a reacção é inespecífica e o resultado é negativo.

##### Parâmetros

HHV-6 (IgG e IgM)

#### 4.8.6. Imunoensaio enzimático ELISA

Este imunoensaio qualitativo, já explicado no capítulo referente à valência de imunologia consiste na ligação dos anticorpos presentes na amostra com o antigénio do vírus em estudo ligado à superfície de poliestireno dos micropoços do teste. A fim de ser possível detectar estes imunocomplexos, é adicionada anticorpo IgG anti-humana conjugado com peroxidase. A reacção enzimática com tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogénio vai dar à solução a cor azul, que após a paragem da reacção, torna-se amarela, revelando a presença dos anticorpos anti-vírus na amostra.

##### Parâmetros

HHV-6 (IgG)

#### 4.8.7. Immunoblot

##### 4.8.7.1. INNO-Lia

###### Fundamento

O imunoensaio Inno-Lia consiste num ensaio imunoenzimático, com proteínas virais de natureza recombinante e péptidos sintéticos, fixadas em membrana de nylon em bandas individualizadas. O Inno-Lia baseia-se no princípio ELISA. Nesta metodologia, são usadas tiras que contêm antigénios, aos quais se ligam os anticorpos a estudar na amostra. Posteriormente, é adicionado anticorpo anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina que se liga aos complexos previamente formados. A reacção enzimática com um substrato cromogénio produz uma cor castanho-escura proporcional com a quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra.

No laboratório de virologia, este imunoensaio é usado como confirmatório dos vírus HTLV-I/II e HIV-I/II. Dadas as implicações de seropositividade para estes vírus, bem como a existência de reacções falsamente positiva com os testes de *screening*, é obrigatório efectuar um teste de confirmação antes de fornecer um resultado positivo.

No caso do vírus HTLV-I/II os antigénios usados são p19 I/II , p24 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, que confirmam a presença de anticorpos contra HTLV I e II. Os antigénios p19-I e gp46-I são específicos de HTLV-I e gp46-II é específico de HTLV-II e servem para diferenciar infecções por HTLV-I e HTLV-II. Para além dos antigénios também se encontram 4 bandas, uma de controlo negativo (estreptavidina) e três de controlo positivo, uma banda de 3+ (IgG anti-humana) , uma banda de 1+ (IgG humana) e uma banda de ±.(IgG humana).

###### Equipamento e material

Kit da Innogenetics

###### Parâmetros

HTLV-I/II (confirmatório)

###### Interpretação de resultados

A interpretação dos resultados encontra-se na seguinte tabela:

Tabela 4-4 – Interpretação dos resultados para HTLV-I/II

| <b>Bandas</b>                           | <b>Resultado</b> |
|-----------------------------------------|------------------|
| Nenhuma banda                           | Negativo         |
| 1 única banda:                          |                  |
| p 19 I/II ou p 24 I/II ou<br>gp 46 I/II | Negativo         |
| gp 21                                   | Indeterminado    |
| 2 bandas:                               |                  |
| gp 21 não reactivo                      | Indeterminado    |
| gp 21 reactivo                          | Positivo         |
| 3 bandas ou mais                        | Positivo         |

#### 4.8.8. Confirmatório de HIV-I/II

##### Fundamento

O método *western-blot* é também usado confirmar resultados positivos na detecção do Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2. Os antígenos do vírus são separados em bandas, por electroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com o seu peso molecular. Para a detecção adiciona-se o soro do paciente, que se vai ligar às proteínas existentes na tira de nitrocelulose. Seguidamente o processo é semelhante a ELISA: é adicionado soro ou plasma contra os anticorpos do paciente, marcado com enzima, cujo substrato, adicionado posteriormente, origina um produto visível que permite a detecção das bandas.

##### Parâmetros

##### HIV-I/II (confirmatório)

No caso do HIV, os antígenos usados bem como a sua interpretação encontram-se nas tabelas seguintes:

Tabela 4-5 - Antígenos presentes nas tiras de immunoblot para o HIV-1.

| <b>Antígenos</b> | <b>Nomenclatura</b> | <b>Natureza</b>                                |
|------------------|---------------------|------------------------------------------------|
| gp 160           | ENV                 | Glicoproteína precursora de gp 110/120 e gp 41 |

| Antígenos  | Nomenclatura | Natureza                               |
|------------|--------------|----------------------------------------|
| gp 110/120 | ENV          | Glicoproteína do envelope              |
| p 68/66    | POL          | Transcriptase reversa                  |
| p 55       | GAG          | Precursor das proteínas do <i>core</i> |
| p 52/51    | POL          | Transcriptase reversa                  |
| gp 41      | ENV          | Glicoproteína transmembranar           |
| p 40       | GAG          | Precursor das proteínas do <i>core</i> |
| p 34/31    | POL          | Endonuclease                           |
| p 24/25    | GAG          | Proteína do <i>core</i>                |
| p 18/17    | GAG          | Proteína do <i>core</i>                |

Tabela 4-6 - Interpretação dos perfis possíveis para o HIV-1, segundo a OMS.

| Interpretação | Critérios de Organização Mundial de Saúde (OMS) |
|---------------|-------------------------------------------------|
| Positivo      | 2 ENV ± GAG ± POL                               |
| Indeterminado | 1 ENV ± GAG ± POL<br>GAG + POL<br>GAG<br>POL    |
| Negativo      | Sem bandas<br>Nenhuma tira                      |

O indeterminado pode dever-se a seroconversão, infecção por HIV-2 ou reacção cruzada com outros retrovírus ou contaminação com outro soro positivo.

Tabela 4-7 – Antígenos presentes nas tiras de imunoblot para o HIV-2.

| Antígenos     | Nomenclatura | Natureza                        |
|---------------|--------------|---------------------------------|
| gp 140        | ENV          | Precursor de gp 105 e gp 36     |
| gp 105/gp 125 | ENV          | Glicoproteína de revestimento   |
| p 68          | POL          | Transcriptase reversa           |
| p 56          | GAG          | Precursor de proteínas internas |
| gp 36         | ENV          | Glicoproteína transmembranar    |

|      |     |                  |
|------|-----|------------------|
| p 34 | POL | Endonuclease     |
| p 26 | GAG | Proteína interna |
| p 16 | GAG | Proteína interna |

Tabela 4-8 – Interpretação dos perfis possíveis para o HIV-2.

| <b>Interpretação</b> | <b>Perfil</b>                                            |
|----------------------|----------------------------------------------------------|
| Positivo             | ENV + GAG + POL                                          |
| Indeterminado        | ENV + GAG<br>ENV + POL<br>GAG + POL<br>GAG<br>POL<br>ENV |
| Negativo             | Tiras não referenciadas<br>Nenhuma tira                  |

Podem ser obtidos perfis positivos e indeterminados por contaminação com outro soro positivo.

#### 4.8.9. Detecção de Vírus do Papiloma Humano (HPV)

No laboratório de virologia do serviço de patologia clínica do IPO, o diagnóstico de HPV segue uma marcha geral mais complexa que os outros vírus e com metodologias exclusivas, pelo que optei explicá-la à parte.

O diagnóstico de patologias causadas pelo vírus do papiloma humano é feito a partir de esfregaços, biópsias e zaragatoas. Na seguinte figura encontra-se o algoritmo da detecção de HPV.

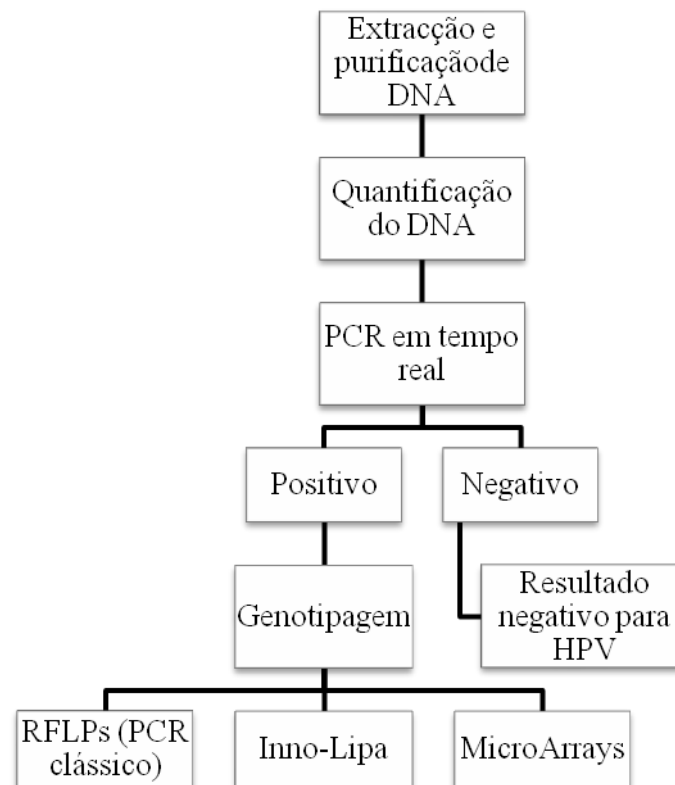


Figura 4-2 – Marcha geral para o diagnóstico das infecções causadas por HPV.

**Extracção e purificação de DNA** – A extracção e purificação do DNA é feita em colunas, manualmente, usando o kit QIAamp MinElute Vírus spin da QIAGEN® e envolve 4 passos: lise, precipitação, lavagem e eluição. A lise é feita *over-night* a 54°C com tampão e proteinase que inactiva as DNases. A precipitação é feita com etanol para permitir a ligação do DNA à membrana das colunas pois sendo a molécula de DNA não solúvel em álcool, esta tende a formar um aglomerado e precipitar com centrifugação. A lavagem, para remover os contaminantes, é feita com tampões e etanol e a eluição é feita também com tampão para um tubo de microcentrífuga. De seguida, o DNA é quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

**PCR em Tempo Real** – O PCR em Tempo Real já foi explicado no subcapítulo 4.2.3. No diagnóstico de HPV, o PCR em tempo real é realizado com o corante SYBR Green e trata-se de um ensaio qualitativo.

**RFLPs por PCR clássico** – Para a genotipagem do HPV, um dos métodos usados é o da Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) clássico associado ao Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição

(PCR-RFLP). Tal como já foi dito anteriormente, o PCR é um método de síntese de ácidos nucleicos *in vitro*, através do qual um determinado fragmento de DNA pode ser especificamente replicado. Requer a presença de dois oligonucleótidos (*primers*) que ladeiam o fragmento de DNA a amplificar, e que são usados como iniciadores de uma série de reacções sintéticas cíclicas catalisadas por uma DNA polimerase. A análise de RFLPs consiste em submeter a solução que contém o produto amplificado à clivagem pelas enzimas de restrição (RSA e Dde). O produto resultante é submetido a corrida electroforética. Os DNAs dos vários genótipos de HPV têm sítios de restrição diferentes pelo que os fragmentos resultantes vão ter mobilidades electroforéticas características e, consequentemente, tamanhos diferentes, característicos de cada genótipo.

**Inno-Lipa** – A genotipagem de HPV pela metodologia INNO-LiPA (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra da INNOGENETICS) é um ensaio que identifica 28 genótipos de HPV pela detecção de sequências específicas na região não conservada L1 do genoma do HPV. A metodologia consiste em amplificar parte da região L1 do genoma HPV usando *primers* SPF10. Os produtos de amplificação resultantes biotinilados são hibridizados com sondas oligonucleótidas específicas de cada genótipo. As sondas encontram-se imobilizadas em linhas em tiras de membrana. Após hibridização, é adicionada fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina, que se liga aos produtos biotinilados previamente formados, cujo a reacção com o substrato BCIP/NBP vai resultar numa cor púrpura, detectada visualmente. Cada tira contém 4 bandas de controlo e mais 28 bandas, cada uma correspondente a um genótipo de HPV.

**MicroArrays** - Outra metodologia usada para a genotipagem do HPV é o *microarrays*, usando o kit teste PapilloCheck que detecta 24 genótipos de HPV. O princípio deste ensaio baseia-se na detecção de um fragmento de gene E1 do HPV. Após a extracção do DNA, um fragmento de 350 nucleótidos do gene E1 e um fragmento do gene humano ADAT1 são amplificados na presença de *primers* específicos, resultando fragmentos de DNA de cadeia única. Os produtos da amplificação são hibridizados com sondas de DNA complementares, no chip. Cada *array* contém 5 réplicas de sondas de DNA, específicas de cada genótipo de HPV. A fluorescência dos produtos marcados (marcados durante o PCR e a hibridização), resultante da excitação com luz monocromática, é então detectada e a análise é feita pelo *software* CheckReport.

Estes diferentes métodos de genotipagem têm diferentes sensibilidades e especificidades pelo que são realizados consoante a quantidade de produto e os genótipos que se quer detectar.

## 5. CONTROLO DE QUALIDADE

### 5.1. Controlo de qualidade interno

A garantia de qualidade tem a responsabilidade de implantar, controlar avaliar e tomar decisões para eliminação das causas que originam as não conformidades.

O controlo de qualidade interno (CQI) trata-se de um conjunto de procedimentos que permitem, através da avaliação da precisão e exactidão de cada método, controlar a qualidade dos resultados das análises realizadas rotineiramente e é indispensável para a detecção de erros e a sua imediata correcção. Esta garantia de qualidade permite um diagnóstico eficaz. O CQI baseia-se num processo estatístico que permite verificar a fiabilidade dos resultados das amostras dos utentes, a partir da utilização regular de produtos de controlo de qualidade (material de referência). O material de referência deve ser da mesma matriz que as amostras testadas, ou seja, soro humano, sangue total, urina, etc; existem em 3 níveis (patológico baixo, normal e patológico alto) e são testados nas mesmas condições que as amostras. Na rotina de um laboratório de análises clínicas, podem ocorrer dois tipos de erro: erro aleatório e erro sistemático. Os erros aleatórios cuja direcção e magnitude não pode ser prevista, revelam-se através da dispersão em redor da média de um conjunto de medições efectuadas na mesma amostra (logo estão relacionados com a precisão de um dado método), Estes erros podem ser detectados pelas cartas de controlo interno e eliminados através do uso de um novo controlo (nova aliquota ou novo lote). Os erros sistemáticos assumem sempre a mesma direcção, provocando um desvio na média em relação valor “convencionalmente exacto” (logo estão relacionados com a exactidão de um dado método), pelo que são evidenciados ao longo do tempo. Estes erros podem ser causados pela degradação de reagentes ou deterioração de algum componente do aparelho e podem ser corrigidos através de uma nova calibração. A combinação destes dois tipos de erros representa o erro total. O erro total descreve a contribuição conjunta dos erros aleatórios e sistemáticos e pode funcionar como estimativa da incerteza da medição, ou seja, critério de validação.

Nos laboratórios de Bioquímica e Imunologia e Virologiada IPO, apesar de alguns dos equipamentos terem um programa próprio de CQI, é no programa MultiQC que são introduzidos e transmitidos a partir de todos os equipamentos do laboratório, todos os resultados de controlos realizados, bem como calibrações e mudanças de

lotes/reagentes. Este programa tem como vantagens em relação aos programas dos próprios equipamentos, as cartas de controlo serem construídas com uma média móvel adaptável aos resultados obtidos bem como limites de controlo que tanto podem ser estabelecidos pelo laboratório, com base em tabelas internacionais, ou pelo fornecedor.

#### 5.1.1. Laboratório de Bioquímica

No laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do IPO, o CQI abrange todos os parâmetros analisados. Os critérios de aceitação para os diversos parâmetros são definidos segundo o erro total admissível (ETa). O ETa é o intervalo de erro estipulado pelo laboratório com base em referências nacionais ou internacionais, que serve de base para caracterizar as margens de erro aceitáveis para um determinado método, tendo em consideração a utilização clínica prevista para os resultados.

Nas seguintes tabelas encontram-se os parâmetros avaliados por controlo interno, número de níveis, frequência e o critério de aceitação.

##### 5.1.1.1. Architect c8000/ci8200

Tabela 5-1 – Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento ARCHITECT c8000/ci8200

| Parâmetros          | Monitorização | Frequência  | Tolerância/Erro Total Admissível    |
|---------------------|---------------|-------------|-------------------------------------|
| Ácido úrico         | 3 níveis      | Manhã/tarde | 17%                                 |
| ALT                 | 3 níveis      | Manhã/tarde | <60 U/L→8 U/L<br>>60 U/L→15%        |
| Albumina            | 3 níveis      | Diária      | 10%                                 |
| Amilase             | 3 níveis      | Diária      | 14.6%                               |
| AST                 | 3 níveis      | Manhã/tarde | 15.2%                               |
| β-microglobulina    | 2 níveis      | Diária      | <2 µg/mL→ 0.2 µg/mL<br>>2 µg/mL→10% |
| Bilirrubina Directa | 3 níveis      | Manhã/tarde | 15%                                 |
| Bilirrubina Total   | 3 níveis      | Manhã/tarde | 20%                                 |
| Cálcio              | 3 níveis      | Manhã/tarde | 1 mg/dL                             |
| Colesterol          | 3 níveis      | Diária      | 8.5%                                |

| Parâmetros         | Monitorização | Frequência            | Tolerância/Erro Total Admissível |
|--------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|
| Creatina Quinase   | 3 níveis      | Diária                | <100 U/L→15 U/L<br>>100 U/L→15%  |
| Creatinina         | 3 níveis      | Manhã/tarde<br>/noite | 15%                              |
| Ferro              | 3 níveis      | Diária                | 15%                              |
| Fosfatase alcalina | 3 níveis      | Manhã/tarde           | <100 U/L→15 U/L<br>>100 U/L→15%  |
| Fósforo            | 3 níveis      | Manhã/tarde           | 10.2%                            |
| γ-GT               | 3 níveis      | Manhã/tarde           | <60 U/L→8 U/L<br>>60 U/L→15%     |
| Glucose            | 3 níveis      | Manhã/tarde           | 10%                              |
| Hemoglobina A1c    | 2 níveis      | 4ª feira              | <10% →0.5 g/dL<br>>10% →5%       |
| Colesterol HDL     | 3 níveis      | Diária                | 11.1%                            |
| Imunoglobulina A   | 3 níveis      | Diária                | 13.5%                            |
| Imunoglobulina G   | 3 níveis      | Diária                | 8%                               |
| Imunoglobulina M   | 3 níveis      | Diária                | 16.8%                            |
| Sódio              | 3 níveis      | Manhã/tarde<br>/noite | 4 mmol/L                         |
| Potássio           | 3 níveis      | Manhã/tarde<br>/noite | 5.8%                             |
| Cloro              | 3 níveis      | Manhã/tarde<br>/noite | 5%                               |
| LDH                | 3 níveis      | Manhã/tarde           | 20%                              |
| Colesterol LDL     | 3 níveis      | Diária                | 13.6%                            |
| Magnésio           | 3 níveis      | Manhã/tarde<br>/noite | 25%                              |
| PCR                | 2 níveis      | Diária                | 10%                              |
| Proteínas Totais   | 3 níveis      | Diária                | 10%                              |
| Transferrina       | 3 níveis      | Diária                | 5%                               |
| Triglicéridos      | 3 níveis      | Diária                | 25%                              |

| Parâmetros             | Monitorização | Frequência         | Tolerância/Erro Total Admissível           |
|------------------------|---------------|--------------------|--------------------------------------------|
| Ureia                  | 3 níveis      | Manhã/tarde        | 15.7%                                      |
| Proteínas<br>Urina/LCR | 2 níveis      | Diária             | 15%                                        |
| CK-MB                  | 3 níveis      | Diária             | 25%                                        |
| Troponina - I          | 3 níveis      | Diária             | 15%                                        |
| Ácido valpróico        | 3 níveis      | Quando há amostras | 15%                                        |
| Carbamazepina          | 3 níveis      | Quando há amostras | 25%                                        |
| Digoxina               | 3 níveis      | Quando há amostras | 20%                                        |
| Fenitoína              | 3 níveis      | Quando há amostras | 25%                                        |
| Fenobarbital           | 3 níveis      | Quando há amostras | 10%                                        |
| Teofilina              | 3 níveis      | Quando há amostras | 25%                                        |
| Amicacina              | 3 níveis      | Diária             | <20 µg/mL→2 µg/mL<br>>20 µg/mL→10%         |
| Vancomicina            | 3 níveis      | Diária             | <20 µg/mL→2 µg/mL<br>>20 µg/mL→10%         |
| Ciclosporina           | 3 níveis      | 3ª e 6ª feira      | 25%                                        |
| Tacrolimus             | 3 níveis      | 2ª e 5ª feira      | 25%                                        |
| Ferritina              | 3 níveis      | Diária             | 16%                                        |
| Folatos                | 3 níveis      | Diária             | <7 ng/mL→30%<br>>7 ng/mL→15%               |
| Vitamina B12           | 3 níveis      | Diária             | <100 pg/mL→27.1<br>pg/mL<br>>100 pg/mL→20% |

| Parâmetros             | Monitorização | Frequência | Tolerância/Erro Total Admissível            |
|------------------------|---------------|------------|---------------------------------------------|
| $\alpha$ -fetoproteína | 3 níveis      | Diária     | <30.12 ng/mL→6.02 ng/mL<br>>30.12 ng/mL→20% |
| CA 125                 | 2 níveis      | Diária     | 20%                                         |
| CA 15.3                | 2 níveis      | Diária     | 20.9%                                       |
| CA 19.9                | 2 níveis      | Diária     | 39%                                         |
| CEA                    | 2 níveis      | Diária     | 20%                                         |
| PSA total              | 2 níveis      | Diária     | 33.6%                                       |
| SCC                    | 3 níveis      | Diária     | 20%                                         |

5.1.1.2. Urisys 2400

Tabela 5-2 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento Urisys 2400

| Parâmetros       | Monitorização                          | Frequência |
|------------------|----------------------------------------|------------|
| Bilirrubina      | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária     |
| Corpos cetónicos | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Densidade        | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Glucose          | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Hemoglobina      | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Leucócitos       | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Nitritos         | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| pH               | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |

| Parâmetros     | Monitorização                          | Frequência |
|----------------|----------------------------------------|------------|
| Proteínas      | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |
| Urobilinogénio | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo |            |

#### 5.1.1.3. RapidLab 348

Tabela 5-3 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento RapidLab 348

| Parâmetros       | Monitorização | Frequência | Tolerância/Erro Total Admissível |
|------------------|---------------|------------|----------------------------------|
| pCO <sub>2</sub> | 3 níveis      | Diária     | <25 mmHg→2 mmHg<br>>25 mmHg→8%   |
| pH               | 3 níveis      | Diária     | 0.04                             |
| pO <sub>2</sub>  | 3 níveis      | Diária     | <100 mmHg→5 mmHg<br>>100 mmHg→5% |

#### 5.1.1.4. TDx/FLx

Tabela 5-4 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento TDx/FLx

| Parâmetros  | Monitorização | Periodicidade                | Tolerância/Erro Total Admissível      |
|-------------|---------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Metotrexato | 6 níveis      | Diária ou quando há amostras | <1 µmol/L→0.1 µmol/L<br>>1 µmol/L→10% |

#### 5.1.2. Laboratório de Imunologia

Tal como no laboratório de bioquímica, no laboratório de Imunologia do serviço de patologia clínica do IPO, o CQI abrange todos os parâmetros analisados e o critério de aceitação é o erro total admissível (ETa).

Nas seguintes tabelas encontram-se os parâmetros avaliados por controlo interno, número de níveis, frequência e o critério de aceitação, ordenados por equipamento/metodologia (autoimunidade).

5.1.2.1. BN ProSpec

Tabela 5-5 - Controle de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento BN ProSpec

| Parâmetros                | Monitorização | Frequência                       | Tolerância/Erro Total Admissível         |
|---------------------------|---------------|----------------------------------|------------------------------------------|
| $\alpha$ -1-Micro (Urina) | 1 nível       | Quando há amostras               | 43.9%                                    |
| $\alpha$ -2-Macro (Urina) | 1nível        | Quando há amostras               | 34.7%                                    |
| Albumina                  | 2 níveis      | Quando há amostras               | <2000 mg/dL→200 mg/dL<br>>2000 mg/dL→10% |
| Albumina LCR              | 1 nível       | Quando há amostras               | <100 mg/dL→10 mg/dL<br>>100 mg/dL→10%    |
| Microalbumina             | 1 nível       | Quando há amostras               | 46.1%                                    |
| Alfa-1-Antitripsina       | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 20%                                      |
| C3                        | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 12%                                      |
| C4                        | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 11.5%                                    |
| Ceruloplasmina            | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 7.9%                                     |
| Haptoglobina              | 3 níveis      | Diária (2 níveis)                | 27.3%                                    |
| IgA LCR                   | 1 nível       | Quando há amostras               | 15%                                      |
| IgM LCR                   | 1 nível       | Quando há amostras               | 15%                                      |
| IgG LCR                   | 1nível        | Quando há amostras               | 15%                                      |
| IgG                       | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 8%                                       |
| IgG Ur                    | 1 nível       | Quando há amostras               | 20%                                      |
| IgG <sub>1</sub>          | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 15%                                      |
| IgG <sub>2</sub>          | 3 níveis      | Quando há amostras<br>(2 níveis) | 15%                                      |

| Parâmetros       | Monitorização | Frequência                    | Tolerância/Erro Total Admissível |
|------------------|---------------|-------------------------------|----------------------------------|
| IgG <sub>3</sub> | 3 níveis      | Quando há amostras (2 níveis) | 15%                              |
| IgG <sub>4</sub> | 3 níveis      | Quando há amostras (2 níveis) | 15%                              |
| IgE              | 3 níveis      | Quando há amostras (2 níveis) | 20%                              |
| IgM              | 3 níveis      | Quando há amostras (2 níveis) | 16.8%                            |
| IgD              | 1 nível       | Quando há amostras            | 20%                              |
| Kappa            | 3 níveis      | Diária (2 níveis)             | 15.0%                            |
| Kappa Ur         | 1 nível       | Quando há amostras            | 15%                              |
| Kappa Livre      | 2 níveis      | Diária (1 nível)              | 30%                              |
| Lambda           | 3 níveis      | Diária (2 níveis)             | 15.0%                            |
| Lambda Ur        | 1 nível       | Quando há amostras            | 15%                              |
| Lambda livre     | 2 níveis      | Diária (1 nível)              | 20%                              |
| Pré-albumina     | 3 níveis      | Diária (2 níveis)             | 14.5%                            |
| RA               | 1 nível       | Quando há amostras            | 13.5%                            |
| TASO             | 1 nível       | Quando há amostras            | 10%                              |

#### 5.1.2.2. Cobas e411

Tabela 5-6 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento Cobas e411

| Parâmetros | Monitorização | Frequência     | Tolerância/Erro Total Admissível |
|------------|---------------|----------------|----------------------------------|
| CA 72.4    | 2 níveis      | 3ª e 6ª feiras | 20%                              |
| NSE        | 2 níveis      | 3ª e 6ª feiras | 20%                              |
| Cyfra 21.1 | 2 níveis      | 3ª e 6ª feiras | 28.2%                            |

5.1.2.3. Hydrasys/Hydraplus

Tabela 5-7 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento Hydrasys/Hydraplus

| <b>Parâmetros</b> | <b>Monitorização</b> | <b>Frequência</b> | <b>Tolerância/Erro Total Admissível</b> |
|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| Albumina          | 2 níveis             | Diária (1 nível)  | 10%                                     |
| Alfa-1globulina   | 2 níveis             | Diária (1 nível)  | 15.7%                                   |
| Alfa-2 globulina  | 2 níveis             | Diária (1 nível)  | 12.6%                                   |
| Beta-2 globulina  | 2 níveis             | Diária (1 nível)  | 15%                                     |
| Gama globulina    | 2 níveis             | Diária (1 nível)  | 16.8%                                   |

5.1.2.4. Autoimunidade – Imunofluorescência Indirecta

Tabela 5-8 – Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados por imunofluorescência indirecta, na autoimunidade.

| <b>Parâmetros</b> | <b>Monitorização</b>                   | <b>Frequência</b> |
|-------------------|----------------------------------------|-------------------|
| ANA               | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |
| ANCA              | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |
| FI                | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |
| Tecidos           | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |
| VSM47             | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |
| DNA               | Controlo Negativo<br>Controlo Positivo | Diária            |

Tabela 5-9 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados por ELISA, na autoimunidade.

| Parâmetros                      | Monitorização                           | Frequência | Tolerância |
|---------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|
| ATC anti-Cardiolipina IgG       | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-Cardiolipina IgM       | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti- $\beta$ 2Glicop I IgG | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC $\beta$ 2Glicop I IgM       | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-APCA                   | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-dsDNA-Ncx              | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-AMA-M2-3E              | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-Transglutaminase IgA   | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |
| ATC anti-Transglutaminase IgG   | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária     | 30%        |

\*A monitorização do **controlo negativo** dos diferentes ensaios não obedece ao tipo de avaliação estabelecida para os Controlos Positivos. Neste caso, devem estar dentro dos intervalos definidos como “Negativo”.

Tabela 5-10 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados por *Immuno blot*, na autoimunidade

| Ensaio            | Monitorização     | Periodicidade |
|-------------------|-------------------|---------------|
| ANA Profile 3 IgG | Controlo Interno  | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Kit       |

| Ensaio                           | Monitorização     | Periodicidade |
|----------------------------------|-------------------|---------------|
| Perfil Miosites IgG              | Controlo Interno  | Por Corrida   |
|                                  | Controlo Positivo | Por Kit       |
| Perfil anti-MPO,PR3 e GBM (IgG)  | Controlo Interno  | Por Corrida   |
|                                  | Controlo Positivo | Por Kit       |
| Perfil Esclerose sistémica (IgG) | Controlo Interno  | Por Corrida   |
|                                  | Controlo Positivo | Por Kit       |
| Perfil Hepático IgG              | Controlo Interno  | Por Corrida   |
|                                  | Controlo Positivo | Por Kit       |

#### 5.1.2.5. Diagnóstico de infeções

Tabela 5-11 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no diagnóstico das infeções, por hemaglutinação indirecta e aglutinação em lâmina.

| Ensaio            | Monitorização     | Periodicidade |
|-------------------|-------------------|---------------|
| RPR               | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| TPHA              | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Reacção Widal     | Controlo Negativo | NA            |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Monotest          | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Reacção Huddleson | Controlo Negativo | NA            |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Brucella Capt     | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Waler-Rose        | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |
| Hidatidose        | Controlo Negativo | Por Corrida   |
|                   | Controlo Positivo | Por Corrida   |

Tabela 5-12 - Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no diagnóstico das infeções, por ELISA.

| Ensaio                     | Monitorização                           | Periodicidade | Tolerância |
|----------------------------|-----------------------------------------|---------------|------------|
| Treponema pallidum IgG/IgM | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária        | 30%        |
| Treponema pallidum IgM     | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária        | 30%        |
| Aspergillus EIA            | Controlo Negativo*<br>Controlo Positivo | Diária        | 30%        |

\*A monitorização do **controlo negativo** dos diferentes ensaios não obedece ao tipo de avaliação estabelecida para os Controlos Positivos. Neste caso, devem estar dentro dos intervalos definidos como “Negativo”.

### 5.1.3. Laboratório de Virologia

No laboratório de virologia do Serviço de Patologia Clínica do IPO, além dos controlos internos dos kits, também são usados controlos Accurun, que servem tanto como controlos internos como para controlos externos, sendo os valores comparados com outros laboratórios que os usem (através do *software* Intence). O controlo de qualidade dos ensaios realizados no laboratório de virologia e descritos no capítulo 4 encontram-se nas seguintes tabelas.

#### 5.1.3.1. Architect i2000Sr

Tabela 5-13 -Controlo de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento Architect.

| Vírus           | Parâmetros | Monitorização                                                    | Frequência | Tolerância/<br>Erro total<br>admissível |
|-----------------|------------|------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------|
| Citomegalovírus | CMV IgM    | Controlo negativo*<br>Controlo positivo                          | Diária     | 30%                                     |
|                 | CMV IgG    | Controlo negativo*<br>Controlo positivo 1<br>Controlo positivo 2 | Diária     | 30%                                     |
| HTLV            | HTLV I +II | Controlo negativo*                                               | Diária     | 30%                                     |

| <b>Vírus</b> | <b>Parâmetros</b>            | <b>Monitorização</b>                                                                                | <b>Frequência</b> | <b>Tolerância/<br/>Erro total<br/>admissível</b> |
|--------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
|              |                              | Controlo positivo<br>Accurun                                                                        |                   |                                                  |
| HIV          | HIV-1 e<br>HIV2 + Ag p<br>24 | Controlo negativo*<br>Controlo positivo 1<br>Controlo positivo 2<br>Controlo positivo Ag<br>Accurun | Diária            | 30%                                              |
| Hepatite B   | AgHBs                        | Controlo negativo*<br>Controlo positivo<br>Accurun                                                  | Diária            | 30%                                              |
|              | Core total                   | Controlo negativo*<br>Controlo positivo<br>Accurun                                                  |                   | 25%                                              |
|              | Anti-HBs                     | Controlo negativo*<br>Controlo positivo 1<br>Controlo positivo 2                                    |                   | 30%                                              |
|              | AgHBe                        | Controlo negativo*<br>Controlo positivo                                                             |                   | 30%                                              |
|              | Anti-HBe                     | Controlo negativo*<br>Controlo positivo                                                             |                   | 30%                                              |
|              | Core IgM                     | Controlo negativo*<br>Controlo positivo                                                             |                   | 30%                                              |

5.1.3.2. LIAISON

Tabela 5-14 – Controle de qualidade interno para os parâmetros determinados no equipamento LIAISON®.

| <b>Vírus</b>       | <b>Parâmetros</b> | <b>Monitorização</b>                    | <b>Frequência</b> | <b>Tolerância/Erro total admissível</b> |
|--------------------|-------------------|-----------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| Citomegalovírus    | CMV IgM           | Controlo negativo*<br>Controlo positivo | Diária            |                                         |
|                    | CMV IgG           | Controlo negativo*<br>Controlo positivo | Diária            | 30%                                     |
| Vírus Epstein-Barr | VCA IgM           | Controlo negativo*<br>Controlo positivo | Diária            | 30%                                     |
|                    | VCA IgG           | Controlo negativo*<br>Controlo positivo |                   | 30%                                     |
|                    | EBNA IgG          | Controlo negativo*<br>Controlo positivo |                   | 30%                                     |
|                    | EA IgG            | Controlo negativo*<br>Controlo positivo |                   | 30%                                     |

5.1.3.3. Ensaio manual

Tabela 5-15 - de qualidade interno para os parâmetros determinados manualmente.

| <b>Vírus</b>               | <b>Parâmetros</b>    | <b>Monitorização</b>                             | <b>Frequência</b> | <b>Tolerância/Erro total admissível</b>              |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|
| Vírus Herpes Humano tipo 6 | HHV6 IgG             | Controlo negativo<br>Controlo positivo<br>Branco | Diária            | 30%                                                  |
| Citomegalovírus            | Antigenémia CMV pp65 | Controlo positivo                                | Diária            | Células positivas (núcleo corado de vermelho)        |
|                            |                      | Resultado                                        | Mensal            | Comparação de resultados entre diferentes operadores |
| Herpes Humano tipo 6       | HHV6 IgM             | Controlo negativo                                | Diária            | Sem fluorescência                                    |
|                            |                      | Controlo positivo                                | Diária            | Fluorescência > 2+                                   |
|                            |                      | Resultados                                       | Diária            | Comparação de resultados entre diferentes operadores |
| Herpes Humano tipo 8       | HHV8 IgG             | Controlo negativo                                | Diária            | Sem fluorescência                                    |
|                            |                      | Controlo positivo                                | Diária            | Fluorescência > 2+                                   |
|                            |                      | Resultados                                       | Diária            | Comparação de resultados entre diferentes operadores |

| <b>Vírus</b>          | <b>Parâmetros</b>  | <b>Monitorização</b>                    | <b>Frequência</b> | <b>Tolerância/Erro total admissível</b>                                                                                            |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | Confirmatório HTLV | Controlo negativo                       | Por corrida       | Presença das bandas de controlo $\pm$ , 1+ e 3+. Ausência de bandas específicas de HTLV I/II                                       |
|                       |                    | Controlo positivo                       | Por corrida       | Presença das bandas de controlo e de, pelo menos, intensidade $\pm$ nas bandas: p19 I/II, p24 I/II, gp 46 I/II, gp 21 I/II, gp46 I |
| Vírus Papiloma Humano | HPV SYBR Green     | Controlo negativo HPV                   | Por corrida       |                                                                                                                                    |
|                       |                    | Controlo negativo Albumina              | Por corrida       |                                                                                                                                    |
|                       |                    | Controlo positivo HPV 18 (Células HEla) | Por corrida       |                                                                                                                                    |
|                       |                    | Controlo positivo Albumina              | Por corrida       |                                                                                                                                    |
|                       | HPV MicroArrays    | Controlo negativo                       | Por corrida       |                                                                                                                                    |
|                       | HPV INNOLIPA       | Controlo negativo                       | Por corrida       |                                                                                                                                    |

| Vírus | Parâmetros | Monitorização     | Frequência  | Tolerância/Erro total admissível |
|-------|------------|-------------------|-------------|----------------------------------|
|       |            | Controlo positivo | Por corrida |                                  |

## 5.2. Avaliação externa da qualidade

A avaliação externa da qualidade (AEQ) consiste na avaliação dos resultados obtidos no laboratório, por um organismo externo. Tal é feito através do envio de uma amostra controlo, fornecida pela entidade externa. A AEQ permite avaliar a exactidão, identificar erros sistemáticos ou tendências. No âmbito da AEQ existem vários programas:

- INSA (PNAEQ) – Instituto Dr. Ricardo Jorge (Portugal)
- QCMD - Quality Control Molecular Diagnostics
- INSTAND
- RIQAS – Irladox (Irlanda)
- NEQAS – National External Quality Assessment Scheme (Reino Unido)

No laboratório, as amostras são tratadas nas mesmas condições que as amostras de pacientes e os resultados são enviados à entidade respectiva.

O tratamento de dados é da responsabilidade da entidade externa que envia um relatório em que constam os resultados de todos os laboratórios participantes. Dependendo do resultado, o laboratório pode ter que aplicar medidas correctivas ou preventivas. Caso o resultado fique fora dos limites 2SD ou 3SD (critério de aceitação da maioria dos programas), deve ser reanalisado. Caso o resultado persista deve-se proceder à verificação do erro e à calibração. Os resultados obtidos com a calibração anterior devem ser avaliados e, se necessário, proceder a nova análise.

### 5.2.1. Laboratório de Bioquímica

Na tabela seguinte encontra-se descrita a avaliação externa dos parâmetros analisados no laboratório de Bioquímica do IPO.

Tabela 5-16 – Avaliação externa da qualidade dos parâmetros determinados no laboratório de bioquímica.

| Entidade Organizadora | Parâmetro                                                                                                                                                                                                                                                                     | Frequência Anual (Nº Amostras) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| INSA (PNAEQ)          | Pré - analítica                                                                                                                                                                                                                                                               | 2 X Ano                        |
|                       | Pós - analítica                                                                                                                                                                                                                                                               | 2 X Ano                        |
|                       | Segurança Laboratorial                                                                                                                                                                                                                                                        | 1 X Ano                        |
|                       | Urina tipo II                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Imunologia (PCR, $\beta$ 2-Microglobulina, IgA, IgG, IgM, Transferrina)                                                                                                                                                                                                       | 2 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Hemoglobina Glicada                                                                                                                                                                                                                                                           | 2 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Química Clínica Rotina I (Ácido úrico, Bilirrubina total, Cálcio, Colesterol, Creatinina, Ferro, Fósforo, Glucose, Magnésio, Triglicéridos, ureia)                                                                                                                            | 4 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Química Clínica Rotina II (ALT, AST, ALP, Colesterol, Colesterol HDL, Colesterol LDL, CK, Creatinina, GGT, Ionograma, LD, Proteínas totais, Ácido valproico, Carbamazepina, Digoxina, Fenitoína, Fenobarbital, Folatos, Teofilina, Vancomicina, Vitamina B12, CEA, PSA total) | 4 X Ano (1 amostra)            |
|                       | Marcadores Cardíacos (CK-MB, Troponina-I)                                                                                                                                                                                                                                     | 5 X Ano (2 amostras)           |
| INSTAND               | Drogas terapêuticas (Amicacina/Vancomicina/MTX)                                                                                                                                                                                                                               | 6 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Gases no sangue                                                                                                                                                                                                                                                               | 6 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Urina Química II (Ácido úrico, Cálcio, Creatinina, Fósforo, Glucose, Ionograma, Magnésio, Ureia, $\beta$ 2-Microglobulina)                                                                                                                                                    | 6 X Ano (2 amostras)           |
|                       | Marcadores Tumorais (AFP, CEA, CA125, CA19.9, CA 15.3, PSA total, SCC)                                                                                                                                                                                                        | 6 X Ano (2 amostras)           |

| Entidade Organizadora | Parâmetro                                                                                                                                                                                                                                                              | Frequência Anual (Nº Amostras) |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| IRLANDOX (RIQAS)      | Química Clínica Geral (soro) (Ácido úrico, Albumina, Amilase, ALT, AST, ALP, Bilirrubina total, Bilirrubina directa, Cálcio, Colestrol, CK, Creatinina, Ferro, Fósforo, GGT, Glucose, Ionograma, LD, Magnésio, Proteínas totais, Triglicéridos, Ureia, UIBC, PSA total | 2 X Mês (1 amostra)            |
|                       | Proteínas Específicas (AFP, PCR, Ferritina, $\beta$ 2-Microglobulina, IgA, IgG, IgM, Transferrina                                                                                                                                                                      | 2 X Mês (1 amostra)            |
|                       | Imunoensaio (Ácido Valpróico, Carbamazepina, Digoxina, Fenitoína, Fenobarbital, Teofilina, Folatos, Vitamina B12, CA 125, CA15.3, CA 19.9, CEA, PSA total, Ferritina,                                                                                                  | 2 X Mês (1 amostra)            |
| BIOGNÓSTICA (NEQAS)   | Ciclosporina                                                                                                                                                                                                                                                           | 1 X Mês (3 amostras)           |
|                       | Tacrolimus                                                                                                                                                                                                                                                             | 1 X Mês (3 amostras)           |

## 5.2.2. Laboratório de Imunologia

Tabela 5-17 - Avaliação externa da qualidade dos parâmetros determinados no laboratório de imunologia.

| Entidade organizadora | Parâmetros                                                                                                                                      | Frequência                 |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| RIQAS                 | $\alpha$ -1-Antitripsina, Albumina, C3, C4, Ceruloplasmina, IgE Haptoglobina, Kappa, Lambda, Kappa Livre, Lambda livre, RA e TASOm Pré-albumina | 2x/Mês<br>(1 amostra)      |
| INSA (PNAEQ)          | $\alpha$ -1-Antitripsina, Albumina, C3, C4, Ceruloplasmina, IgE Haptoglobina, Kappa, Lambda, Kappa Livre, Lambda livre, RA e TASOm Pré-albumina | 2x/Ano<br>(2 amostras)     |
|                       | Proteinograma                                                                                                                                   | 4x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Electroforese das hemoglobinas                                                                                                                  | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Sífilis                                                                                                                                         | 3x/Ano (1 Amostra)         |
|                       | Brucelose                                                                                                                                       | 3x/Ano (1 Amostra)         |
| INSTAND               | Albumina Ur                                                                                                                                     | 6x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Albumina, IgA, IgM e IgG LCR                                                                                                                    | 4x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | CA 72.4, NSE, Cyfra 21.1                                                                                                                        | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | ASMA /F -actina                                                                                                                                 | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | AMA                                                                                                                                             | 2x/Ano (2 Amostra)         |
|                       | APCA                                                                                                                                            | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | LKM -1                                                                                                                                          | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Sífilis                                                                                                                                         | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Salmonelose                                                                                                                                     | 2x/Ano (2 Amostras)        |
|                       | Hidatidose                                                                                                                                      | 1x/Ano (2 Amostras)        |
| NEQAS                 | Imunofixação                                                                                                                                    | 6 x /Ano<br>(Soro e urina) |
|                       | Imunofixação Bence-Jones                                                                                                                        | 6x/Ano<br>(Soro e urina)   |

| Entidade organizadora | Parâmetros                                                                | Frequência            |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|                       | Imunofixação LCR                                                          | 6x/Ano (1 Amostra)    |
|                       | ANA IIF                                                                   | 5x/Ano (2 Amostras)   |
|                       | tTg IgA,                                                                  | 5 x /Ano (2 Amostras) |
|                       | DNA IFI                                                                   | 5 x /Ano (2 Amostras) |
|                       | ANCA IFI, PR3, MPO                                                        | 5x/Ano (2 amostras)   |
|                       | ATC anti-Cardiolipina IgG, IgM, ATC anti-β2Glicop I IgG,IgM               | 5x/Ano (2 Amostras)   |
|                       | Sífilis                                                                   | 2x/Ano (2 Amostras)   |
| MBL                   | ANA IIF                                                                   | 1x/Ano (1 Amostra)    |
|                       | DNA IFI                                                                   | 1x/Ano (1 Amostra)    |
|                       | ASMA /F -actina                                                           | 1x/Ano (1 Amostra)    |
|                       | AMA                                                                       | 1x/Ano (1 Amostra)    |
| Euroimunn             | ANA IIF                                                                   | 2x/Ano (3 Amostras)   |
|                       | DNA IFI                                                                   | 2x/Ano (2 Amostras)   |
|                       | ANCA IFI, PR3, MPO                                                        | 2x/Ano (2 Amostras)   |
|                       | ATC anti-Cardiolipina IgG, IgM, ATC anti-β2Glicop I IgG,IgM               | 2x/Ano (2 Amostras)   |
| Não disponível        | α-1-Micro, α-2-Macro Ur                                                   | NA                    |
|                       | IgD                                                                       | NA                    |
|                       | IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> e IgG <sub>4</sub> | NA                    |
|                       | IgG Ur, Lambda Ur, Kappa Ur                                               | NA                    |
|                       | IgG,IgA, IgM                                                              | NA                    |

### 5.2.3. Laboratório de Virologia

O laboratório de virologia do serviço de patologia clínica do IPO tem implementado programas de avaliação externa de qualidade para a serologia e biologia molecular.

Na tabela seguinte encontra-se os programas de AEQ, bem como a respectiva frequência, que realizam avaliação externa dos parâmetros descritos anteriormente.

Tabela 5-18 - Avaliação externa da qualidade de alguns parâmetros determinados no laboratório de virologia.

| Parâmetros                                        | Programas AEQ         | Frequência    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|---------------|
| Serologia CMV IgG e IgM                           | Instand               | 2x/ano        |
| Carga viral CMV                                   | QCMD                  | 1x/ano        |
|                                                   | Instand               | 1x/ano        |
| Antigenémia CMV pp65                              | Não disponível        | Não se aplica |
| Serologia HHV-8 IgG                               | Não disponível        | Não se aplica |
| Carga viral HHV-8                                 | Não disponível        | Não se aplica |
| Serologia HHV-6 IgG e IgM                         | Não disponível        | Não se aplica |
| Carga viral HHV-6                                 | Não disponível        | Não se aplica |
| Serologia Parvovírus B19 IgG e IgM                | Instand               | 2x/ano        |
| Serologia EBV VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG e VCA IgM | Instand               | 2x/ano        |
| Carga viral EBV                                   | QCMD                  | 1x/ano        |
|                                                   | Instand               | 1x/ano        |
| Serologia HTLV                                    | InterQC               | Semanal       |
| Serologia HIV (com confirmatório)                 | Instand               | 2x/ano        |
|                                                   | InterQC               | Semanal       |
|                                                   | Intencle              | Semanal       |
| Serologia Hepatite B                              | Instand               | 2x/ano        |
|                                                   | InterQC (AgHBs, Core) | Semanal       |
| Serologia Hepatite C                              | Instand               | 2x/ano        |
|                                                   | Intencle              | Semanal       |
| Vírus Papiloma Humano                             | NEQAS                 | 3x/ano        |
|                                                   | QCMD                  | 1x/ano        |
|                                                   | WHO HPV LabNet        | Variável      |
|                                                   | Instand               | 2x/ano        |

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
**CLÍNICA DE DIAGNÓSTICOS DR. FERNANDO TEIXEIRA**

**ORIENTAÇÃO:**  
Dr<sup>a</sup> Manuela Azevedo

*Catarina Carapucinha Cabeçadas*

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2011**

## **INTRODUÇÃO À CLÍNICA DE DIAGNÓSTICOS DR. FERNANDO TEIXEIRA**

O estágio correspondente à valência de Microbiologia foi feito na Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira, em Lisboa.

A Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira resultou da continuidade de um laboratório familiar iniciado nos anos 50 (Laboratório Dr. Custódio Teixeira e Dr. Fernando Teixeira), tendo a nova designação resultado da continuidade dada pelo Dr. Fernando Teixeira, no início da década de 60, apenas com o nome individual de Laboratório Dr. Fernando Teixeira.

O laboratório encontra-se acreditado pelo IPAC desde 2002, primeiro pela norma NP EN ISO/IEC 17025, e posteriormente pela NP EN ISO 15189 de aplicação específica a laboratórios clínicos.

A Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira faz parte da rede de laboratórios de diagnóstico internacionais, Labco. Presentemente, encontra-se situada no centro de Lisboa mas está aliada a uma rede de cerca de 29 postos de colheita espalhados pelo país.

A clínica é constituída por recepção, central de colheitas, laboratórios das diversas áreas (Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, etc), área de controlo de qualidade e área administrativa.

## 6. MICROBIOLOGIA

### 6.1. Objectivo

O estágio na valência Microbiologia faz parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira do Instituto, sob a orientação da Dr<sup>a</sup> Manuela Azevedo.

### 6.2. Introdução

O Laboratório de Microbiologia é responsável por examinar amostras colhidas dos doentes para pesquisa de microrganismos potencialmente patogénicos e determinar a sensibilidade dos mesmos em relação a antibióticos. O Laboratório deve fornecer, rápida e economicamente, a informação que possa ser útil ao médico no tratamento dos seus doentes para além de registar e investigar novos factos que surjam no decorrer da actividade.

O laboratório recebe os seguintes produtos biológicos:

- Exsudados genitais;
- Exsudado rectal;
- Exsudado auricular/ocular;
- Exsudado nasofaríngeo;
- Expectoração;
- Secreções brônquicas;
- Lavado bronco-alveolar;
- Líquidos orgânicos;
- Líquido céfalo-raquidiano;
- Exsudado de ferida;
- Esperma;
- Hemocultura;
- Urina asséptica;
- Fezes;
- Escamas de pele, fios de cabelo e unhas.

### 6.3. Laboratório de Microbiologia

#### 6.3.1. Equipamento

O laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira envolve bacteriologia, micologia e parasitologia e encontra-se separado dos restantes laboratórios. As instalações encontram-se equipadas com:

Equipamento geral

- Filtro para renovação de ar;
- Estufas de incubação, a 30°C e 37°C, calibradas;
- Frigoríficos;
- Centrifugas;
- Microscópios ópticos;
- Câmara de fluxo laminar;
- Bico de Bunsen;
- Vórtex
- Câmara de fluxo laminar;

Equipamento específico:

- VITEK 2 da BioMérieux
- Mini API da BioMérieux

##### 6.3.1.1. VITEK 2

O equipamento de identificação automática usado no laboratório de microbiologia é o VITEK 2. Este equipamento automatiza todos os passos para chegar à identificação e aos testes de sensibilidade. O VITEK 2 é constituído por uma estação de enchimento, incubadora/leitor, computador e impressora. A estação de enchimento trata-se de uma câmara de vácuo que força as amostras diluídas a fluir para as cartas. A incubadora/leitor incuba e faz a leitura das cartas tendo como metodologia, a colorimetria para a identificação e a turbidimetria para os antibiogramas. As cartas de identificação contêm substratos desidratados usados pelas bactérias e leveduras enquanto as cartas teste de sensibilidade contêm antibióticos desidratados. A reacção das bactérias e/ou leveduras com os substratos e antibióticos vai resultar numa cor ou turvação, lida pelos sensores fotométricos. O computador, onde se encontra o *software*

do equipamento, armazena os dados, processa-os, interpreta-os e transmite-os para a impressora.

As cartas de identificação usadas no laboratório são:

- GP *card* – identificação de bactérias gram positivo.
- GN *card* – identificação de bactérias gram negativo.
- NH *card* – identificação de *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp., etc.
- YST *card* – identificação de leveduras.

#### 6.3.1.2. Mini API

O equipamento mini API é usado no laboratório de microbiologia da clínica com o objectivo de fazer o teste de sensibilidade aos *Haemophilus* spp. e *Moraxella catarrhalis*, através da galeria ATB HAEMO; e *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos através da galeria ATB STREP 5, testes estes que não são feitos pelo VITEK 2. As galerias são constituídas por pares de cúpulas, com uma ou duas concentrações (c e C). O mini API lê a turvação presente nas cúpulas, resultante da reacção da bactéria com o antibiótico. A leitura é feita da seguinte maneira:

#### **Para os antibióticos testados com duas concentrações:**

Tabela 6-1 – Leitura dos resultados dos antibióticos testados com duas concentrações.

| Aspecto das cúpulas |       | Resultados |   | A estirpe é: |
|---------------------|-------|------------|---|--------------|
| c                   | C     | c          | C |              |
| Claro               | Claro | -          | - | Sensível     |
| Turvo               | Claro | +          | - | Intermédio   |
| Turvo               | Turvo | +          | + | Resistente   |

**Para os antibióticos testados com uma única concentração:**

Tabela 6-2 - Leitura dos resultados dos antibióticos testados com uma concentração.

| Aspecto da cúpula | Resultado | A estirpe é: |
|-------------------|-----------|--------------|
| Claro             | -         | Sensível     |
| Turvo             | +         | Resistente   |

**6.3.2. Antibióticos e antibiogramas**

Um antibiótico é um agente antimicrobiano de origem natural (produzido por microrganismos) ou sintética que actua contra agentes infecciosos. A sua acção tem como alvo fases do metabolismo bacteriano.

As diferentes estirpes de algumas espécies patogénicas têm sensibilidades constantes para permitirem a escolha do antibiótico a utilizar, com base apenas na sua identificação. No entanto, para a maioria das bactérias patogénicas, as respectivas estirpes diferem quanto à sensibilidade aos antibióticos, sendo necessário determinar, para a estirpe isolada e, por meios de ensaios laboratoriais, a gama de antibióticos que se revelam activos contra essa estirpe - o antibiograma (ou TSA, teste de sensibilidade aos antibióticos).

No âmbito das análises clínicas, o laboratório de microbiologia tem a responsabilidade de avaliar, *in vitro*, as interacções entre o microrganismo isolado e os agentes antimicrobianos para tratamento *in vivo*. Os objectivos de se fazer um TSA são medir a susceptibilidade de uma estirpe bacteriana em relação a um ou mais antibióticos permitir a monitorização da evolução da resistência bacteriana.

Contudo, o tratamento contra um agente patogénico que se revelou sensível no laboratório, ao antibiótico aplicado, pode falhar porque o referido antibiótico não é adequadamente absorvido pelo doente ou porque não penetra, com concentração suficiente, nos locais menos acessíveis de proliferação da bactéria, ou ainda, porque é inactivado por outro microrganismo concomitante, resistente ao antibiótico.

O resultado de um TSA (sensível, resistente ou sensibilidade intermédia) depende da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima de antibiótico que inibe o crescimento visível da bactéria a testar.

No Laboratório de Microbiologia da clínica, são usados os seguintes métodos para realizar um TSA:

**Difusões em disco** – Colocam-se discos com uma quantidade única, geralmente elevada, de antibiótico, sobre um inóculo de densidade rigorosamente padronizada, em gelose de Mueller-Hinton (simples, sangue ou de chocolate). Consideram-se três graus de sensibilidade: sensível, intermédio e resistente, por comparação dos diâmetros das zonas de inibição com os das tabelas de referência. No Laboratório este método é usado para *N. gonorrhoeae*.

**Galerias mini API** - as galerias usadas no laboratório são:

- ATB HAEMO – permite determinar a sensibilidade dos *Haemophilus* e *Moraxella catarrhalis*. Após incubação, a leitura do crescimento pode ser feita visualmente ou no equipamento mini API.
- ATB STREP 5 – permite determinar a sensibilidade dos estreptococos e pneumococos aos antibióticos bem como determinar a CMI de dois  $\beta$ -lactâmicos para os pneumococos (penicilina e cefotaxima). Após incubação, a leitura do crescimento pode ser feita visualmente ou no equipamento mini API (Tabela 6-1 e Tabela 6-2).

Para ambas as galerias, a interpretação e validação dos resultados devem ser efectuados tendo em conta o contexto clínico, a origem da amostra, identificação da estirpe e os resultados de testes complementares, quando existem.

**Galeria MycoView** - O kit MycoView, para além de permitir a identificação de *Ureaplasma* spp. (*Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*) e *Mycoplasma hominis* a partir de produtos urogenitais, também permite testar a resistência das espécies a nove antibióticos. O princípio do teste baseia-se nas propriedades metabólicas específicas e resistência natural de cada espécie:

- *U. urealyticum*: Hidrólise da ureia e resistência à lincomicina.
- *M. hominis*: Hidrólise da arginina e resistência à eritromicina.
- O crescimento das duas espécies é visualizado pela mudança de cor do indicador de pH de amarelo alaranjado para vermelho ou rosa.

**Cartas teste de sensibilidade a antibióticos do VITEK 2** – No Laboratório para o equipamento VITEK 2 são usadas cartas para a determinação da sensibilidade de

estafilococos, enterococos e estreptococos do grupo B e D e bacilos gram negativo a agentes antimicrobianos.

### 6.3.3. Rotina

Na rotina do laboratório de microbiologia são usados vários testes e meios de cultura para se proceder à identificação dos microrganismos patogénicos presentes em cada produto biológico.

Para facilitar a organização dos fluxogramas da marcha geral de cada produto, optei por fazer fluxogramas que ilustram alguns passos da marcha geral para a identificação das bactérias gram positivo e gram negativo, bem como para a identificação de leveduras que apresentem crescimento no exame cultural micológico. (Figuras 6-1 à Figura 6-7).

A fim de ajudar na identificação dos microrganismos, no Laboratório de Microbiologia da clínica são realizados os seguintes testes:

#### **Teste da catalase**

O teste da catalase é utilizado para detectar a presença da enzima catalase através da decomposição de peróxido de hidrogénio em oxigénio e água, que ocorre na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo. A espécie *Streptococcus* é negativa para o teste, pelo que este permite distinguir os estreptococos dos estafilococos.

#### **Teste da coagulase**

O teste da coagulase é utilizado para detectar a presença da enzima coagulase capaz de coagular o plasma. A actividade da coagulase é utilizada para distinguir espécies patogénicas de *Staphylococcus* de espécies não patogénicas, sendo um bom indicador da presença de *S. aureus*. O teste pode ser feito em lâmina ou em tubo, colocando em contacto a espécie em estudo com plasma. Na reacção positiva observa-se a formação de coágulos (em tubo) ou de pequenos agregados (em lâmina).

#### **Teste de sensibilidade à optoquina**

Difusão em disco, realizado apenas para organismos que apresentem hemólise  $\alpha$ . Tendo em conta que o *Streptococcus pneumoniae* é o único organismo sensível à optoquina, o teste permite distingui-lo dos restantes estreptococos com hemólise  $\alpha$ .

**Teste de sensibilidade de Bacitracina+ SXT**

Difusão em discos, realizado para organismos que apresentem hemólise  $\beta$ . Trata-se de um teste presuntivo da presença de *Streptococcus agalactiae*, quando se observa resistência à bacitracina ou de *Streptococcus* do grupo A quando se observa sensibilidade à bacitracina.

**Testes de aglutinação**

Trata-se de um teste em que as partículas de látex estão sensibilizadas com o anticorpo específico do grupo e aglutinar-se-ão na presença do antígeno homólogo. Este fundamento é usado nos testes de identificação dos estreptococos dos grupos de Lancefield A, B, C, D, F e G e dos subtipos de *Escherichia coli*.

**Teste de oxidase**

O teste da oxidase é utilizado para verificar a presença ou a ausência da enzima citocromo oxidase. Ajuda a caracterizar espécies de *Neisseria*, distingue bactérias não fermentadoras (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa). No laboratório são usadas tiras impregnadas com N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina monohidrocloridrato. Este reagente, quando oxidado, tem a cor púrpura. No teste de oxidase, o citocromo oxidase produzido pelo microrganismo não oxida directamente o reagente mas sim o citocromo C que, por sua vez, oxida o reagente para formar um composto com a cor púrpura.

**TSI, Lisina e Ureia**

Os meios TSI (*Triple Sugar Iron*), lisina e ureia são usados como testes bioquímicos, no laboratório de microbiologia, para distinguir algumas enterobactérias: *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus*.

O meio TSI contém glicose, lactose, sacarose, indicador de pH (vermelho de fenol para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono), tiosulfato de sódio, sendo este um substrato para distinguir produtores de sulfureto de hidrogénio ( $H_2S$ ), e sulfato de ferro para detecção desse produto final. A leitura faz-se da seguinte maneira: na rampa faz-se a leitura da lactose e sacarose, no fundo da glicose e no meio do cilindro (onde foi inoculado) a de  $H_2S$ . Após incubação podem ser

determinadas as actividades fermentativas, a produção de gás e a produção de  $H_2S$ , podendo ocorrer os seguintes resultados:

- Cilindro ácido (amarelo) e rampa alcalina (vermelha): Apenas glicose fermentada e alguma produção de ácido. Todas as enterobactérias fermentam glicose. No entanto, a fermentação apenas de glicose é característica de *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*.
- Cilindro ácido (amarelo) e rampa ácida (amarelo). Fermentação dos três hidratos de carbono e produção de ácido.
- Cilindro alcalino (vermelho) e rampa alcalina (vermelho): Sem fermentação dos hidratos de carbono, nem produção de gás ou de  $H_2S$ .
- Produção de gás: Observa-se fracturas no meio de cultura. Dos três microrganismos
- Produção de  $H_2S$ : Observa-se cor negra na zona intermédia do cilindro. O microrganismo em estudo é capaz de produzir sulfureto de hidrogénio ( $H_2S$ ). Dos três microrganismos referidos *Salmonella* e *Proteus* produzem  $H_2S$ .

O meio de lisina é usado para distinguir as enterobactérias que descarboxilam a lisina das que não têm essa capacidade. O meio contém o aminoácido, glicose e um indicador de pH (púrpura de bromocresol). Antes da incubação deve ser colocado óleo para fornecer condições de anaerobiose (a fim de inibir a reacção). Os ácidos produzidos pelas bactérias a partir da fermentação da glicose vão inicialmente baixar o pH do meio e causar a mudança de cor do indicador de pH de púrpura para amarelo. O pH ácido activa então a enzima que causa a descarboxilação da lisina e a subsequente neutralização do meio que muda de amarelo para púrpura. Tanto a espécie *Samonella* como *Proteus* têm a capacidade para descarboxilar a lisina.

O meio de ureia serve para distinguir as bactérias produtoras de urease das que não o são. O meio, para além de ureia, contém o indicador de pH (vermelho de Fenol). Na presença de urease, a ureia é convertida em amónia, tornando o meio alcalino. Este aumento de pH faz com que o indicador de pH passe de amarelo a vermelho, sendo uma reacção positiva para a presença de urease. Das três enterobactérias referidas, apenas *Proteus* produz urease.

### **Teste dos factores, V, X e XV**

Os factores V, X e XV, em disco, são usados para identificar o género de *Haemophilus*, entre *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae*. O *Haemophilus influenzae* necessita do factor X ou de uma substância aquecida estável de hemoglobina (hemina) e do factor V ou de uma substância lábil aquecida (dinucleótido de adenina nicotinamida, NAD). O *H. parainfluenzae* necessita apenas do factor V. A identificação é feita através da observação de crescimento dos respectivos discos em gelo se Mueller-Hinton simples.

### **Teste germinativo**

O teste germinativo consiste em verificar a formação de tubos germinativos em soro humano, em menos de 2 horas, a partir de colónias suspeitas de leveduras. A observação de tubos germinativos, ao microscópio, é identificativa de *Candida albicans*.

### **Coloração de Gram**

A coloração de Gram é usada para distinguir bactérias gram negativo das bactérias gram positivo. Na técnica de Gram, as bactérias são coradas com um corante violeta de genciana. As bactérias gram positivo apresentam cor roxa, porque a sua parede formada por peptidoglinanos, permite a retenção do corante. As bactérias gram negativo, por terem a parede celular sob uma membrana, não têm a capacidade de reter ao corante.

### **Coloração de Ziehl-Neelsen**

No laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira, a coloração de Ziehl-Neelsen é usada, essencialmente, para detectar bacilos de tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. As micobactérias, como *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez coradas vão resistir fortemente à descoloração, mesmo por ácidos ou álcool, designadas assim de ácido-álcool resistentes. Esta característica é devido à elevada quantidade de lípidos na parede celular, conferindo hidrofobicidade. A técnica de Ziehl-Neelsen evidencia esta ácido-álcool resistência.

### **Coloração de Wright modificado**

A técnica de Wright modificado consiste numa modificação da coloração de Romanowsky utilizada para a diferenciação através da coloração dos elementos

celulares do sangue. Com esta coloração, o núcleo dos leucócitos e o citoplasma assumem uma coloração característica azul e rosa, respectivamente.

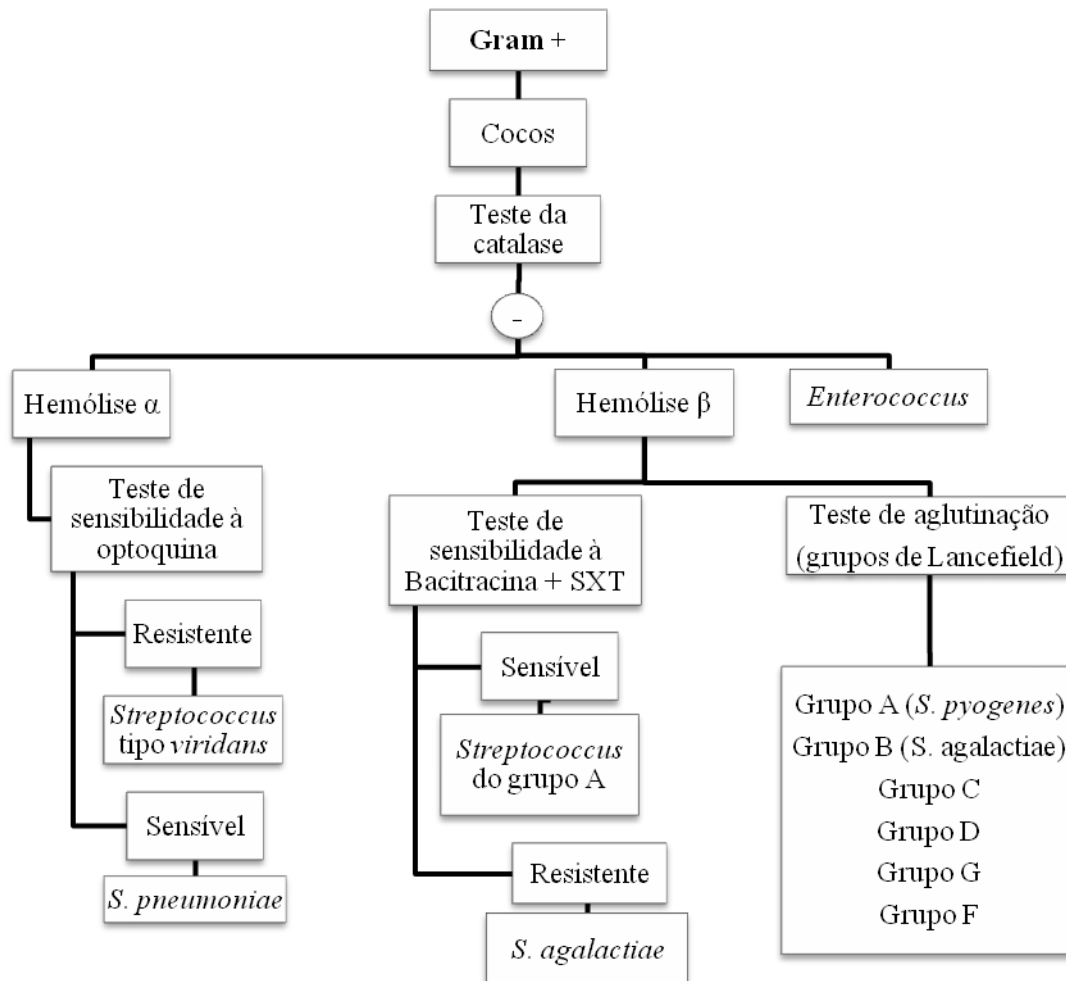


Figura 6-1 - Fluxograma ilustrando a marcha para identificação de bactérias gram positivo.

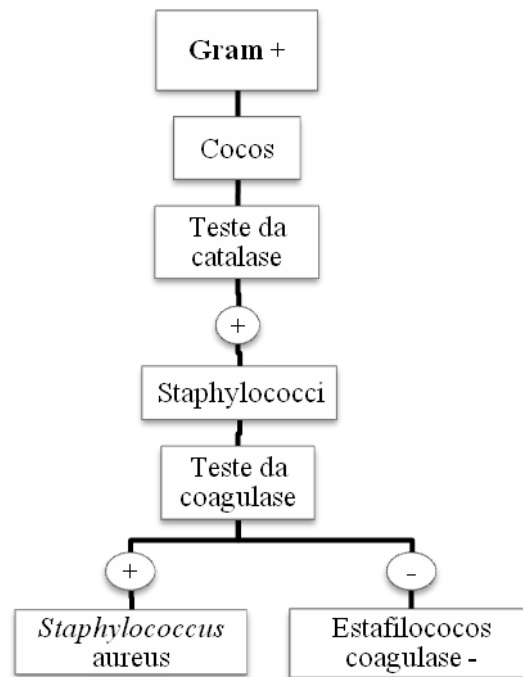


Figura 6-2 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha para identificação de bactérias gram positivo.

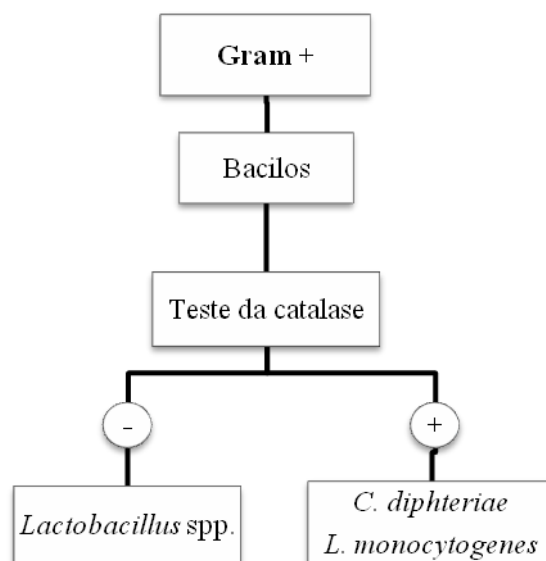


Figura 6-3 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha para identificação de bactérias gram positivo.

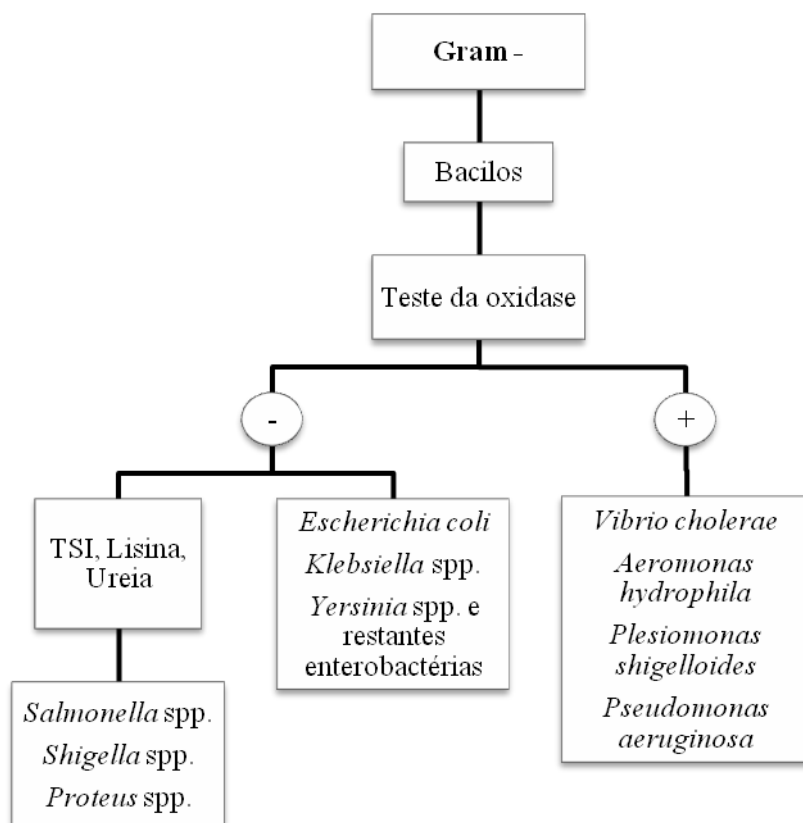


Figura 6-4 – Fluxograma ilustrando a marcha geral para identificação de bacilos gram negativos.

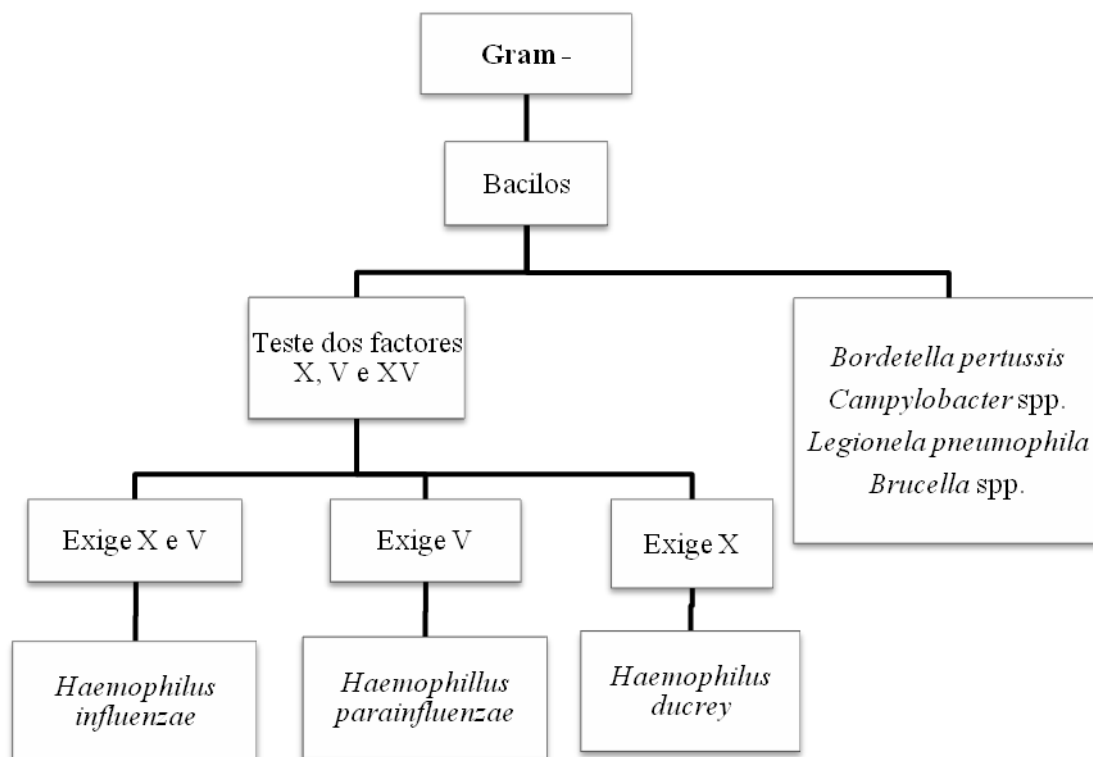


Figura 6-5 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para identificação de bacilos gram negativos

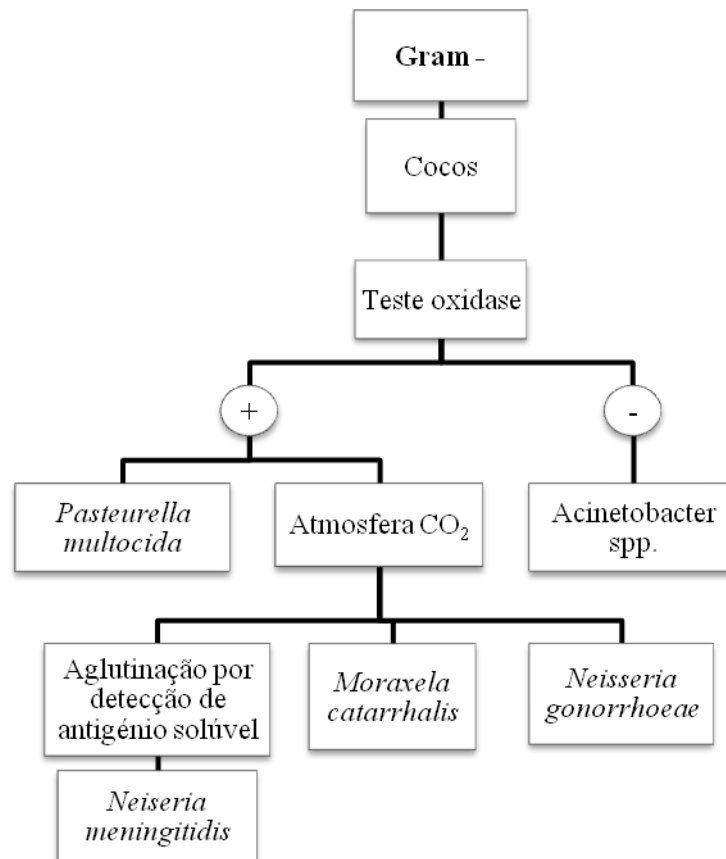


Figura 6-6 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para identificação de cocos gram negativos.

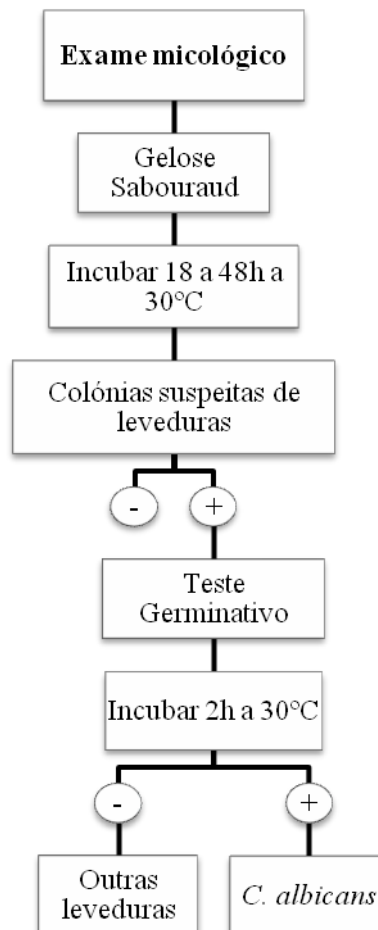


Figura 6-7 – Fluxograma representando a marcha geral do exame micológico para identificação de leveduras.

#### 6.4. Produtos Biológicos

Na clínica são tratados os seguintes produtos biológicos:

##### 6.4.1. Exsudado vaginal e uretral

Os exsudados genitais são solicitados com o objectivo de pesquisar microrganismos transmitidos através da actividade sexual ou causadores de desequilíbrio da flora normal. São mais requisitados a mulheres, não só na gravidez para controlo de alterações da flora vaginal, mas também como controlo ginecológico de rotina. Também são pedidos aos homens embora com menor frequência. A análise dos exsudados genitais é de grande importância na escolha do tratamento em caso de infecção instalada e na prevenção da infecção de recém-nascidos durante o parto.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

##### **Microrganismos transmitidos sexualmente:**

- Parasitas: *Trichomonas vaginalis*;

- Bactérias: *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi*.

**Desequilíbrios na flora normal (ex: vaginite bacteriana):**

- Bactérias: *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* (ambos apenas nos exsudados uretrais);
- *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*.

De seguida estão descritos alguns exemplos de infecções bacterianas genitais causados por bactérias e fungos

**Gonorreia**

Doença de transmissão sexual causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, que infecta as mucosas da uretra, do colo uterino, do recto, da garganta e conjuntiva ocular (conjuntivite gonocócica nos recém-nascidos durante o parto). Nos homens, os sintomas são mais evidentes e surgem mais cedo que nas mulheres. A sintomatologia, nos homens, é dor a urinar, grande necessidade de urinar e secreção purulenta proveniente do pénis. As mulheres não apresentam habitualmente sintomas, sendo ligeiros os que apresentarem. O diagnóstico, no laboratório de microbiologia, faz-se através da identificação de *Neisseria gonorrhoeae* ao microscópio, crescimento de colónias suspeitas em gelose de chocolate polivitex e através das cartas de identificação do VITEK 2. O diagnóstico é feito, na maior parte das vezes, a partir de exsudados uretrais, no caso dos homens e exsudados cervicais, no caso das mulheres.

**Trichomoníase**

Infecção transmitida por contacto sexual causada pelo parasita *Trichomonas vaginalis*, frequentemente responsável por causar vaginite. O *Trichomonas vaginalis* é, mais frequentemente, encontrado na mulher, podendo também ser isolado no exsudado uretral do homem. As mulheres apresentam secreção vaginal espumosa amarelada, irritação da vulva, dor ao urinar e durante o coito. Os homens são, normalmente, assintomáticos, podendo, no entanto, apresentar secreção uretral, dor e ardor ao urinar, dor testicular, irritação da uretra e infecção da próstata. O diagnóstico é feito através da visualização microscópica do parasita nos exsudados vaginal e urina, no caso das mulheres e exsudado uretral, urina e esperma, no caso dos homens.

### **Candidíase genital**

Infecção genital causada, normalmente por *Candida albicans*, levedura que faz parte da flora da pele e intestinos. A candidíase apresenta-se, frequentemente, como vaginite e é cada vez mais frequente devido ao uso excessivo de antibióticos e contraceptivos orais que alteram as condições vaginais, favorecendo o crescimento do fungo. As mulheres apresentam prurido ou irritação vaginal e vulvar e secreção espessa. Os homens, sendo normalmente assintomáticos, podem apresentar irritação na glândula e prepúcio e secreção espessa. O diagnóstico é feito, a partir de exsudados vaginais e uretrais, através da visualização ao microscópio, crescimento de colónias suspeitas em gelose de Sabouraud, teste germinativo e/ou identificação através das cartas de VITEK.

#### **6.4.1.1. Colheita**

Nos exsudados vaginais, a colheita é feita com uma primeira zaragatoa estéril, que é colocada em meio de transporte com carvão activado. De seguida, é utilizada uma segunda zaragatoa, a qual é utilizada para fazer esfregaço, por rolamento, em duas lâminas com o objectivo de executar o exame a fresco e a coloração de gram. Introduzir a zaragatoa num meio de transporte devidamente identificado.

Nos exsudados uretrais femininos, a colheita é feita da mesma forma que os vaginais com a excepção de que é usado uma zaragatoa pediátrica. É também necessário um meio de transporte devidamente identificado.

No caso de ser requisitado pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, usa-se uma zaragatoa estéril para limpar o excesso de muco do exocolo, desprezando-a. De seguida introduzir nova zaragatoa estéril apropriada e realizar um movimento de rotação durante 5 a 10 segundos, raspando cuidadosamente para arrancar células. Introduzir a zaragatoa num meio de transporte devidamente identificado. Esta pesquisa pode ser pedida no exsudado vaginal, uretral e urina.

Nos exsudados uretrais masculinos a colheita é feita pelo técnico de laboratório. Procede-se à colheita do pus com uma ansa, a qual é usada para semear a placa apropriada que irá ser colocada em estufa em condições de CO<sub>2</sub>. Procede-se também a 2 esfregaços em duas lâminas: uma para exame a fresco e outra coloração de gram. Num exsudado uretral masculino também pode ser requisitado a pesquisa de *Mycoplasma*.

#### 6.4.1.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para os exsudados vaginal e uretral. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

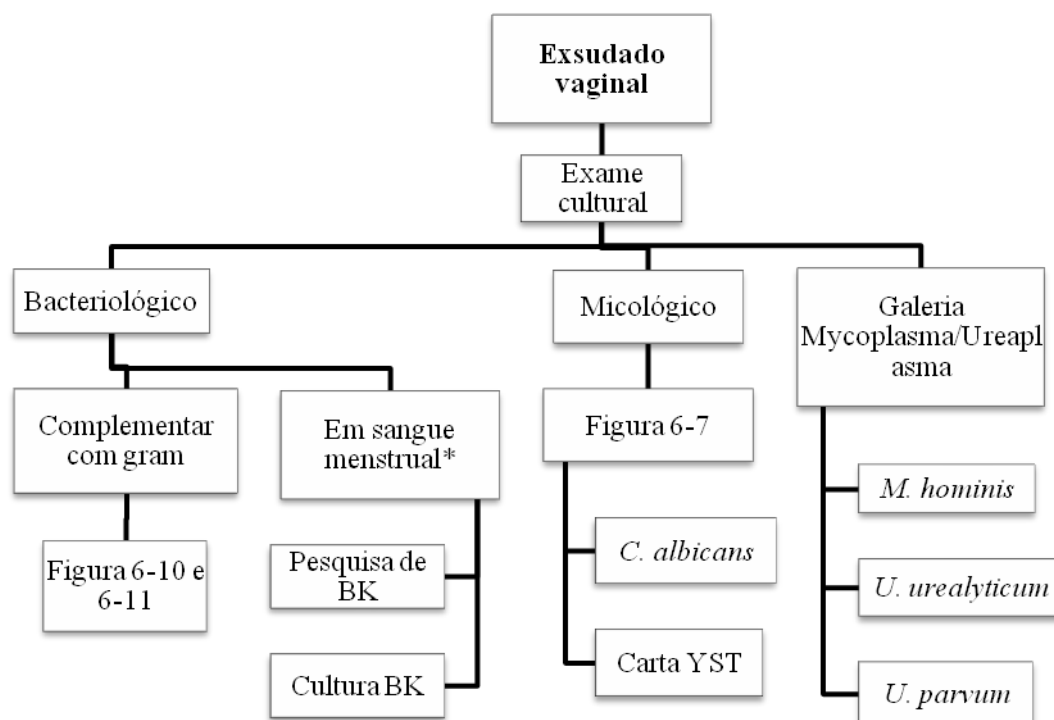


Figura 6-8 - Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada com o produto exsudado vaginal

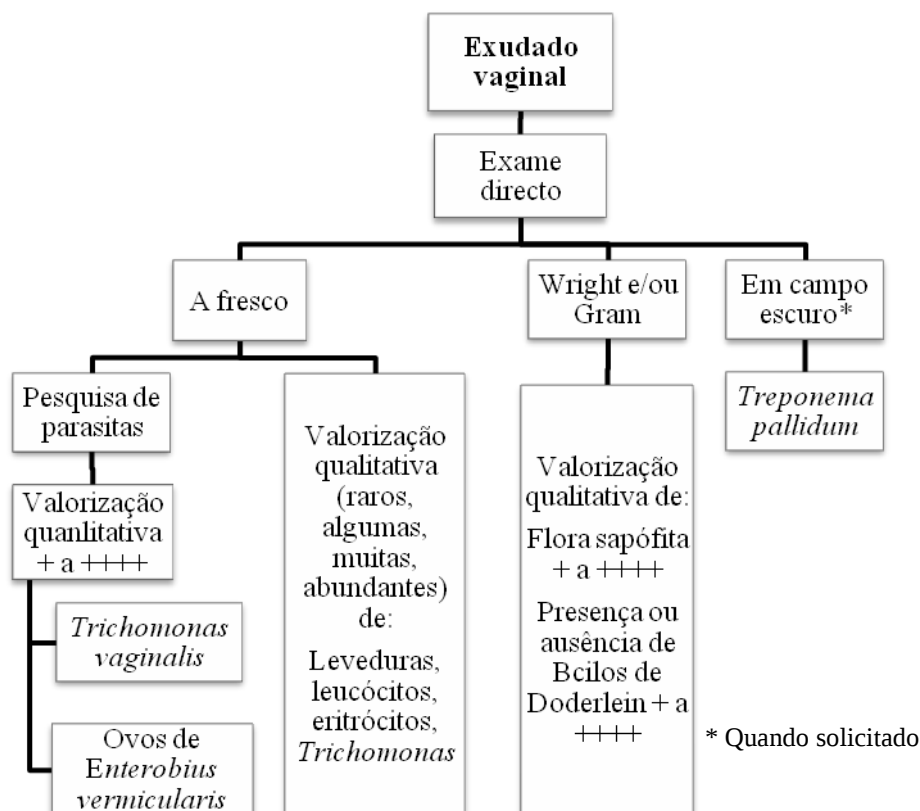


Figura 6-9 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada no exame directo com o produto exsudado vaginal

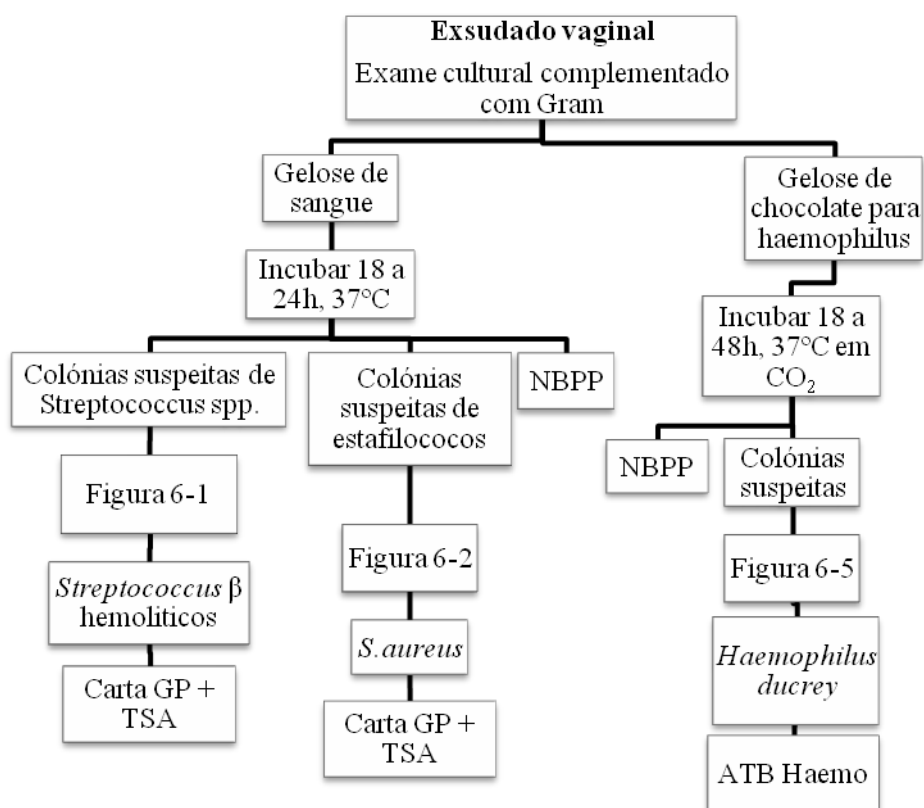


Figura 6-10 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada no exame directo com o produto exsudado vaginal.

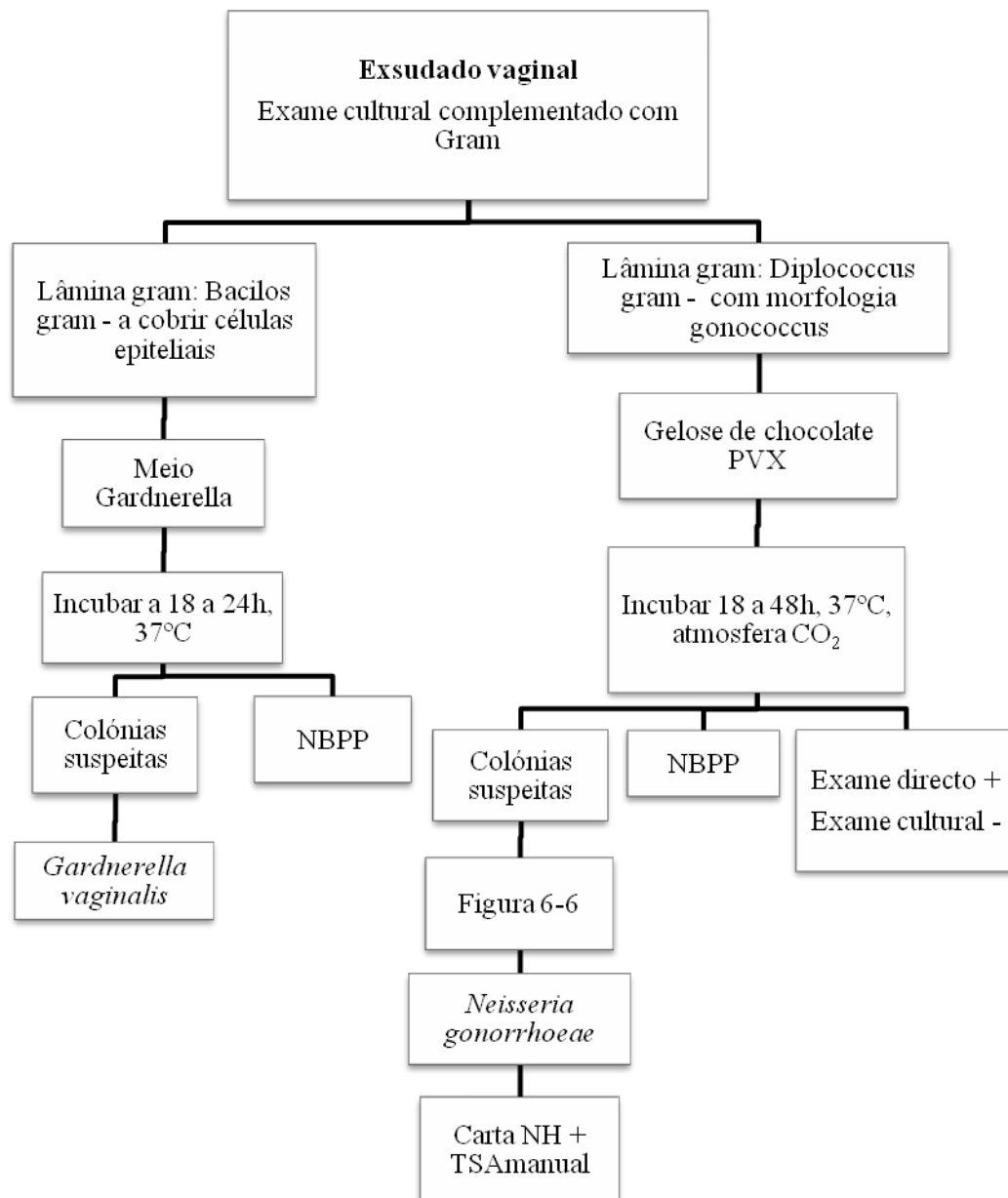


Figura 6-11 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto exsudado vaginal

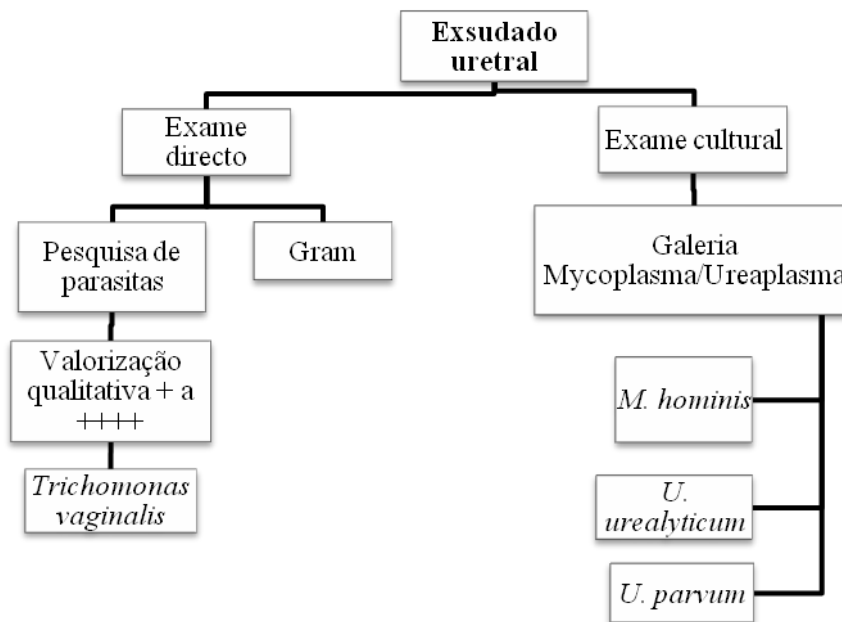


Figura 6-12 – Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame directo realizado com o produto exsudado uretral.

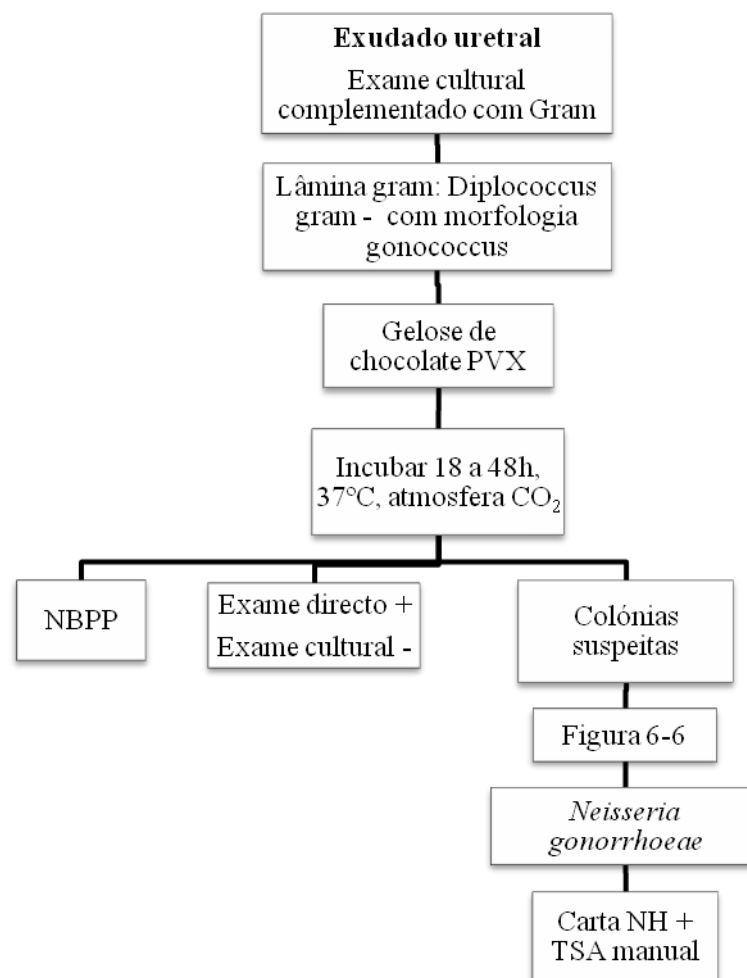


Figura 6-13 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto exsudado uretral.

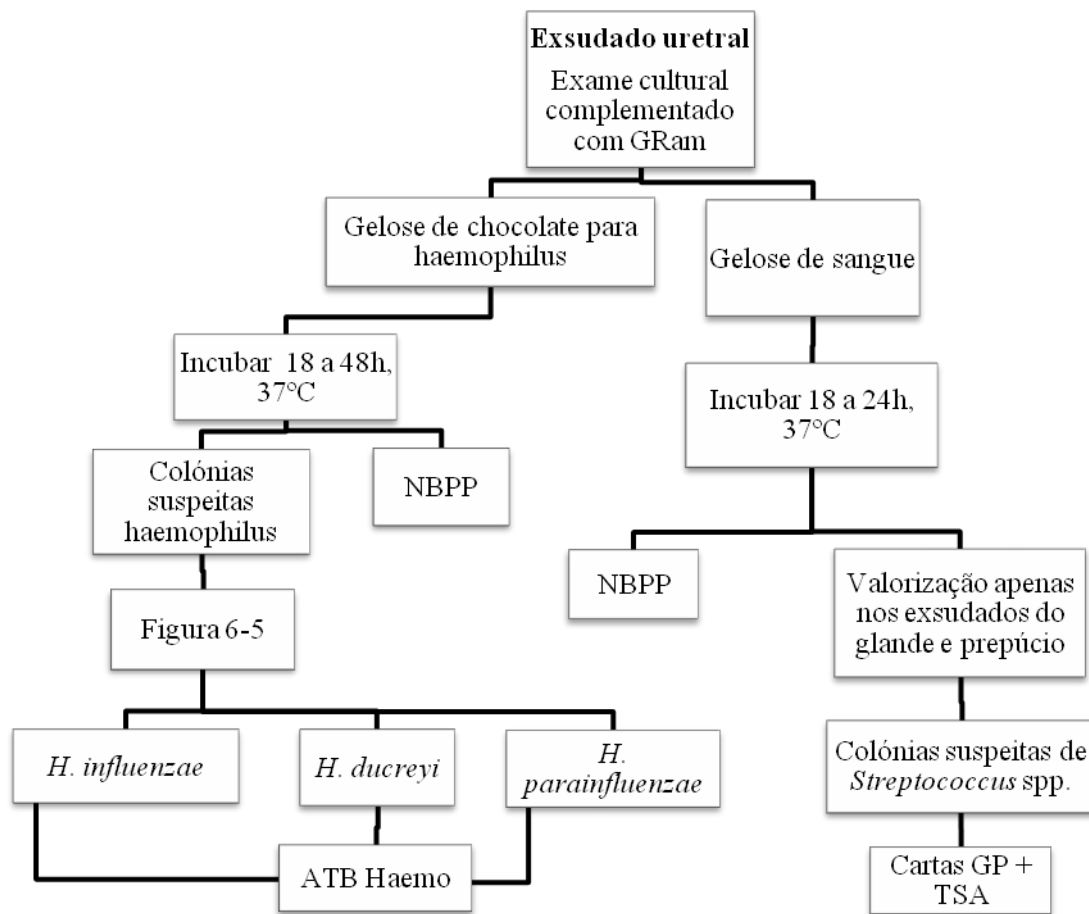


Figura 6-14 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto exsudado uretral.

#### 6.4.2. Exsudado rectal

O exsudado rectal permite rastrear algumas doenças sexualmente transmitidas, doenças causadas por desequilíbrio da flora e, principalmente, pesquisa de *Streptococcus agalactiae* no caso das grávidas, a fim de evitar a contaminação perinatal de recém-nascidos. O *Streptococcus agalactiae* está particularmente associado a septicemia e meningite do recém-nascido.

Os microrganismos patogênicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

##### **Microrganismos transmitidos sexualmente:**

- Bactérias: *Neisseria gonorrhoeae*;

##### **Desequilíbrios na flora intestinal normal:**

- Bactérias: *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*.

#### 6.4.2.1. Colheita

A colheita é feita com a introdução de uma zaragatoa suavemente através do esfíncter anal, deixar 10-30 segundos para fixar os microrganismos e retirar. Introduzir a amostra em meio de transporte com carvão, que se deve ser mantido à temperatura ambiente.

#### 6.4.2.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para o exsudado rectal. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

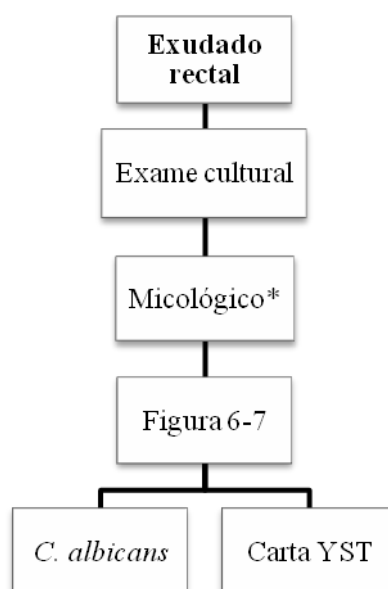


Figura 6-15 – Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural micológico para o produto exsudado rectal.

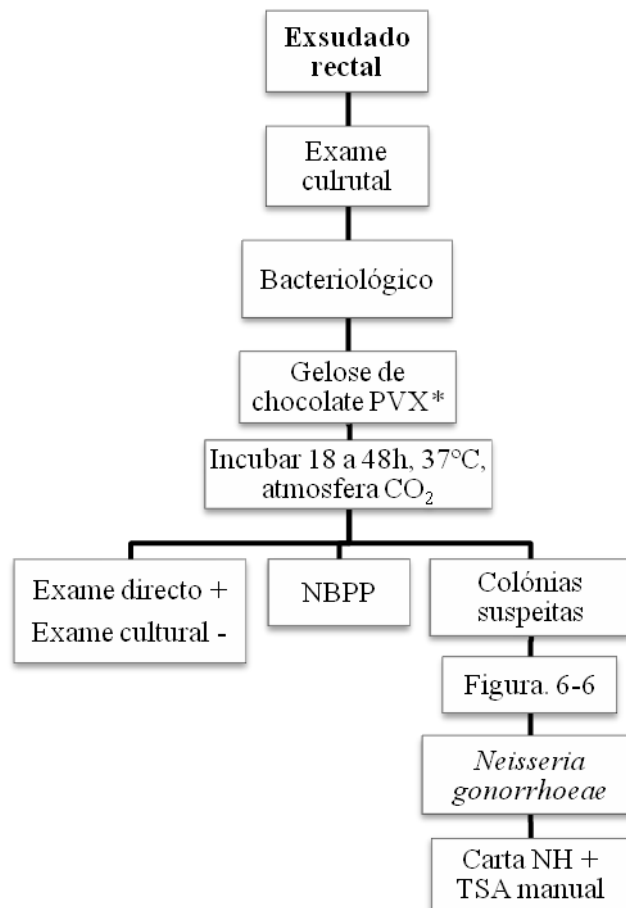


Figura 6-16 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural micológico para o produto exsudado rectal.

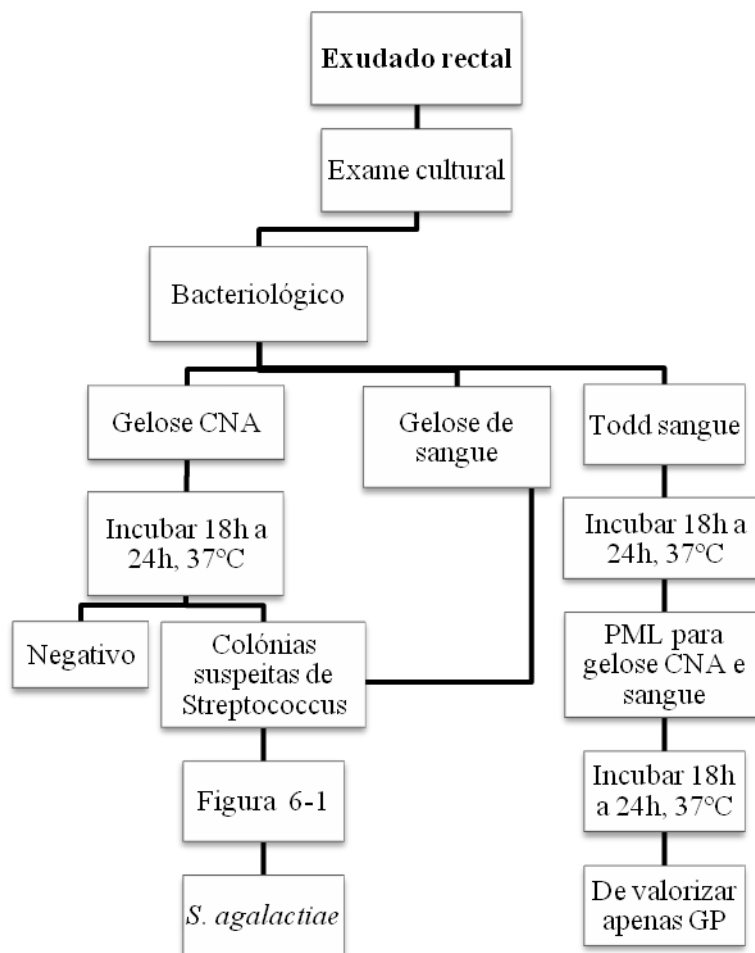


Figura 6-17 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o produto exsudado rectal.

#### 6.4.3. Exsudado nasofaríngeo

O exsudado nasofaríngeo é muito requisitado pelo médico, especialmente em crianças em que as infecções são mais frequentes. As infecções respiratórias mais comuns localizam-se na orofaringe, nasofaringe e cavidade nasal, provocando angina, corrimento nasal e, por vezes, febre. Na maior parte dos casos, a infecção primária é provocada por um vírus, embora este não seja, no geral, detectado. Concomitantemente, surge, muitas vezes, a infecção secundária, por uma das bactérias patogénicas, habitualmente presentes na nasofaringe, tal como o pneumococo, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em doentes sujeitos a antibioterapia pode também surgir candidíase.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no exsudados nasal e faríngeo ,no Laboratório de Microbiologia da clínica, são:

##### Nasal

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico, grupo A, B, C, F e G
- *Staphylococcus aureus*
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Klebsiella e enterobactérias*

### **Faríngeo**

- *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico, grupo A, B, C, F e G
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Bordetella pertussis*

#### **6.4.3.1. Colheita**

Exsudado nasal - Colheita feita, pelo técnico de laboratório, com zaragatoa pediátrica e colocar em meio de transporte. Para pesquisa de eosinófilos fazer 2 esfregaços em 2 lâminas.

Exsudado faríngeo/amigdalino – Após higiene oral e em condições de jejum colheita feita com zaragatoa normal que deve ser colocada imediatamente em meio de transporte. A entrega deve ser o mais rapidamente possível. É importante saber se toma antibióticos.

Pesquisas dirigidas:

- Na pesquisa de Bacilo de Hansen é necessário fazer raspagem do septo nasal.
- Na pesquisa de *Bordetella pertussis*, o paciente deve tossir directamente para placa de bordet gengou.
- No caso da Angina de Vincent, a colheita da ulceração é feita com uma zaragatoa.

#### **6.4.3.2. Marcha geral**

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para o exsudado nasofaríngeo. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os

procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

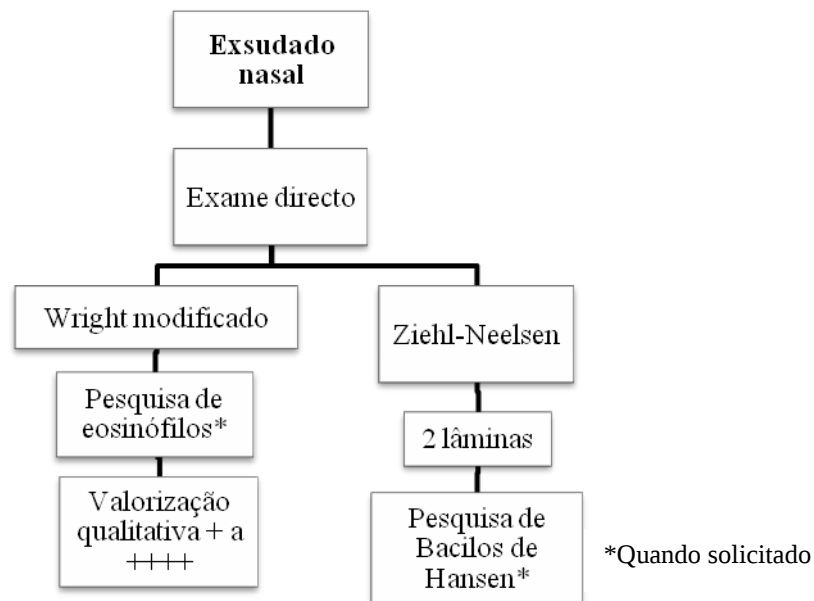


Figura 6-18 – Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame directo para o produto exsudado nasal.

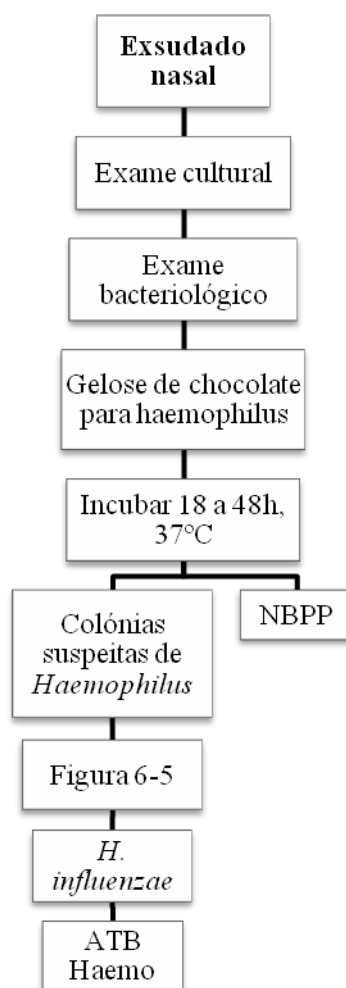


Figura 6-19 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural para o produto exsudado nasal.

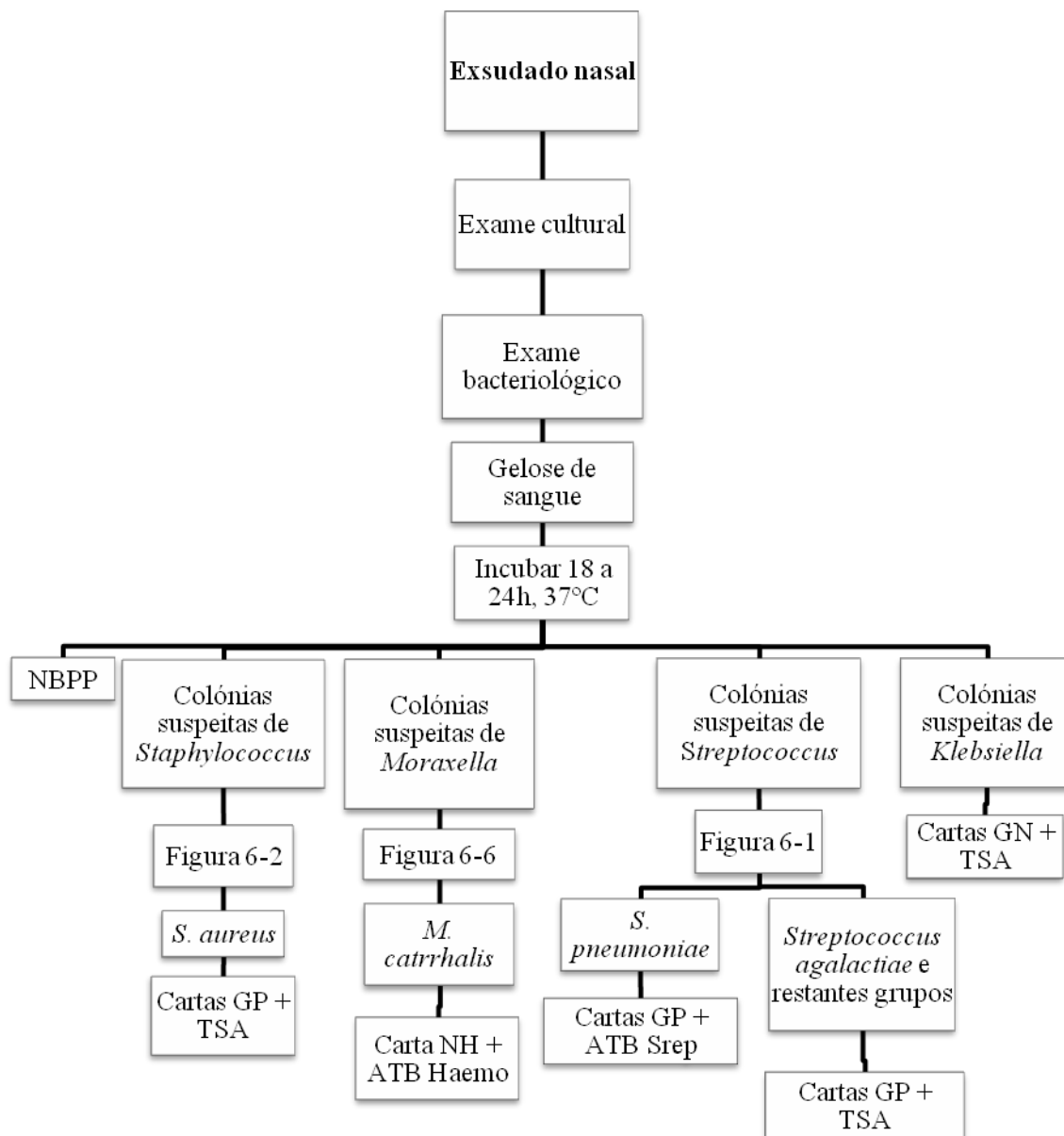


Figura 6-20 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada com o produto exsudado nasal.

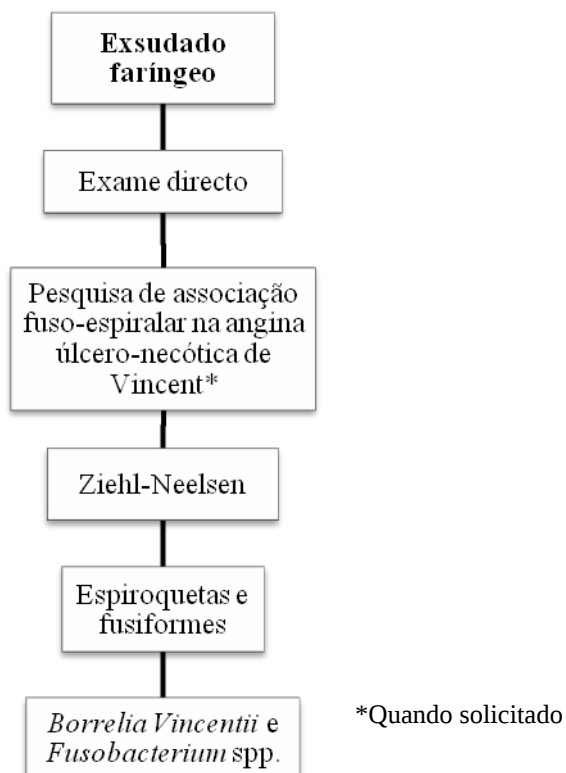


Figura 6-21 - Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame directo realizado com o produto exsudado faríngeo.

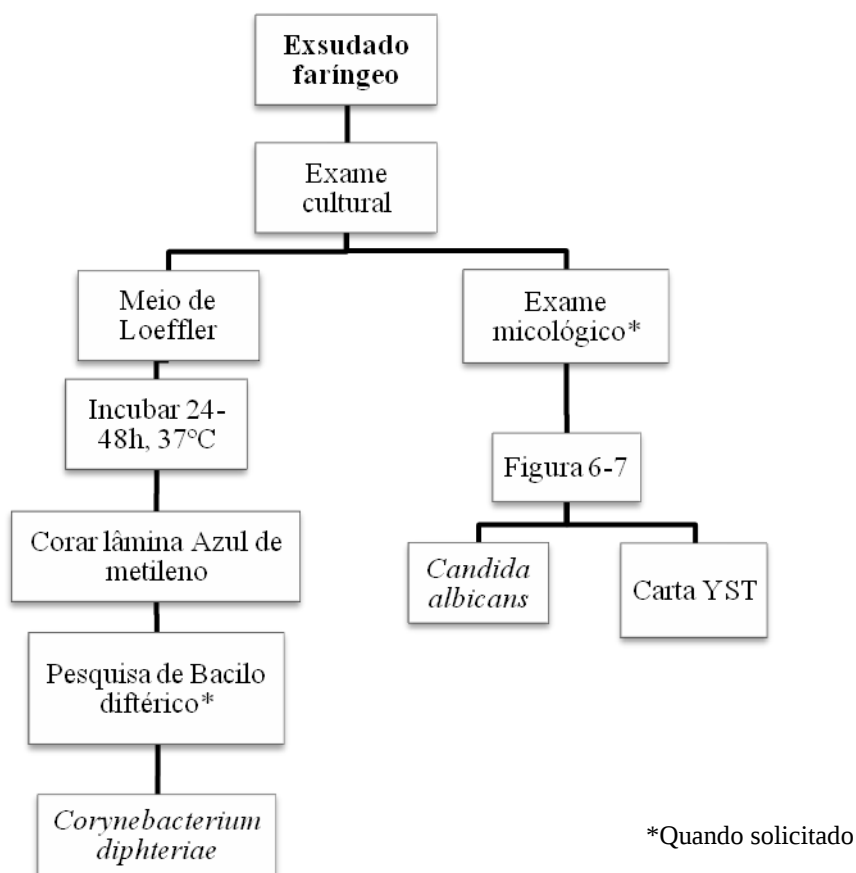


Figura 6-22 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto exsudado faríngeo.

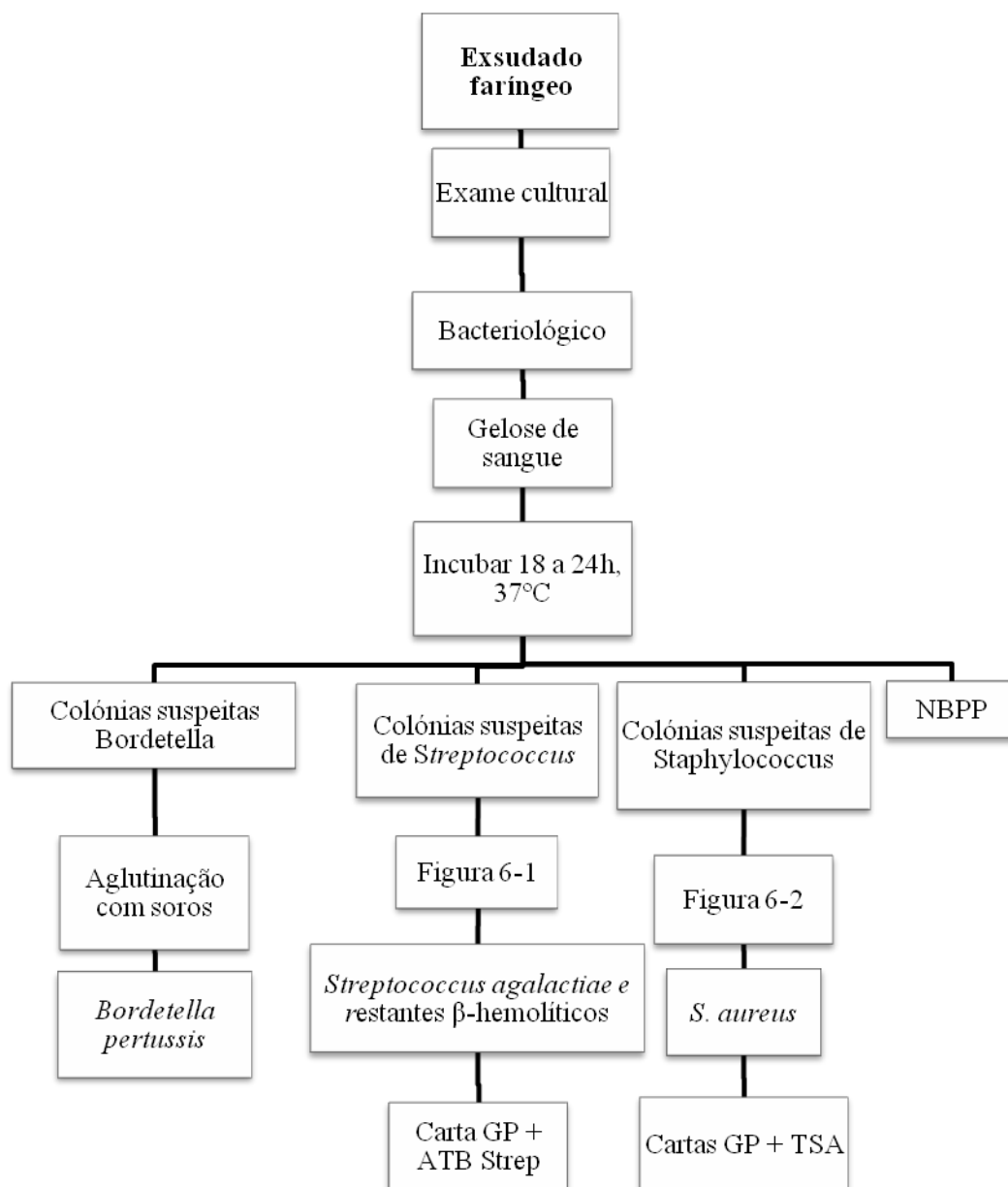


Figura 6-23 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural bacteriológico realizado com o produto exsudado faríngeo

Nos exsudados faríngeos, na identificação de *Staphylococcus aureus* (Figura 6-23) deve ser tido em conta que poderá ser devido a rinorreia posterior uma vez que este microrganismo não é encontrado na faringe.

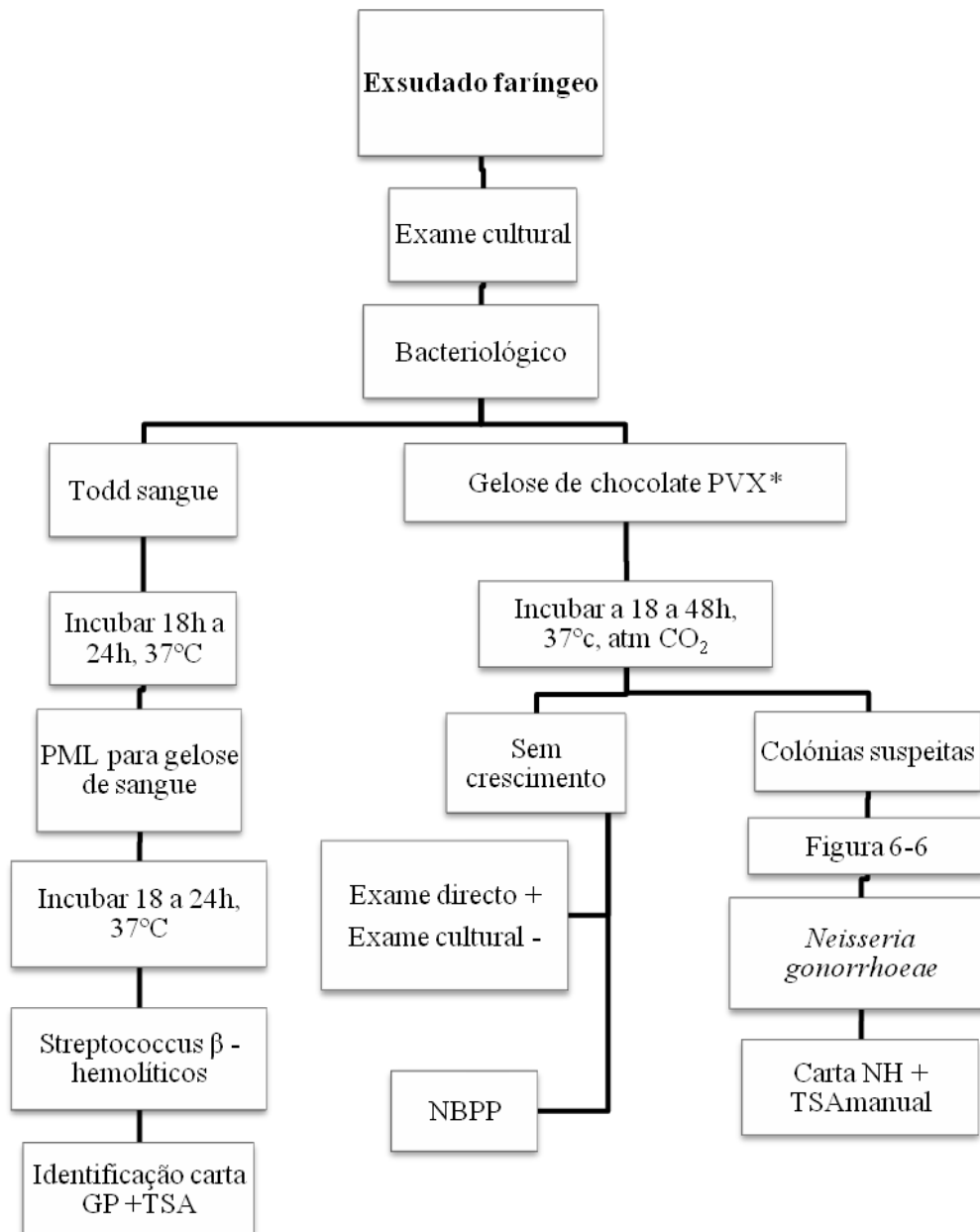


Figura 6-24 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural bacteriológico realizado com o produto exsudado faríngeo.

#### 6.4.4. Expectoração, secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar

Ao contrário da maior parte das regiões do tracto respiratório superior, a traqueia, brônquios e pulmões estão normalmente isentos de colonização por bactérias comensais mas quando o sistema imunitário está debilitado, ficam sujeitos à invasão pelos microrganismos das vias respiratórias superiores. O tracto respiratório inferior pode, ainda, sofrer infecção primária por microrganismos patogénicos inalados tais como o bacilo da tuberculose.

As infecções mais comuns são a bronquite aguda, exacerbações de bronquite crónica e pneumonia. Na maior parte dos casos, a infecção primária é provocada por vírus, mas ocorre frequentemente a infecção secundária, por um microrganismo patogénico proveniente da nasofaringe, tal como o pneumococo ou *Haemophilus influenzae*.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

### **Expectoração**

- *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Klebsiella* spp;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Haemophilus influenzae*.
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Aspergillus* spp.
- *Candida* spp.

### **Secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar**

- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Haemophilus influenzae*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Klebsiella pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae*;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Legionella* spp.;
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Bordetella* spp.
- *Aspergillus* spp.
- *Candida* spp.

#### 6.4.4.1. Colheita

A colheita da expectoração é feita em jejum, após higiene oral e através de tosse profunda para contentor estéril fornecido pelo laboratório. O transporte para o laboratório deve demorar menos de 2 horas. No caso de pesquisa de BK os doentes podem recolher amostras diariamente, conservando a expectoração no frigorífico.

Rejeitar:

- Amostras com mais de 24 horas.

A colheita das secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar é feita por pessoal especializado, fora do laboratório.

Rejeitar:

- Colheitas por aspiração tranqueo-brônquica;
- Colheitas através ou no local do orifício de traqueostoma.

#### 6.4.4.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para expectoração, secreções brônquicas e lavado-bronco-alveolar. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

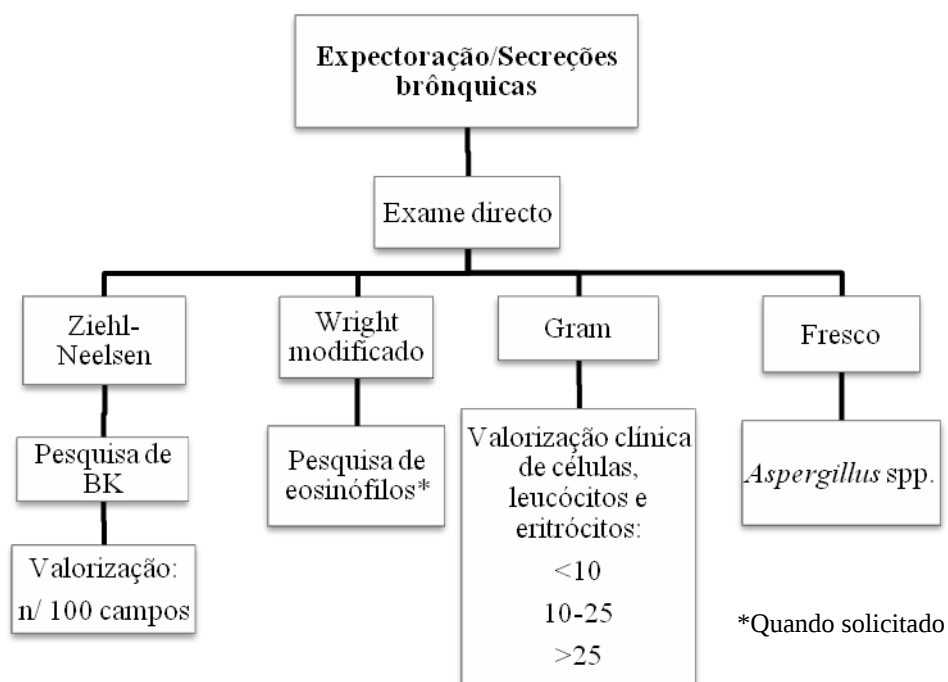


Figura 6-25 – Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame directo com os produtos expectoração e secreções brônquicas.

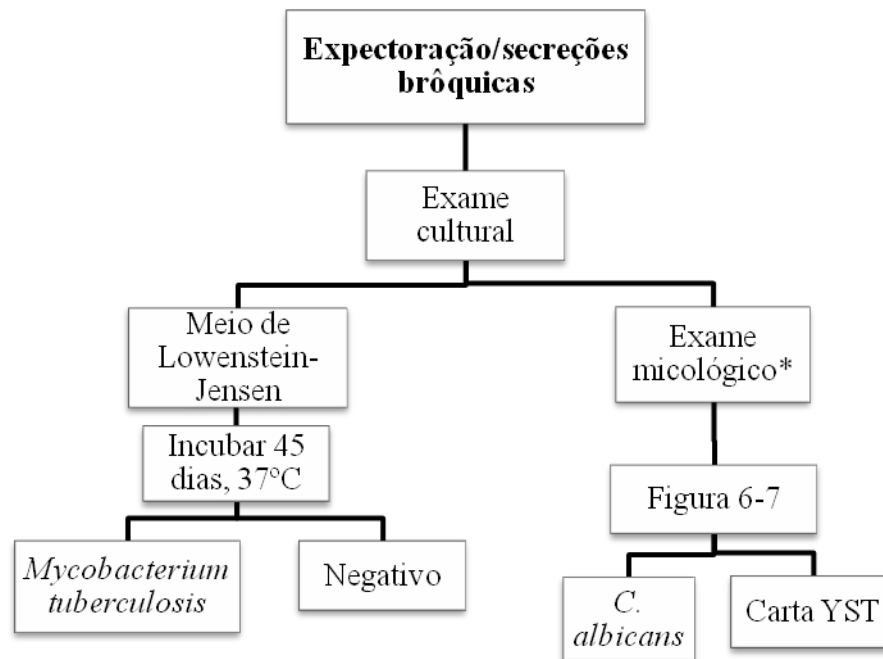


Figura 6-26 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame cultural com os produtos expectoração e secreções brônquicas.

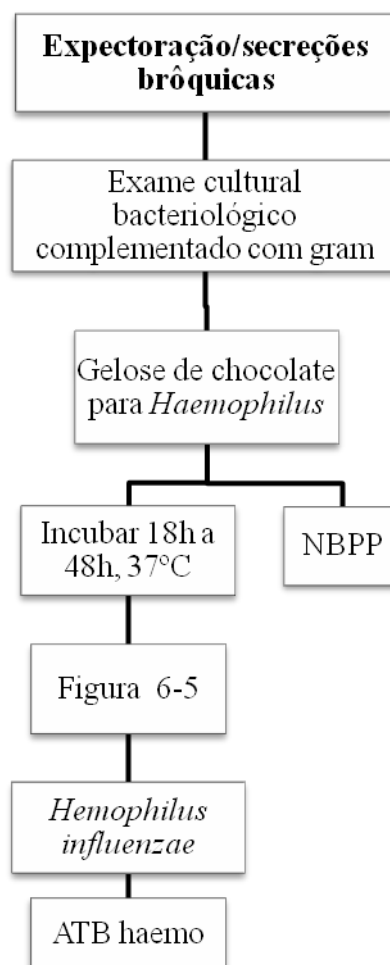


Figura 6-27 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame cultural com os produtos expectoração e secreções brônquicas.

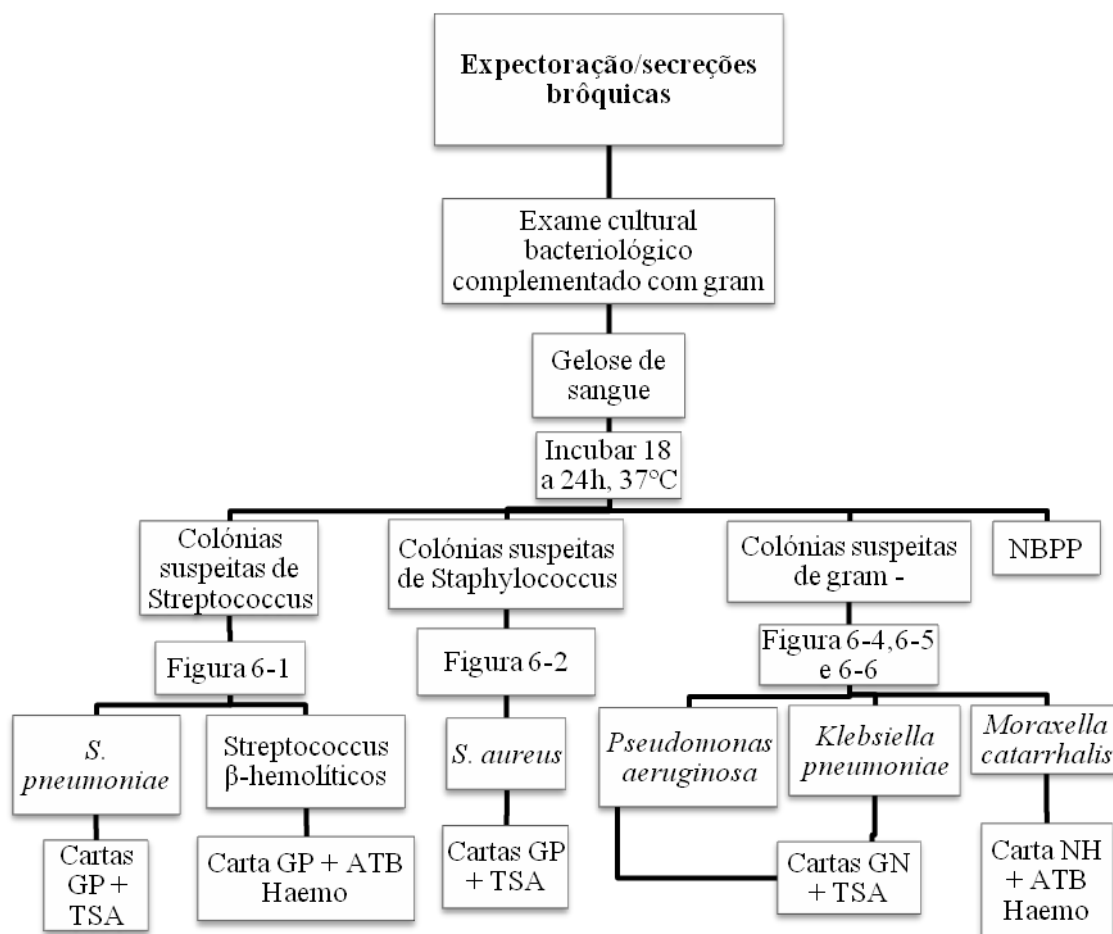


Figura 6-28 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural do produto expectoração ou secreções brônquicas

#### 6.4.5. Líquidos orgânicos/Exsudado auricular e ocular

Esta secção diz respeito ao diagnóstico dos vários líquidos orgânicos (líquido pleural, líquido pericárdico; líquido ascítico e líquido sinovial, etc.) bem como os exsudados auriculares e oculares uma vez que são tratados de maneira semelhante. Nas descrições seguintes tomo como exemplo os exsudados auricular e ocular uma vez que são, dos descritos anteriormente, os mais comuns no laboratório.

O exsudado auricular é solicitado para fazer o diagnóstico de três possíveis situações: otite média aguda, otite média crónica e otite externa. O exsudado ocular é solicitado

para o diagnóstico de conjuntivite, queratite bem como de infecções da órbita e globo ocular.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

#### **Exsudado Auricular**

- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Haemophilus influenzae*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Enterobacteriaceae*;
- *Candida* spp.;
- *Mycobacterium tuberculosis*;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Aspergillus* spp..

#### **Exsudado ocular**

- *Haemophilus* spp.
- *Moraxella* spp.;
- *Neisseria gonorrhoeae*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Streptococcus pyogenes*;
- *Pseudomonas areuginosa*;
- *Candida* spp.;
- *Mycobacterium tuberculosis*.

##### **6.4.5.1. Colheita**

A colheita é feita apenas após a limpeza prévia do local de colheita. Se necessário, retirar o excesso de pus do orifício auricular externo com uma zaragatoa e rejeitar a mesma.

No exsudado auricular introduzir uma zaragatoa pediátrica no canal auricular tendo o cuidado de não tocar nas paredes, retirar o pus e colocar a zaragatoa em meio de

transporte. No exsudado ocular, com o dedo puxar a pálpebra inferior para baixo, rodar até pressionar suavemente uma zaragatoa normal perto do canal lacrimal.

Nos restantes líquidos orgânicos a colheita feita por pessoal especializado, fora do laboratório, para recipiente esterilizado. A amostra deve ser enviada dentro de uma hora ou ser conservada em frigorífico.

Rejeitar:

- Amostras com mais de 24 horas de frigorífico.

#### 6.4.5.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da clínica de diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para os líquidos orgânicos e exsudados auricular e ocular. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

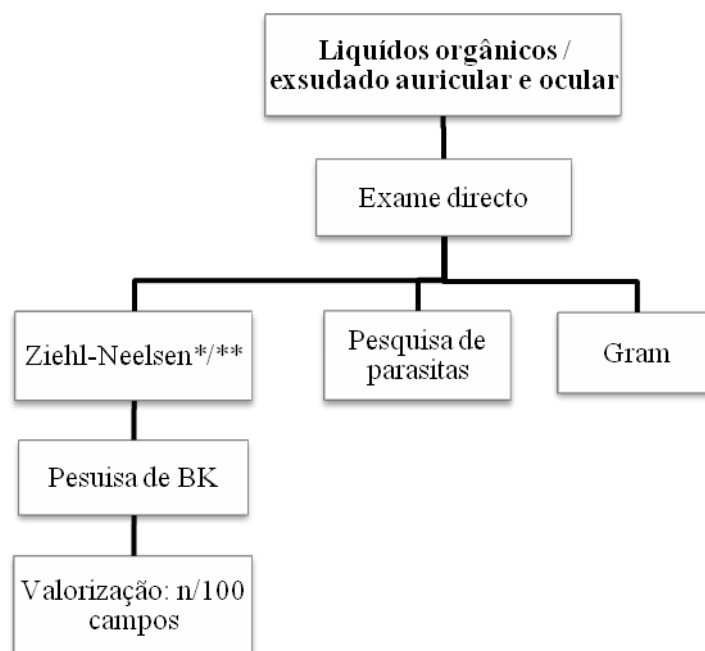


Figura 6-29 – Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame directo dos produtos líquidos orgânicos/exsudado ocular e auricular.

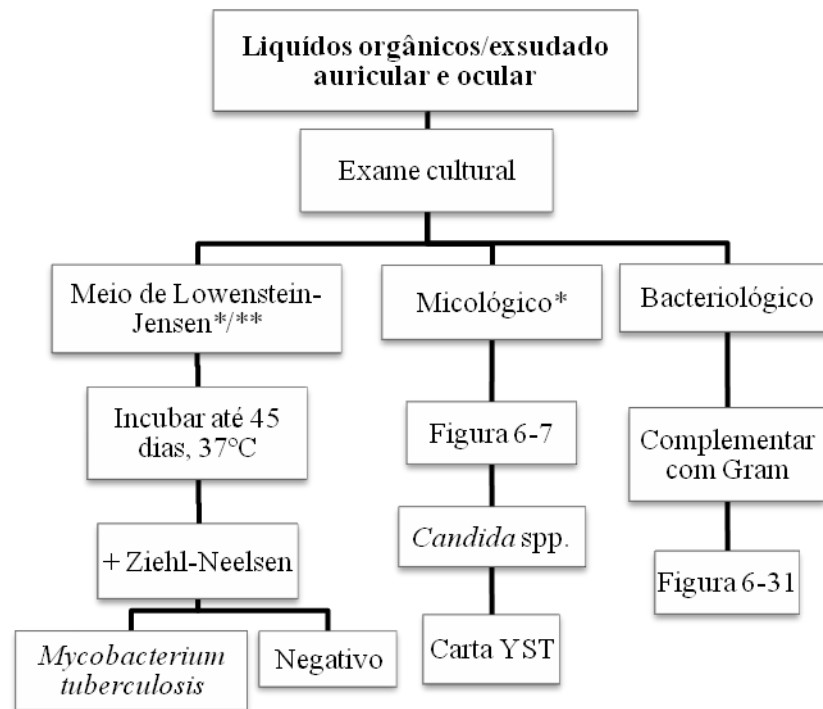


Figura 6-30 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame cultural dos produtos líquidos orgânicos/exsudado ocular e auricular.

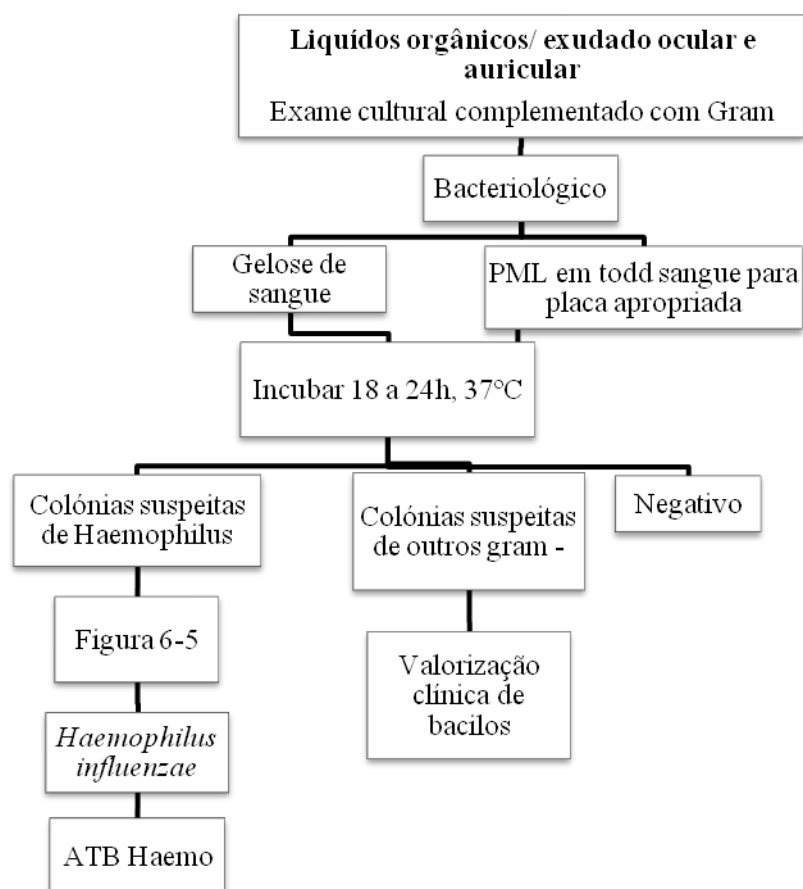


Figura 6-31 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame directo dos produtos líquidos orgânicos/exsudado ocular e auricular.

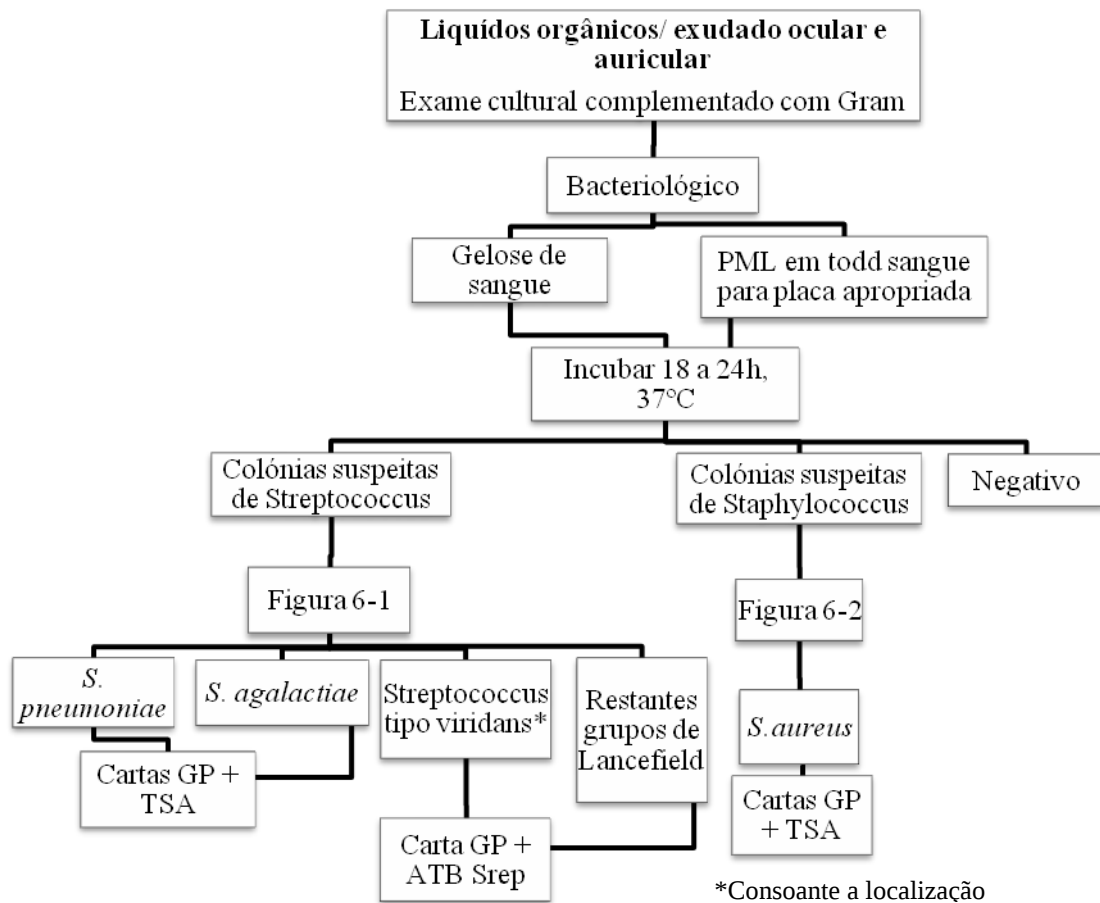


Figura 6-32 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com os produtos líquidos orgânicos.

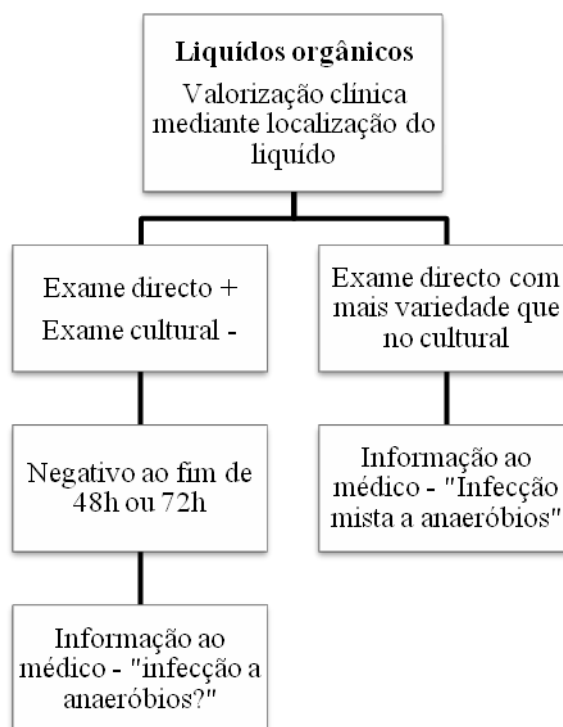


Figura 6-33 – (continuação) Fluxograma ilustrando a valorização clínica mediante a localização do líquido orgânico.

#### 6.4.6. Líquido Cefalo-Raquidiano

O líquido céfalo-raquidiano (LCR) apesar de se tratar de um líquido orgânico é tratado à parte por o procedimento e microrganismos a valorizar serem ligeiramente diferentes do anterior descrito.

A colheita de LCR é solicitada em casos suspeitos de meningite. As infecções mais comuns do LCR são: meningite bacteriana, meningite tuberculosa e encefalite viral.

Na meningite bacteriana, o LCR é tipicamente turvo, devido à presença de grande número de leucócitos. A infecção é, habitualmente, provocada por uma das seguintes bactérias: *Neisseria meningitidis*, pneumococo ou *Haemophilus influenzae*. Nos recém-nascidos e crianças muito pequenas, a meningite pode ser provocada por estreptococos do grupo B e *Listeria monocytogenes*. A meningite tuberculosa resulta de uma infecção primária progressiva, pulmonar ou mesentérica. O LCR é límpido ou ligeiramente turvo, com um número moderado de leucócitos.

Tal como na hemocultura, deve-se ter em grande consideração a hipótese de contaminação por bactérias comensais da pele (por exemplo, *Staphylococcus epidermidis*), durante a colheita.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- *Neisseria meningitidis*;
- *Haemophilus influenzae*;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Streptococcus*, grupo A e B  $\beta$ - hemolítico.
- *Staphylococcus epidermidis*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Enterobacteriaceae*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Corynebacterium diphtheriae*.

#### 6.4.6.1. Colheita

Colheita feita por pessoal especializado, fora do laboratório, para recipiente esterilizado. O envio para o laboratório deve ser feito imediatamente ou deve-se proceder à conservação em estufa a 37 °C.

#### 6.4.6.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para o LCR. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

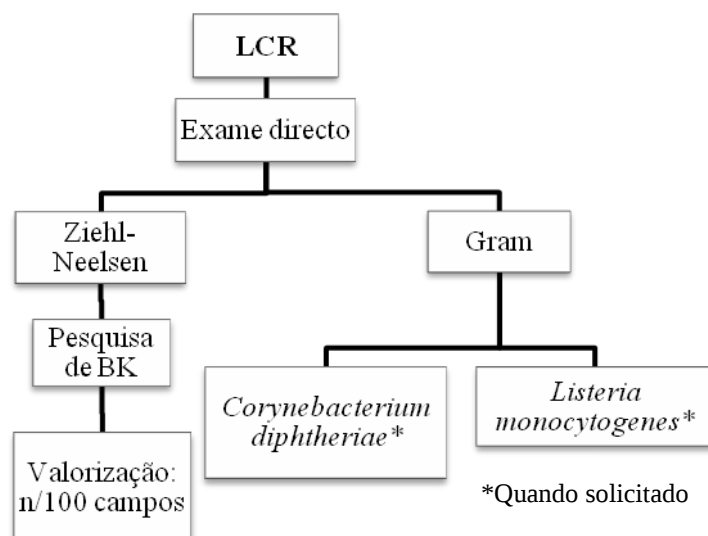


Figura 6-34 – Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame directo do LCR.

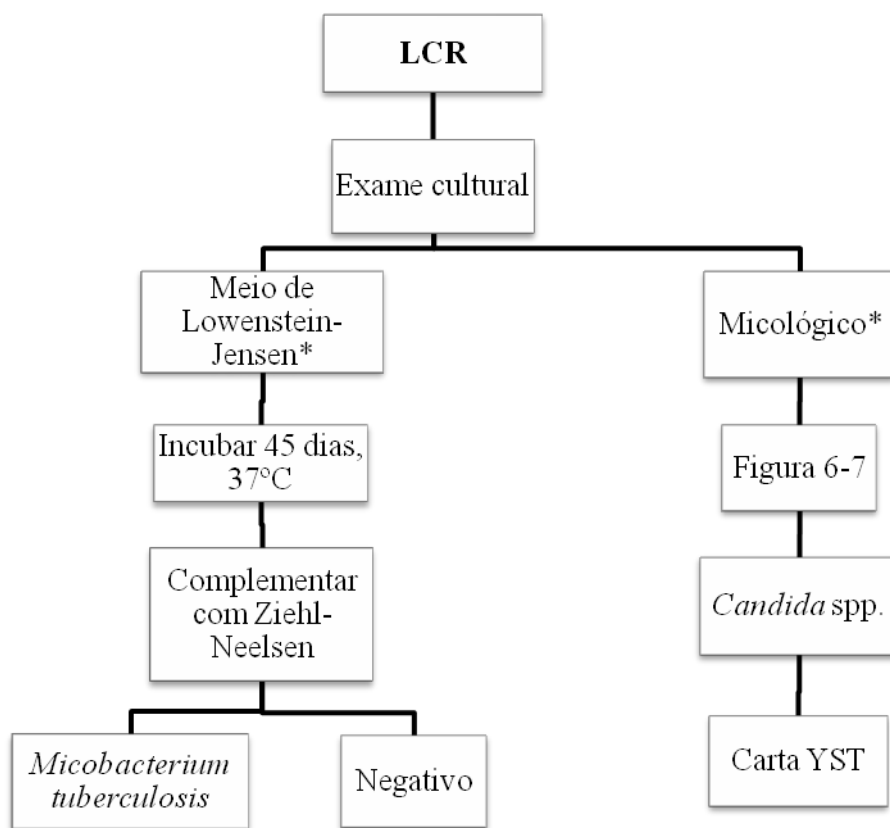


Figura 6-35 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame directo do LCR.

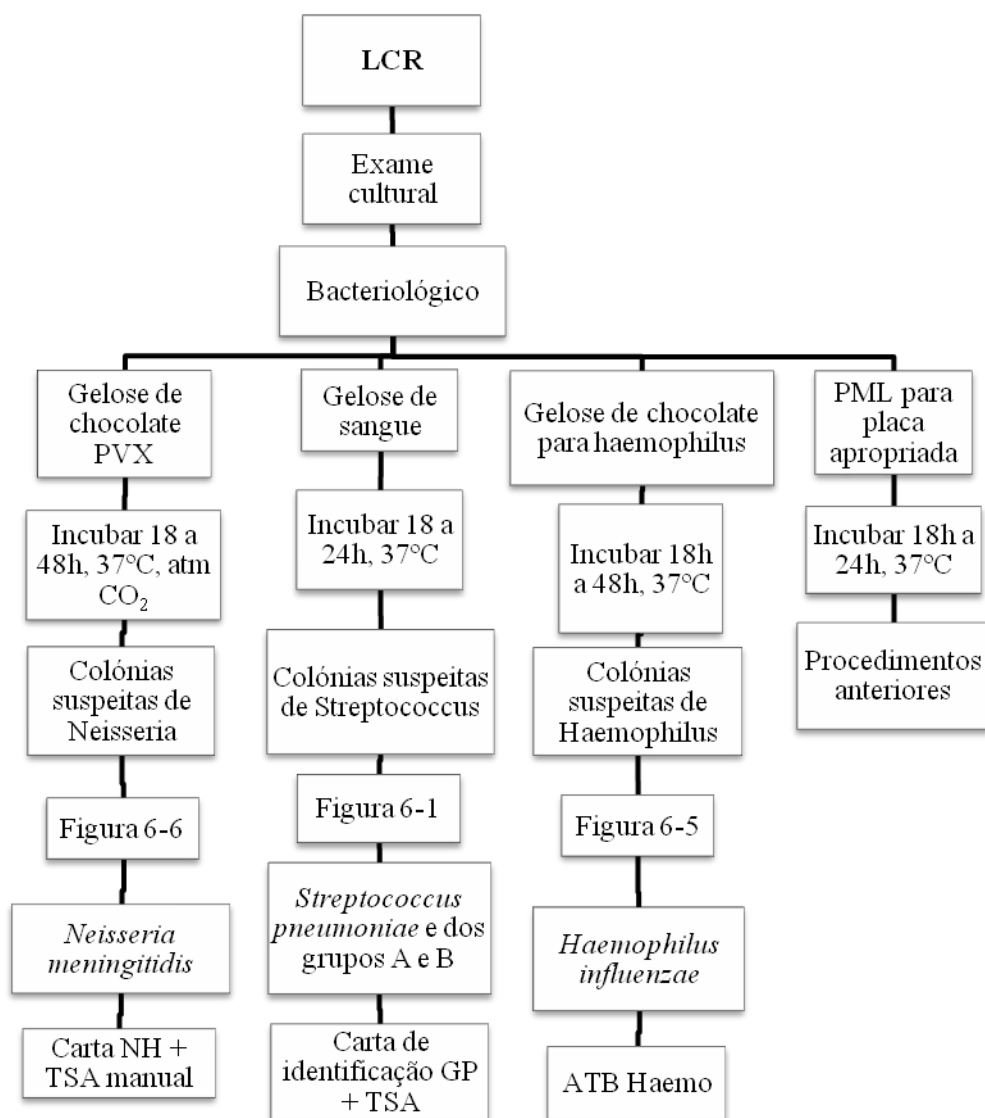


Figura 6-36 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada com o produto LCR.

#### 6.4.7. Exsudados de ferida

Esta secção diz respeito ao diagnóstico das principais infecções das feridas. As infecções das feridas podem ser endógenas ou exógenas. As primeiras são provocadas por microrganismos comensais, em qualquer região do corpo. Por exemplo, uma ferida cirúrgica abdominal infectada por microrganismos do intestino grosso, após uma operação que envolva incisão do cólon. Na infecção exógena, a fonte do microrganismo é exterior ao corpo. Nas infecções das feridas pode encontrar-se grande diversidade de espécies bacterianas, aeróbias e anaeróbias, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, pneumococos, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Em muitos casos, existe uma infecção mista por mais de uma espécie

bacteriana. Nas infecções crónicas, de cura lenta, deve ser considerada a possibilidade da presença de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- *Staphylococcus aureus*;
- *Streptococcus pyogenes* e outros  $\beta$ -hemolíticos;
- *Enterobacteriaceae*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Enterococcus sp.*
- *Candida spp.*
- *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 6.4.7.1. Colheita

Proceder à limpeza do local de colheita com uma zaragatoa para retirar o excesso de pus em contacto com o penso e, se necessário, limpar com soro fisiológico o pús seco. De seguida, com uma zaragatoa estéril, colher uma porção de pús, pressionando levemente no local da lesão ou na fístula e colocar em meio de transporte.

Rejeitar:

- Colheitas com mais de 1 hora caso não venham em meio de transporte;
- Zaragatoa seca.

#### 6.4.7.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para o exsudado de ferida. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

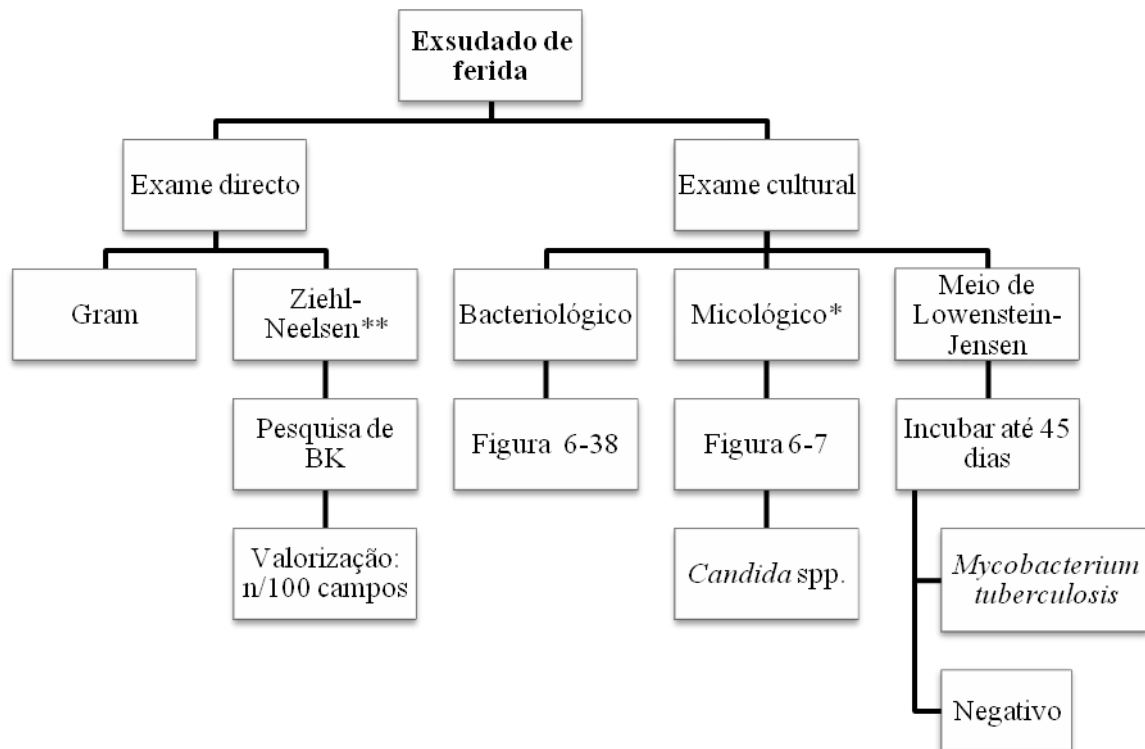


Figura 6-37 – Fluxograma ilustrando a marcha geral realizado com o produto exsudado de feridas.

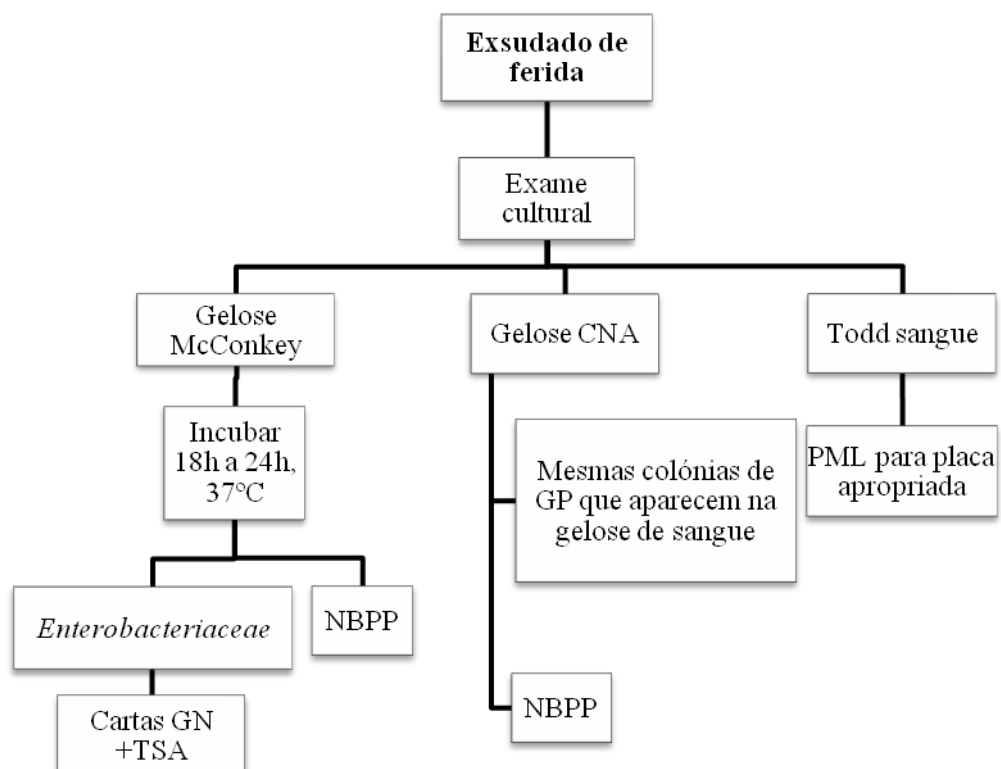


Figura 6-38 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizado para o exame cultural do produto exsudado de feridas.

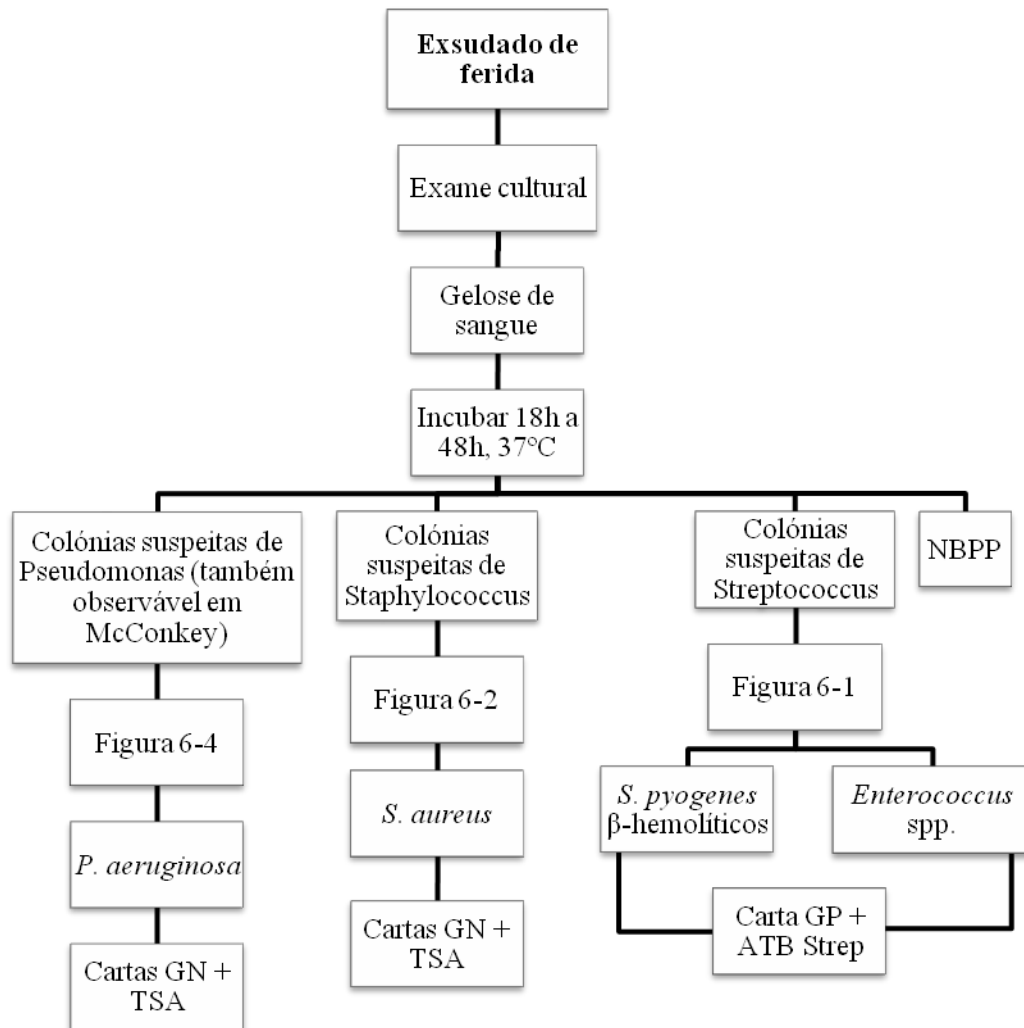


Figura 6-39 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto exsudado de feridas.

#### 6.4.8. Esperma

O esperma, tal como os exsudados genitais, é um dos produtos usado para rastreio das doenças transmitidas sexualmente. Além disso, com o aumento, sentido nos últimos anos, da infertilidade masculina, uma monitorização das alterações neste produto pode ajudar no diagnóstico e tratamento das infecções causadoras da infertilidade, desde que com a devida antecedência.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- Mycoplasma hominis;
- Ureaplasma urealyticum;
- Ureaplasma parvum;
- Leveduras

- Streptococcus  $\beta$  – hemolítico;
- Staphylococcus aureus;
- Mycobacterium tuberculosis;
- Neisseria gonorrhoeae;
- Pseudomonas aeruginosa;
- Trichomonas vaginalis;
- Enterobactérias.

#### 6.4.8.1. Colheita

A colheita é feita para recipiente esterilizado, após masturbação, de acordo com as normas descritas na recepção. Caso a colheita seja feita fora do laboratório, o transporte deve ser feito à temperatura ambiente e no espaço de 1 hora.

Rejeitar:

- Colheitas com mais de 2 horas;
- Colheitas conservadas em frigorífico.

#### 6.4.8.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para esperma. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

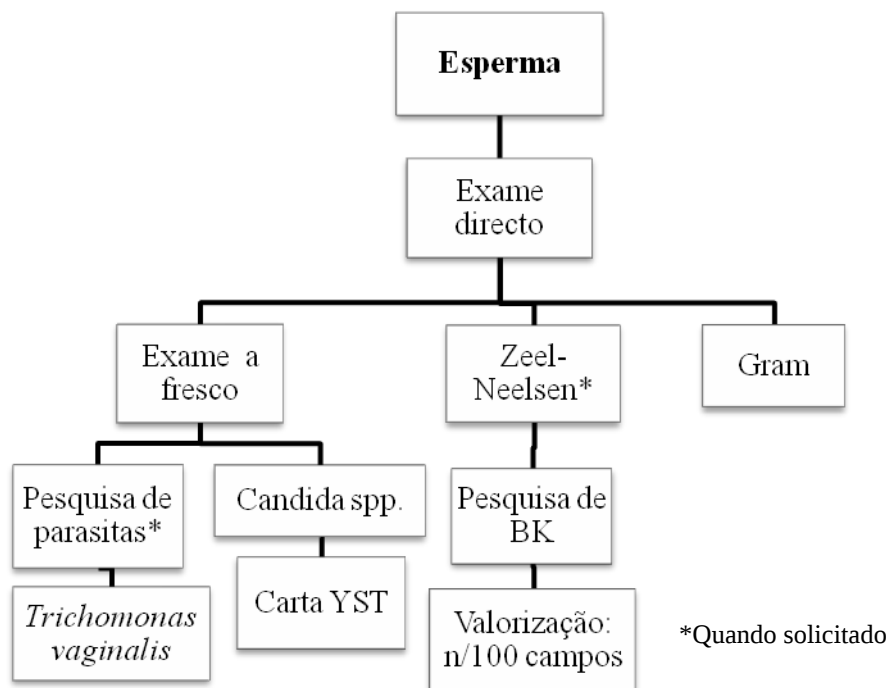


Figura 6-40 – Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame directo para o produto esperma.

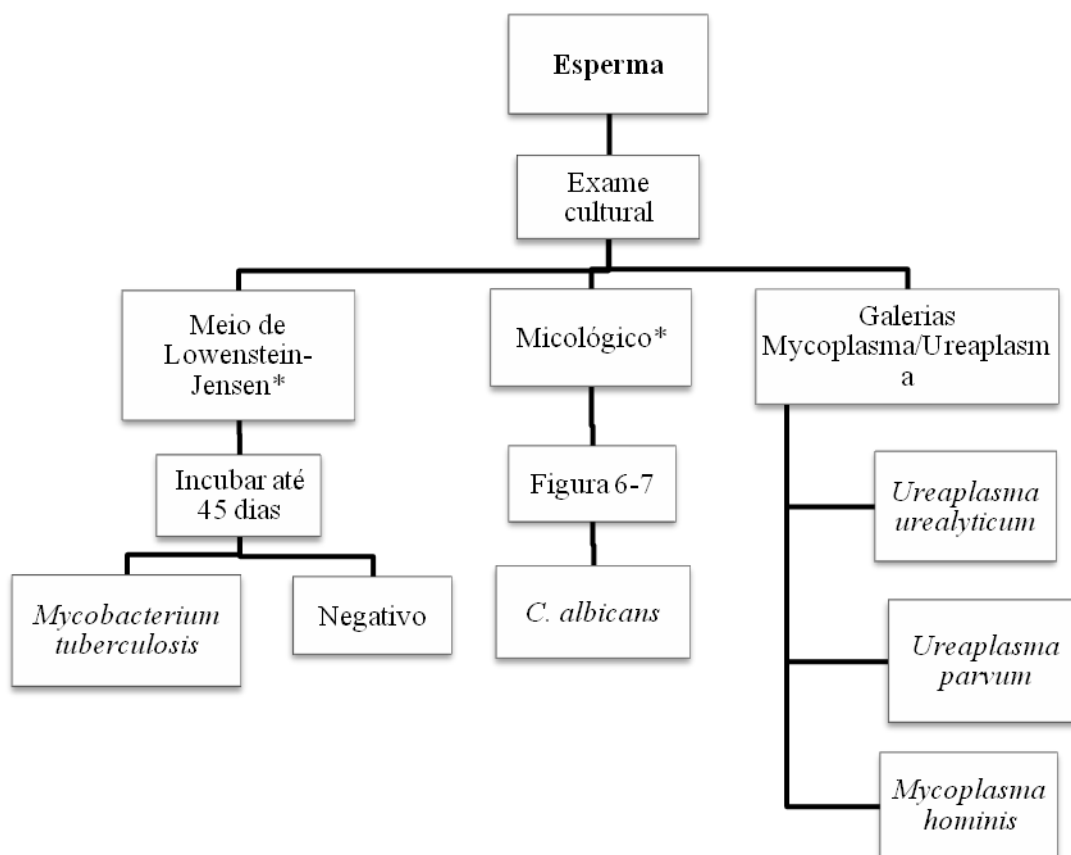


Figura 6-41 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural para o produto esperma.

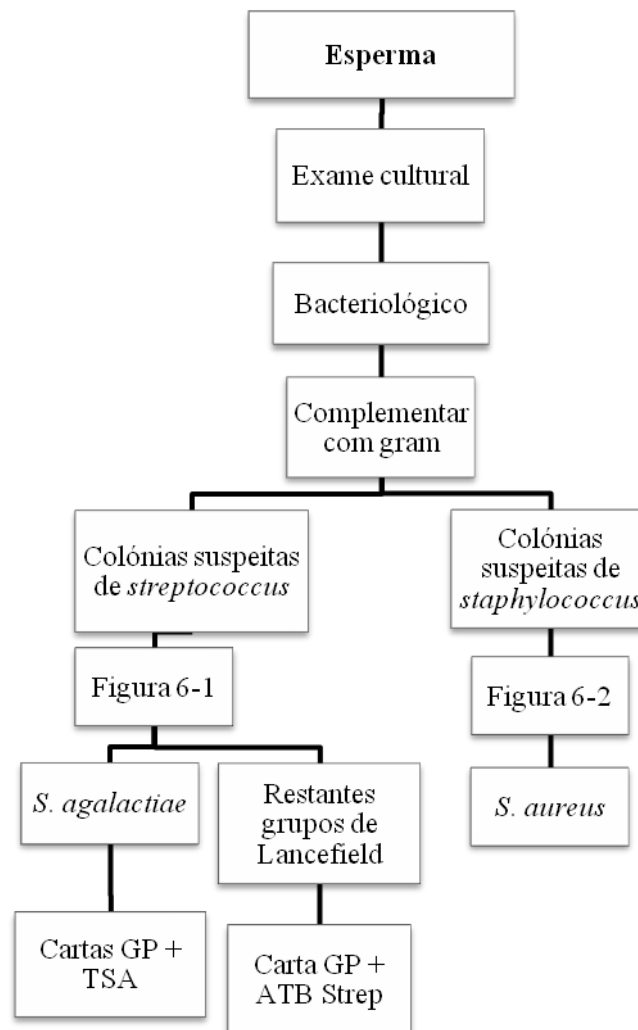


Figura 6-42 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural bacteriológico realizada com o produto esperma.

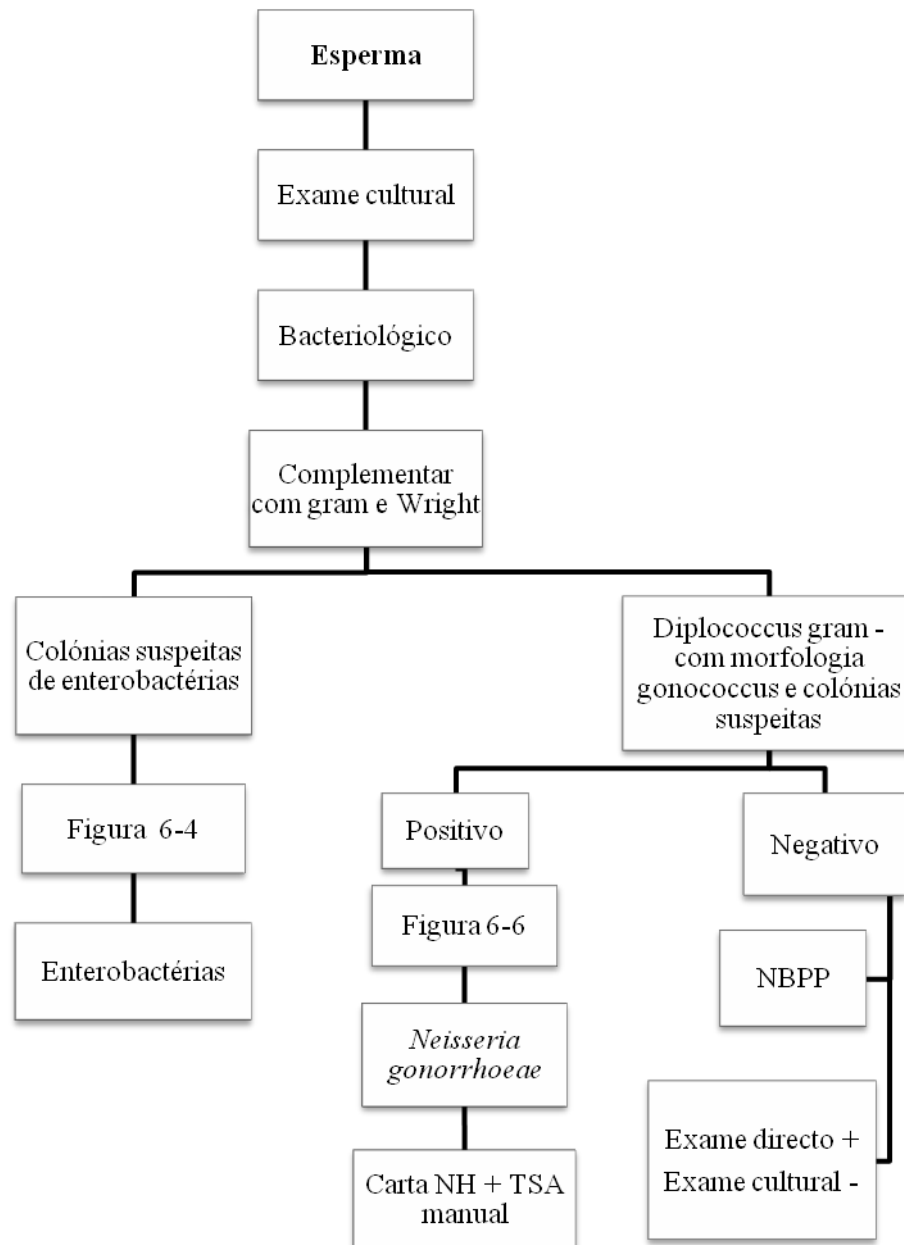


Figura 6-43 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural bacteriológico realizada com o produto esperma.

#### 6.4.9. Hemocultura

A cultura de sangue é de grande importância no âmbito da microbiologia clínica, pois a detecção de uma septicemia indica que a vida do paciente corre risco imediato e, por isso há urgência em estabelecer a terapêutica adequada.

A hemocultura é pedida, essencialmente, em duas situações clínicas:

- Quanto a existência de febre, choque ou outros sintomas, associados à suspeita de infecção (infecção de uma ferida cirúrgica, pneumonia, meningite, etc), sugere a possibilidade de septicemia.
- Quando se quer investigar as causas de um estado febril, devido à ausência de sinais de uma infecção específica ou local.

A principal dificuldade que ocorre, na interpretação dos resultados da hemocultura, resulta da possibilidade da amostra estar contaminada com organismos comensais da pele, por exemplo. A sua presença, na hemocultura, deverá ser considerada como suspeita de contaminação. No entanto, em doentes imunodeprimidos, os microrganismos comensais isolados podem, na realidade, ter um papel patogénico importante, tendo em conta as circunstâncias de cada caso.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- *Streptococcus spp.* (*S. tipo viridans*, *S. pneumoniae*,  $\beta$ -hemolíticos)
- *Staphylococcus aureus*;
- *Staphylococcus coagulase negativo*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Corynebacterium jeikeium*;
- *Haemophilus influenzae*;
- *Enterobactérias*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Brucella spp.*;
- *Candida spp.*;
- *Mycobacterium tuberculosis*;

##### 6.4.9.1. Colheita

Proceder às condições de assépsia: desinfetar bem a zona da punção, através de movimentos circulares do interior para o exterior; a punção deve ser feita com uma

lamparina acesa para manter a zona asséptica. Colher cerca de 10 mL de sangue (ou 5mL no caso dos bebés) para um recipiente apropriado, tendo o cuidado de não introduzir ar pois estes frascos encontram-se sob vácuo.

No caso de ser pedido pesquisa directa e/ou cultural de BK, colher sangue para tubo com anti-coagulante.

Devem ser colhidas três amostras com um intervalo de, pelo menos, 30 minutos entre cada uma delas.

A colheita de mielocultura é feita por pessoal especializado, em condições de assepsia.

#### 6.4.9.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para a hemocultura e mielocultura. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

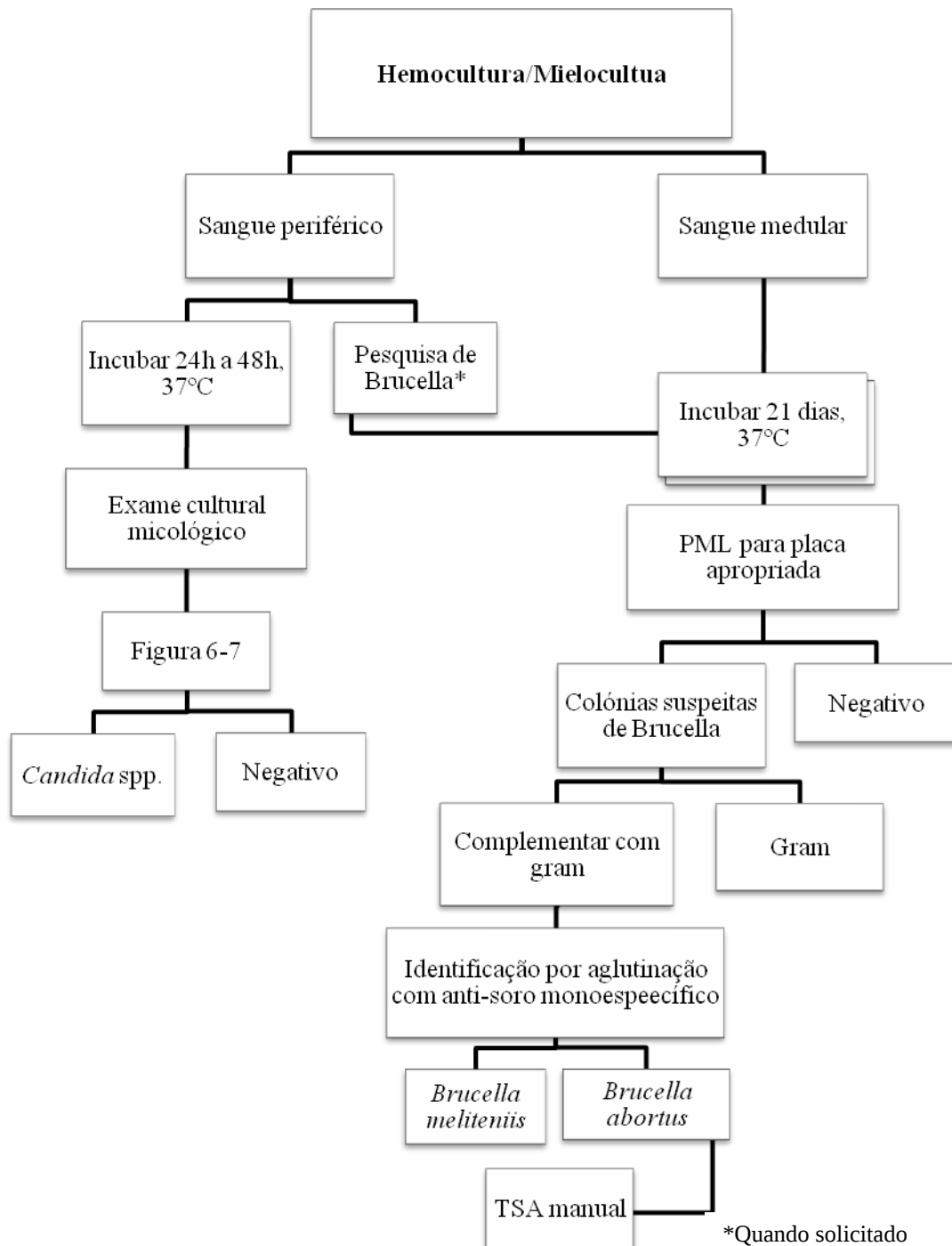


Figura 6-44 – Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural micológico e pesquisa de Brucella realizada com o produtos hemocultura e mielocultura.

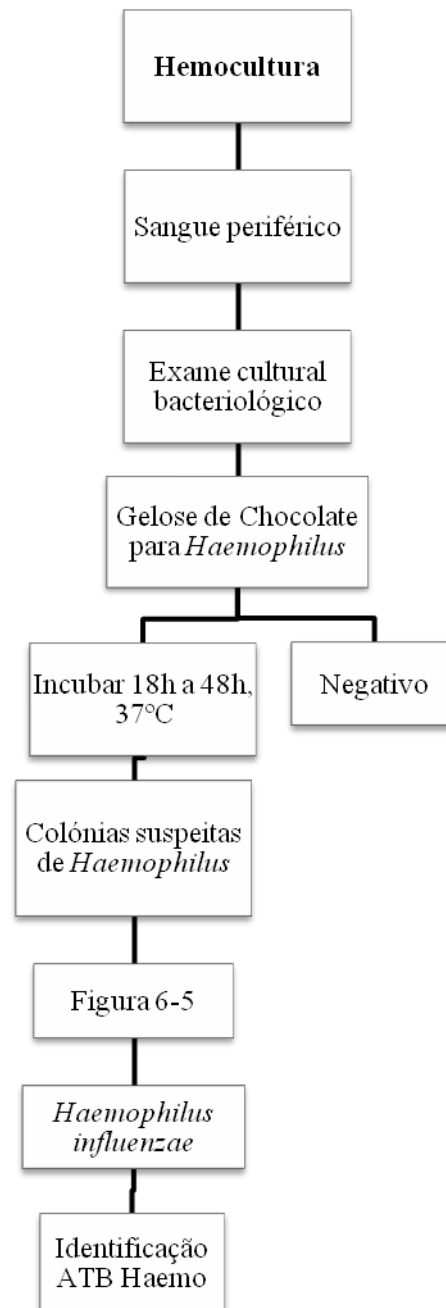


Figura 6-45 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural bacteriológico e pesquisa de *Haemophilus* realizada com o produtos hemocultura e mielocultura

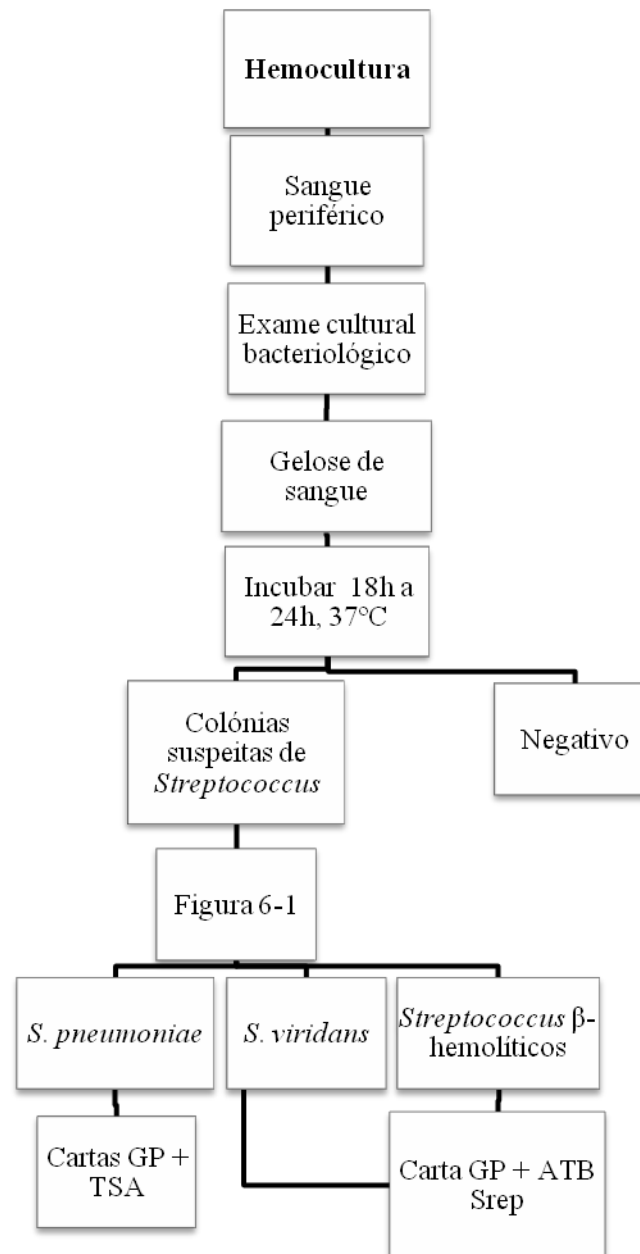


Figura 6-46 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto hemocultura.

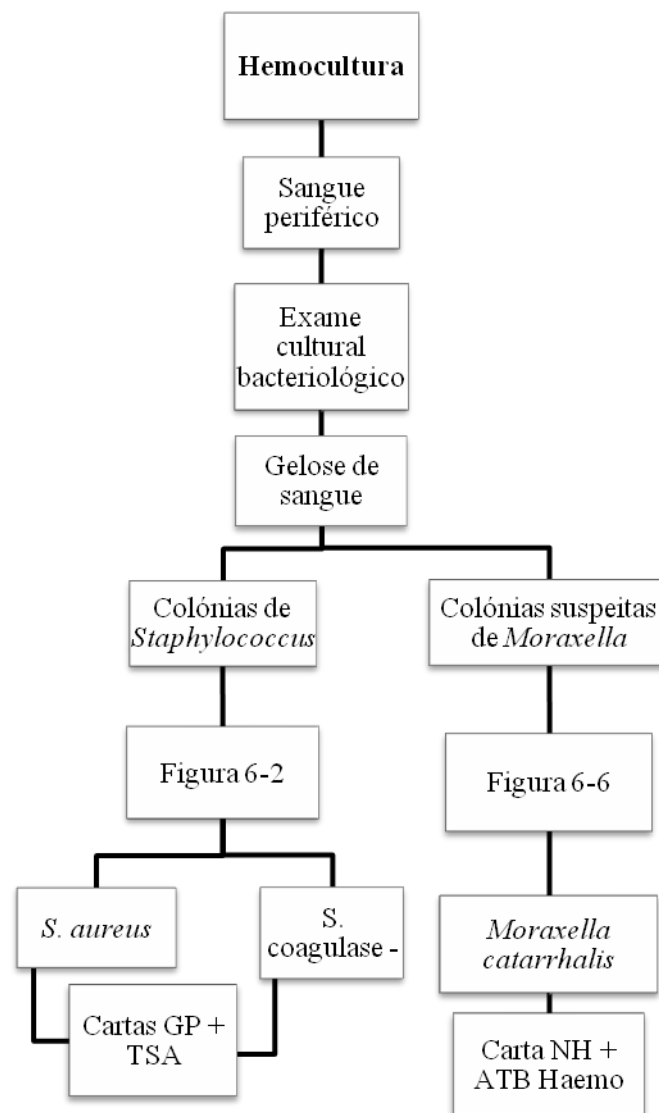


Figura 6-47 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral do exame cultural realizado com o produto hemocultura.

#### 6.4.10. Urina asséptica

No âmbito das análises clínicas, as infecções mais frequentes são as do tracto urinário. Estas infecções são muitas vezes causadas pela flora intestinal. Os grupos mais susceptíveis de sofrerem infecções urinárias são as crianças e os pacientes algaliados. No caso das crianças, os bebés devido ao uso de fralda, em que a urina e as fezes podem ficar algum tempo em contacto com o tracto genito-urinário ou por não serem limpas nas devidas condições aquando da mudança da fralda. No caso dos pacientes algaliados,

pelo facto de muitas vezes terem mobilidade reduzida ou por estarem acamados, a urina pode ficar retida na bexiga mais tempo, o que leva ao crescimento microbiano.

Os sintomas mais frequentes de infecção do tracto urinário são a urgência e frequência das micções, mal-estar e dor ao urinar.

A infecção mais comum é a cistite, provocada muitas vezes por enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Enterococcus faecalis*. Pode ainda ocorrer a infecção por cândidas em diabéticos ou imunodeprimidos. Como agentes mais raros da infecção urinária, citam-se *Streptococcus agalactiae* e outros estreptococos.

As infecções mais graves são a pielite e pielonefrite, cujos sintomas incluem, habitualmente, dor na região lombar e febre, podendo o agente causal ser qualquer dos que provocam cistite, mas ocorrem alguns casos devido a *Staphylococcus aureus*.

Nalguns doentes com sintomas de infecção urinária, o exame directo pode ser positivo (com glóbulos vermelhos e/ou leucócitos), mas sem proliferação bacteriana significativa na cultura de rotina. Tal facto pode ser devido ao uso de antibioterapia ou a infecção por um microrganismo que não se desenvolve nos meios de cultura normalmente usados, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*.

As infecções urinárias podem ainda ser provocadas por leveduras ou parasitas como *Shistosoma haematobium* e *Trichomonas vaginalis*.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- *Candida spp.*;
- *Enterobacteriaceae*;
- *Enterococcus spp.*;
- *Streptococcus agalactiae*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Staphylococcus epidermitis*;
- *Staphylococcus saprophyticus*;
- *Neisseria gonorrhoeae*;
- *Acinetobacter spp.*;
- *Shistosoma haematobium*;
- *Trichomonas vaginalis*;
- *Enterobius vermicularis*;

- *Mycoplasma hominis*;
- *Ureaplasma urealyticum*;
- *Ureaplasma parvum*.

#### 6.4.10.1. Colheita

Após a assépsia do local, rejeitar o primeiro jacto e colher a urina para um contentor esterilizado. No caso das mulheres, é recomendado afastar os lábios para proceder à colheita. No caso de cateterização uretro-vesical a colheita deve ser feita no momento da mudança da algália. O tubo é retirado e é recolhida uma porção de urina directamente para o contentor esterilizado. No caso de bebés a colheita é feita através do saco colector. Deve ser colado após desinfecção uro-genital e substituído a cada 30 minutos enquanto a criança não urinar.

Rejeitar sempre:

- *Pontas de algália*;
- *Sacos colectores de algaliação permanente*;
- *Urina transvazada de sacos colectores*;
- *Urina asséptica com mais de 24h de refrigeração*.

#### 6.4.10.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para urina asséptica. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

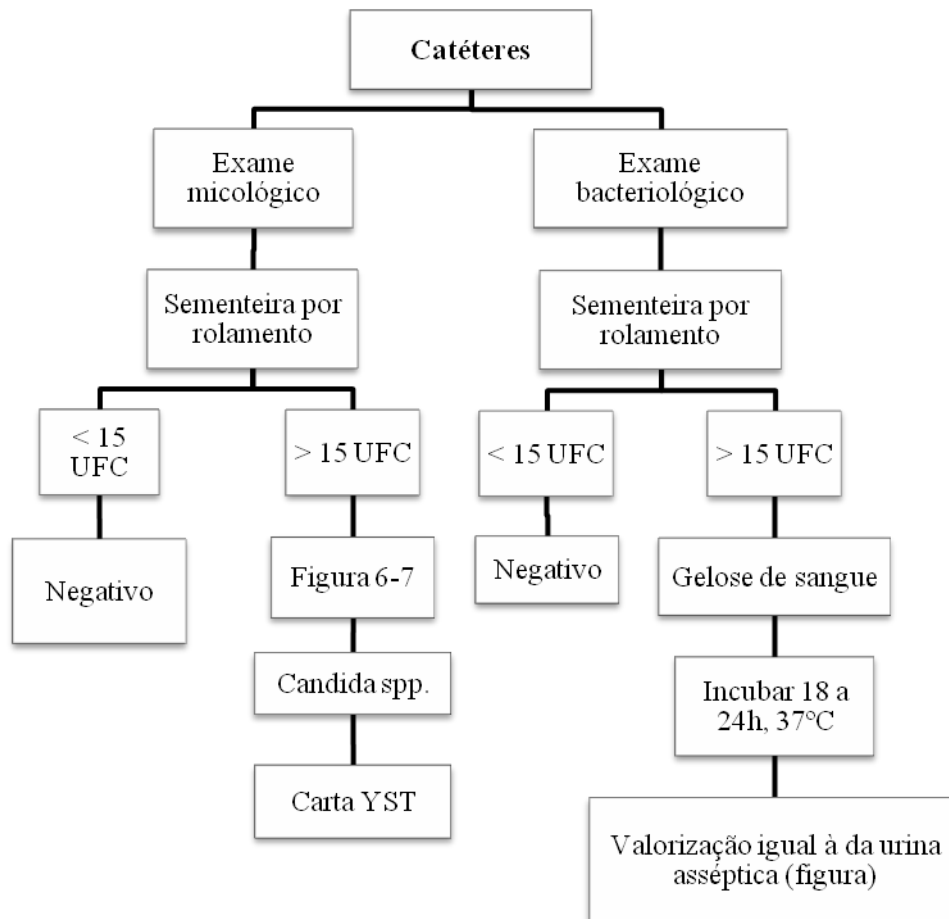


Figura 6-48 – Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame micológico e bacteriológico do produto catéteres.

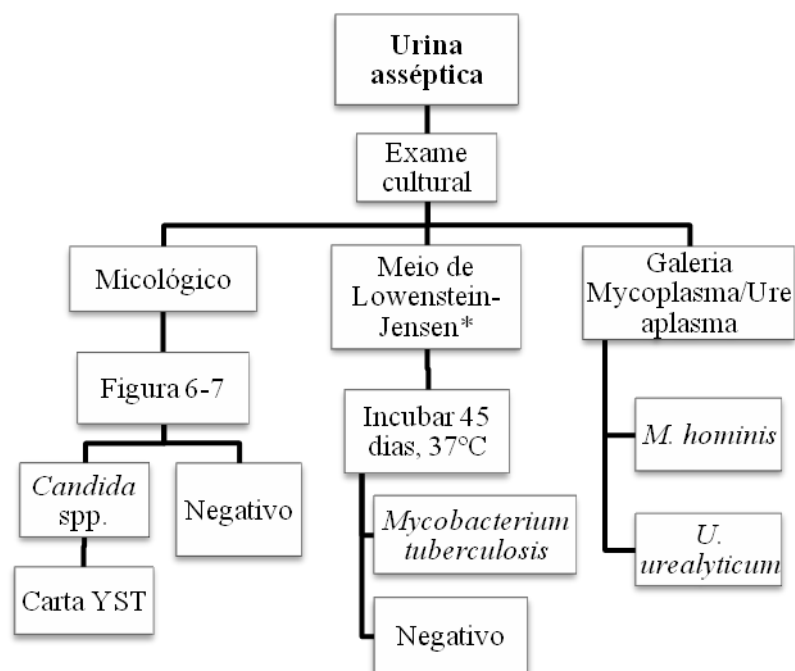


Figura 6-49 – Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame cultural do produto urina asséptica.

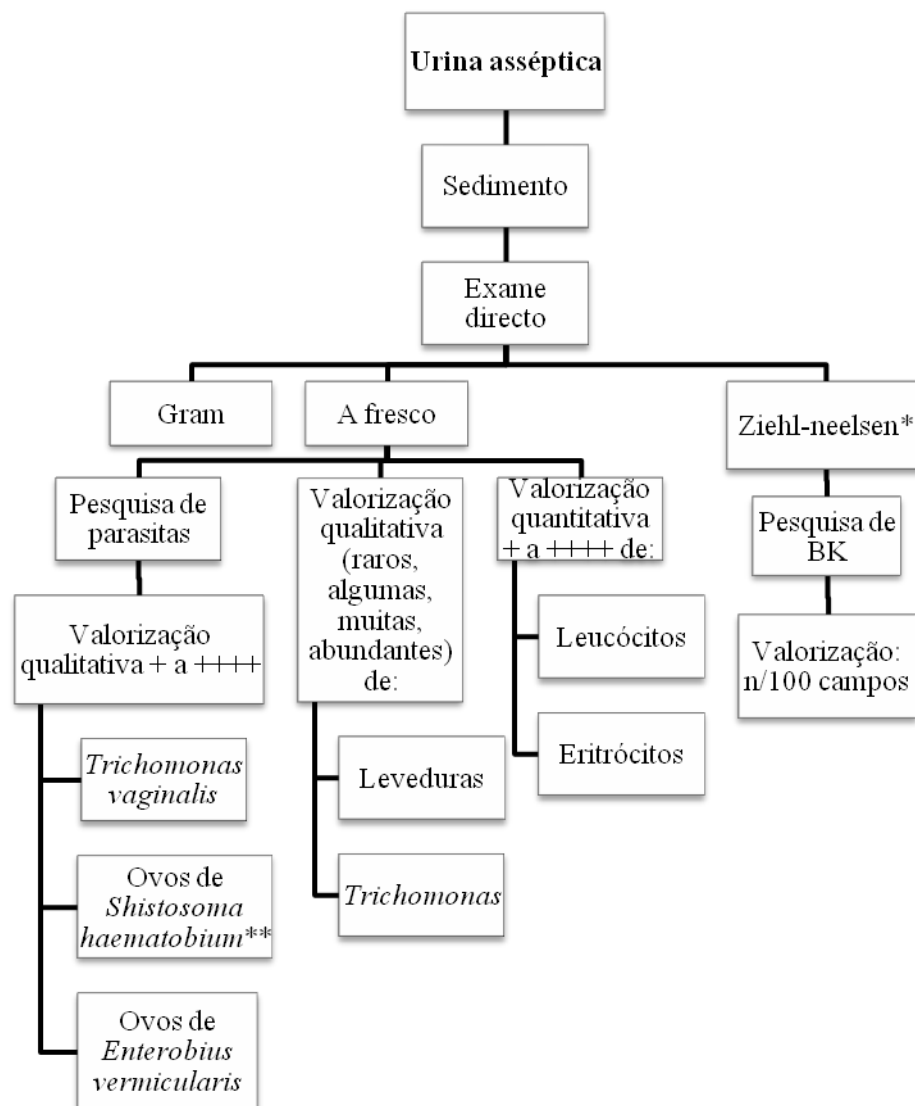


Figura 6-50 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral realizada para o exame directo do produto urina asséptica.

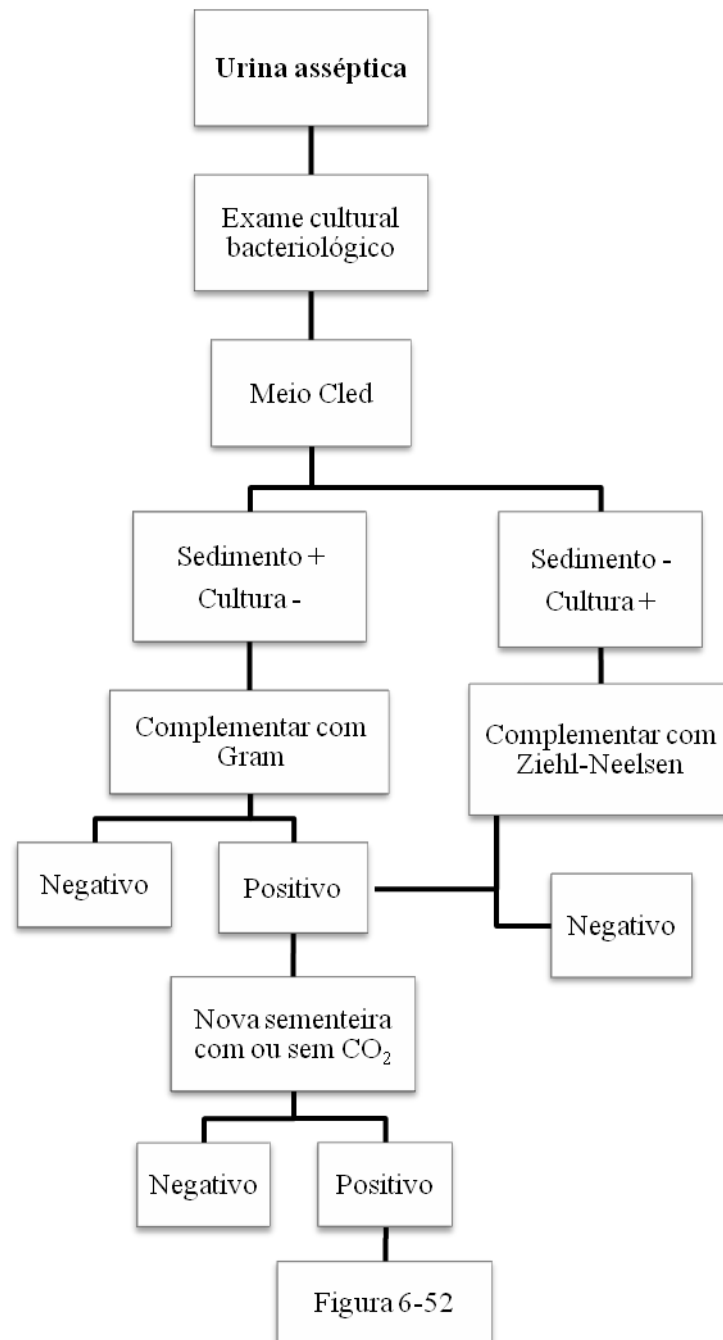


Figura 6-51 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame cultural do produto urina asséptica.

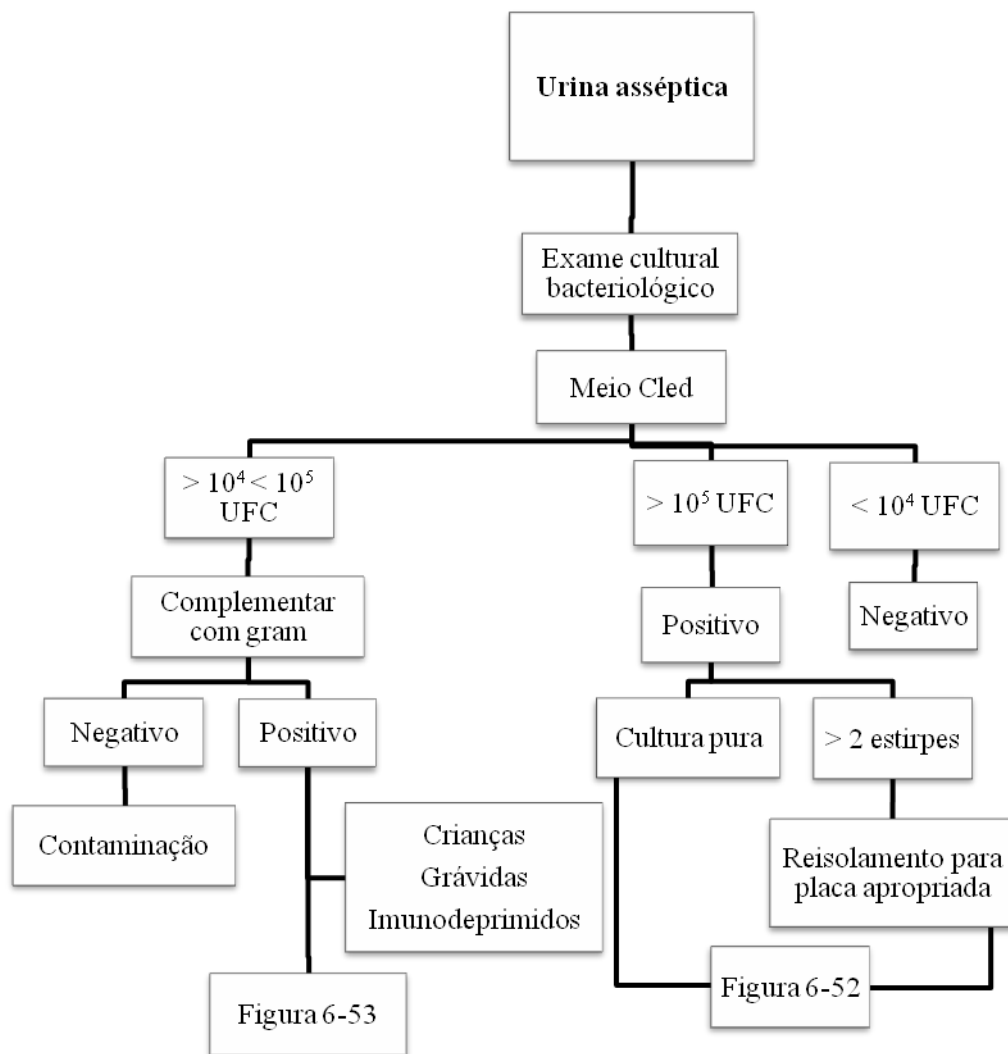


Figura 6-52 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame cultural do produto urina asséptica.

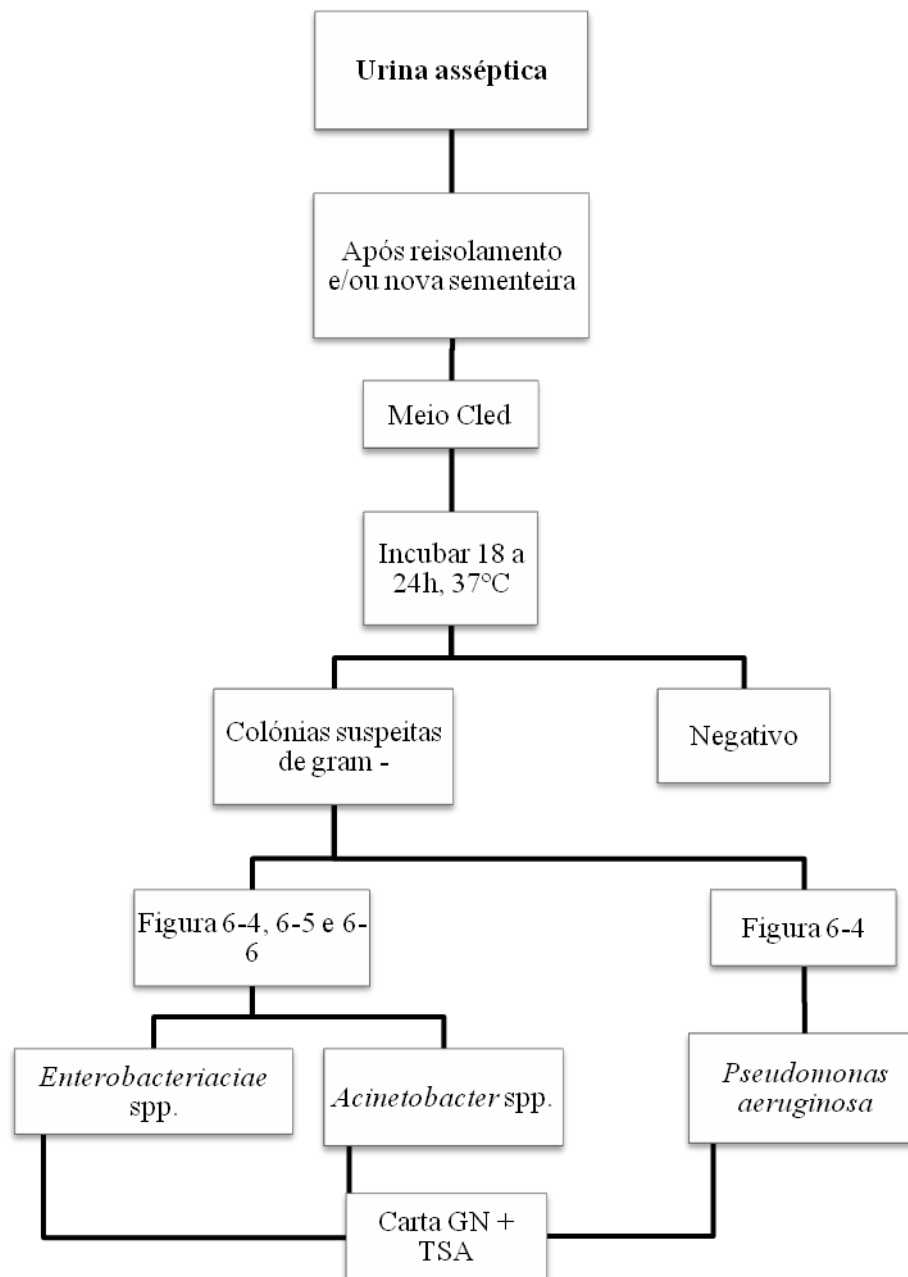


Figura 6-53 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame cultural do produto urina asséptica.

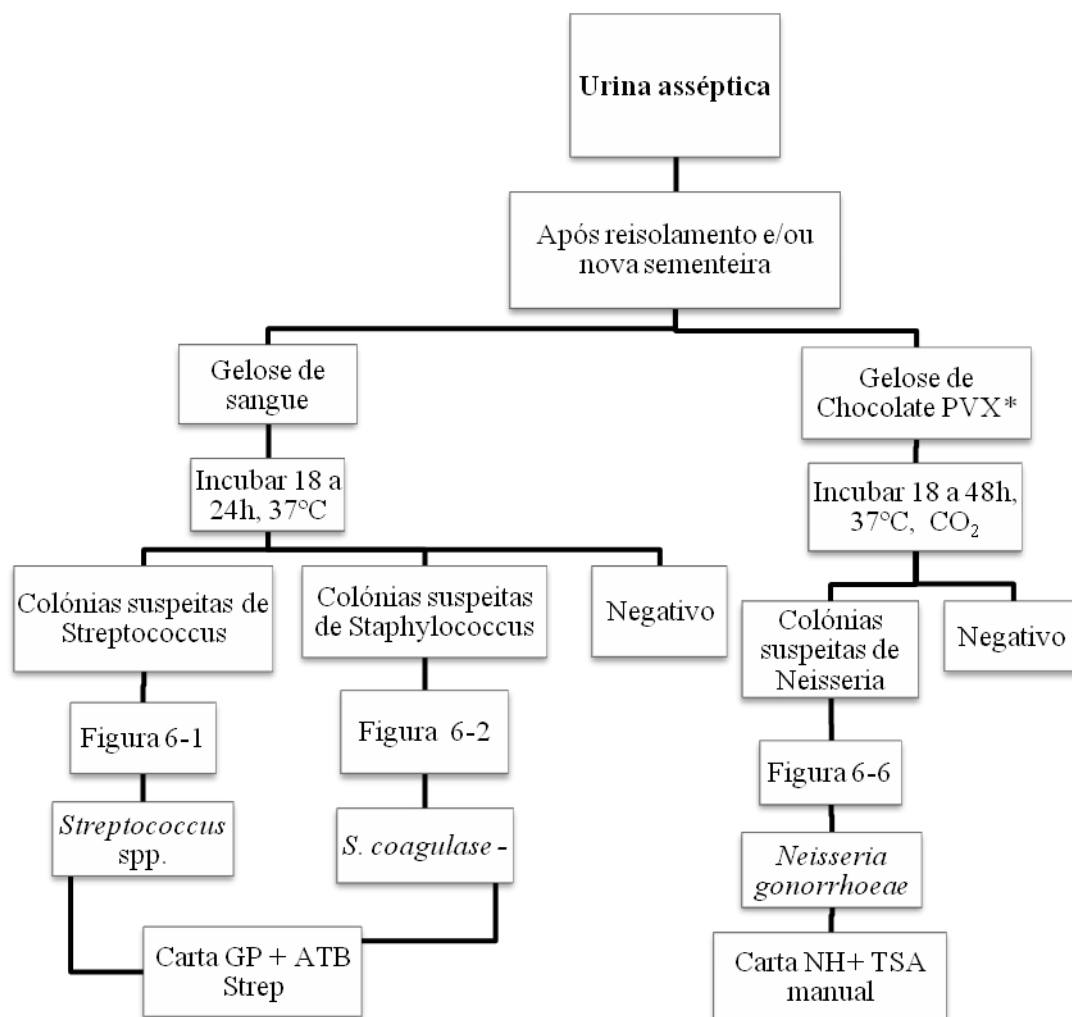


Figura 6-54 – (continuação) Fluxograma ilustrando quais os meios usados, após reisolamento e/ou nova sementeira, bem como os respectivos microrganismos a valorizar com o produto urina asséptica.

#### 6.4.11. Fezes

As amostras mais frequentemente analisadas para diagnóstico das infeções gastrointestinais são as fezes, diarreicas ou não. Os sintomas mais frequentes são diarreia, dores abdominais e vómitos.

As causas mais frequentes de diarreia, em adultos e crianças de idade superior a 2-3 anos, é a infeção por espécies de *Campylobacter*, algumas espécies de *Salmonella* e *Shigella sonnei*, além de intoxicação alimentar, provocada por estas e outras bactérias, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, *Colstridium perfringens*, entre outras. Um número relativamente pequeno de casos é provocado pelo protozoário *Giardia lamblia*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* B e *Yersinia enterocolitica*.

Nas crianças com idade inferior aos 2 anos são numerosos os casos de gastroenterite provocada por vírus, assim como por estirpes intestinais, enteropatogénicas de *Escherichia coli*.

Os indivíduos que viajam até ao estrangeiro podem ser contaminados por diversos microrganismos patogénicos intestinais, exóticos tais como *Vibrio cholera* e parasitas como *Entamoeba histolytica*, entre outros. A informação de que o paciente viajou para o estrangeiro é de grande importância para alertar o laboratório para a realização dos exames necessários à identificação de microrganismos patogénicos exóticos.

Nos doentes tratados com antibióticos (por exemplo, durante intervenção cirúrgica abdominal) pode ocorrer enterocolite grave, devido a uma estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente ao antibiótico. Além disso, pode surgir diarreia simples, mas benigna, em consequência do tratamento prolongado por um ou mais antibióticos, o qual desequilibra a flora intestinal normal e predispõe para a infecção por *Candida albicans* ou *Cryptosporidium*.

Os microrganismos patogénicos pesquisados no laboratório de microbiologia da clínica são:

- *Staphylococcus aureus*;
- *Salmonella spp.*;
- *Shigella spp.*;
- *Escherichia coli* enteropatogénico;
- *Campylobacter jejuni*;
- *Yersinia enterocolitica*;
- *Vibrio cholerae*;
- Toxina A e B de *Clostridium perfringens*;
- Ovos e quistos de parasitas intestinais;
- *Mycobacterium tuberculosis*;
- *Candida spp.*

#### 6.4.11.1. Colheita

Colher, para frasco de boca larga, uma porção equivalente a uma noz ou, no caso de fezes líquidas, um terço do frasco. Entregar no laboratório até 2 horas após a colheita. No caso de este prazo não ser possível de cumprir, colher para recipiente com meio de

transporte (ETM) e manter à temperatura ambiente. Em crianças ou bebés podem ser usados zaragatoa ânus-rectal ou fraldas, respectivamente.

Rejeitar:

- Amostras com mais de 2 horas sem meio de transporte.

No caso de pesquisa de parasitas fazer a colheita para frasco de boca larga. Se o médico pedir fezes de mais de um dia o doente pode conservar no frigorífico.

Rejeitar:

- Amostras em papel;
- Amostras em plástico;
- Frasco destapados.

#### 6.4.11.2. Marcha geral

De seguida encontram-se fluxogramas que demonstram a marcha geral efectuada no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira para fezes. Nos fluxogramas encontram-se, de uma maneira geral, todos os procedimentos realizados para se identificar os microrganismos patogénicos presentes nos produtos, incluindo placas de cultura e testes presuntivos/identificativos realizados.

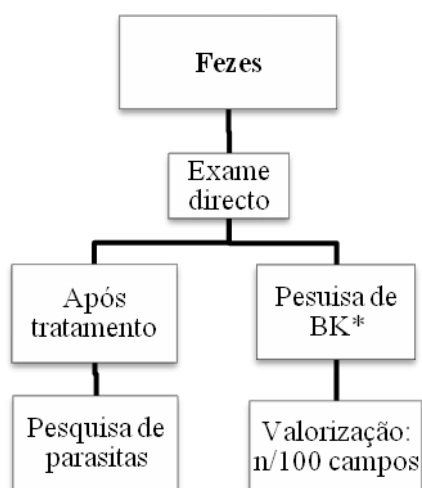


Figura 6-55 - Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame directo do produto fezes.

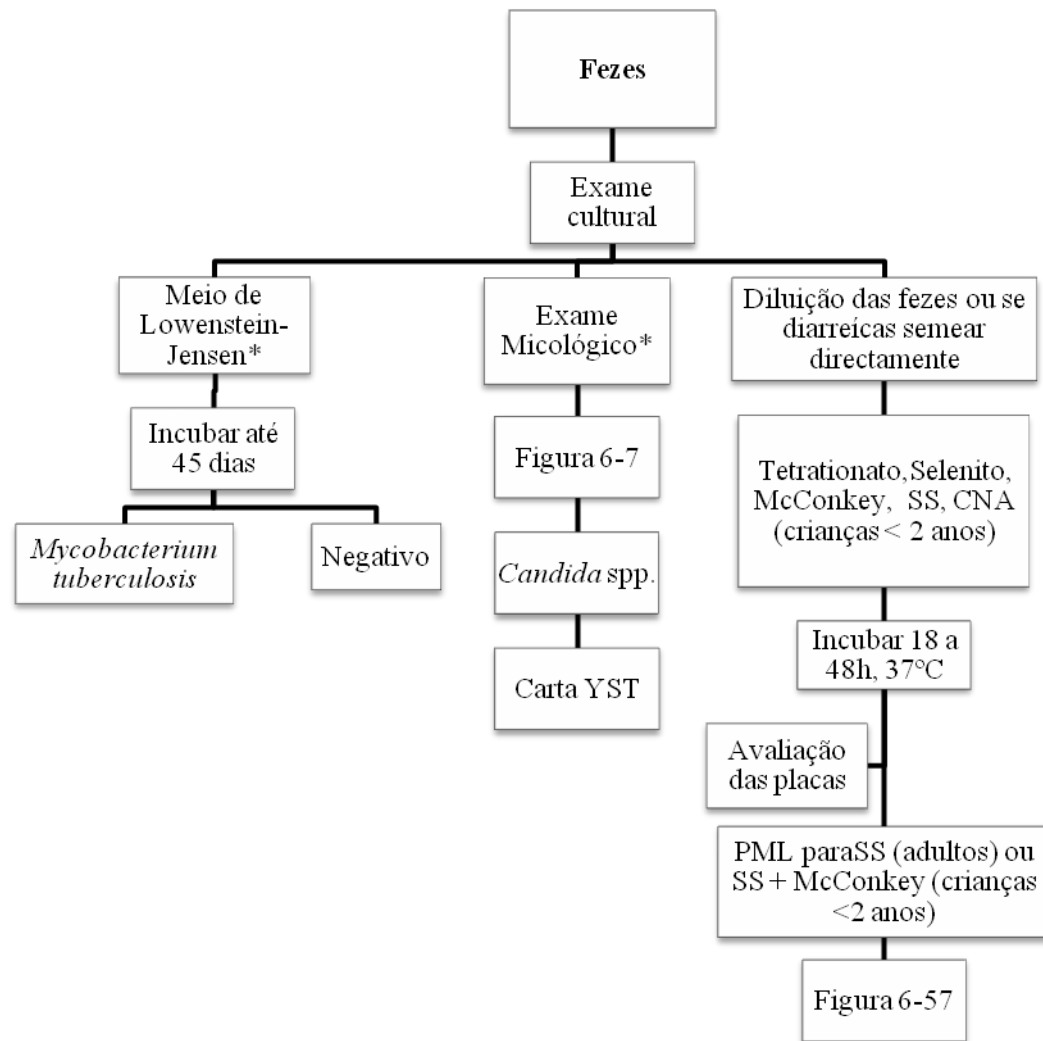


Figura 6-56 - (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o produto fezes

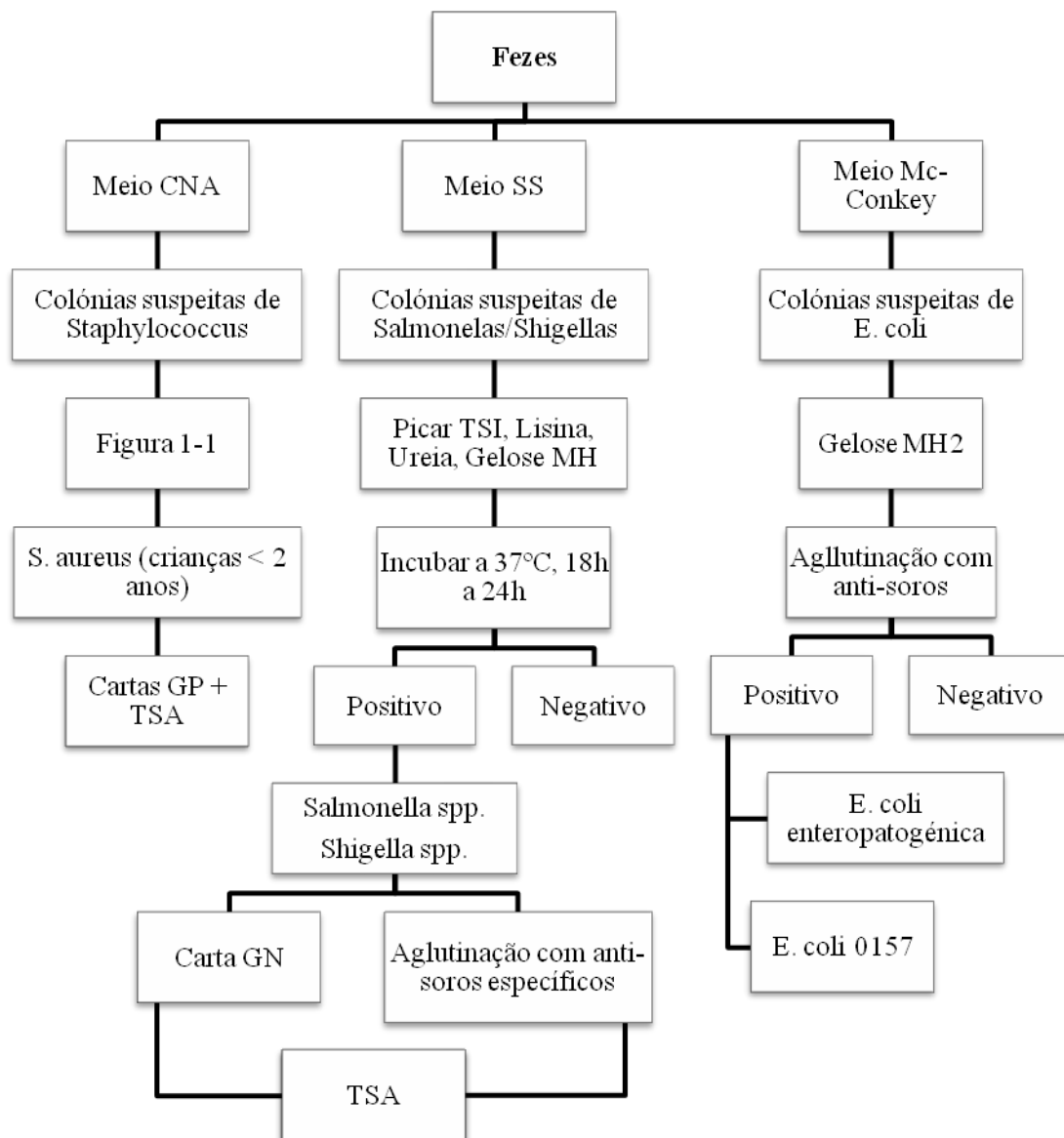


Figura 6-57 – (continuação) Fluxograma ilustrando a marcha geral para o exame cultural, de rotina, para o produto fezes.

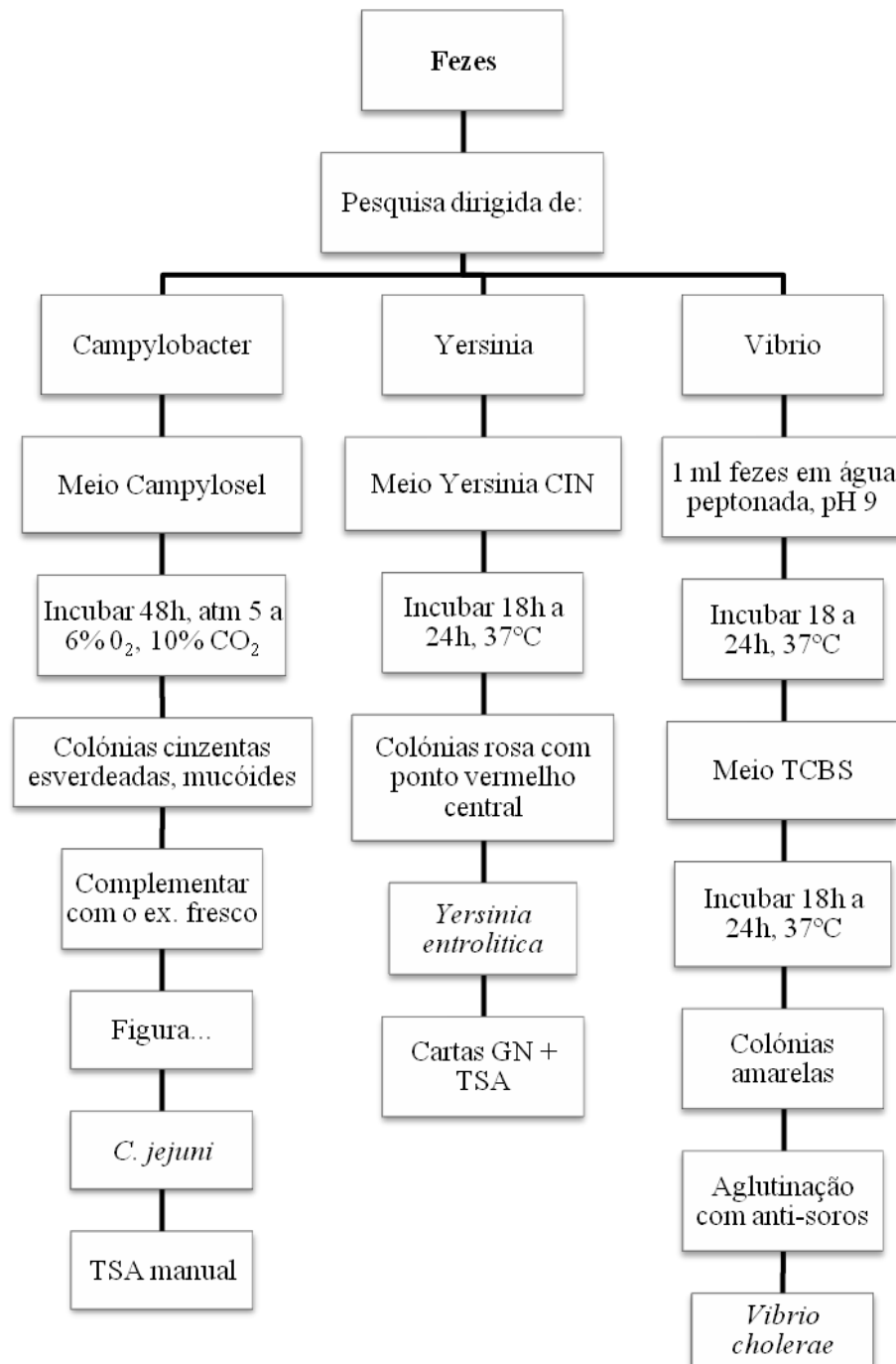


Figura 6-58 – Fluxograma ilustrando a marcha geral das pesquisas dirigidas para o produto fezes.

#### 6.4.12. Pesquisa de fungos dermatófitos

São frequentes, em todas as regiões do planeta, as infecções fúngicas das camadas superficiais do corpo, causadas, na maior parte por fungos dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Tricophyton* que provocam lesões da queratina. As micoses superficiais também podem ser provocadas por leveduras (*Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*), muitas vezes associado a diabetes e

obesidade. O resultado positivo, com identificação de um fungo, permite o diagnóstico definitivo, determina o tratamento correcto e habilita a que se tomem as medidas adequadas quanto à possível fonte de infecção e prevenção da disseminação. A eficácia da análise de amostras de pele, unhas e cabelo depende da quantidade de material disponível. Na sua maioria, os fungos dermatófitos produzem dois tipos de conídios assexuados: os microconídios, pequenos e unicelulares, e os macroconídios, grandes e septados, com paredes espessas ou finas.

#### 6.4.12.1. Colheita

Colheita deve ser feita por técnicos especializados.

- Unhas: Após desengordurar o local, procede-se à raspagem da unha com uma goiva. A colheita é feita para uma caixa de petri estéril.
- Pêlos e cabelos: Arrancar o pêlo com uma pinça.
- Escamas no couro cabeludo: Removê-las com a ajuda de uma pinça.
- Escamas de pele: Após desengordurar o local procede-se à raspagem da lesão da periferia para o centro, com a ajuda de um bisturi.

#### 6.4.12.2. Marcha geral

O diagnóstico das micoses superficiais no laboratório de microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira é feito através de visualização das amostras de pele, unhas e cabelo ao microscópio, após tratamento com KOH 10-20% (dependendo do tipo de amostra). O exame tem por base a presença de microconídios, macroconídios, clamidósporos e estrutura das hifas.

### 6.5. **Controlo de qualidade**

#### 6.5.1. Controlo de Qualidade Interno

No âmbito da microbiologia clínica o controlo de qualidade é feito com estirpes de referência. Estas estirpes, designadas de ATCC (American Title Culture Collection) não são mais do que estirpes bacterianas com valor teórico conhecido, que são testadas nas mesmas condições que as amostras de pacientes, e usadas como controlo positivo ou negativo aos microrganismos testados.

De seguida encontra-se a tabela referente ao controlo de qualidade interno realizado no laboratório.

Tabela 6-3 – Controlo de qualidade interno dos equipamentos do laboratório.

| Equipamento                | Procedimento                                             | Frequência                               | Limites de tolerância |
|----------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| Frigoríficos               | Registo de temperatura                                   | Variamente, alternando os 3 frigoríficos | 2°C – 8°C             |
| Estufa (a 37°C)            | Registo de temperatura                                   | Diariamente, alternado as 3 estufas      | 37°C ± 2°C            |
| Estufa (a 30°C)            | Registo de temperatura                                   | Diariamente                              | 30°C ± 2°C            |
| Câmara de fluxo de laminar | Verificar se há crescimento em placa de gelose de sangue | Semanalmente                             | -                     |

Tabela 6-4 – Controlo de qualidade interno de cada técnica manual realizada no laboratório.

| Técnica             | Descrição                                                                | Controlo positivo                       | Controlo negativo                            | Frequência                           |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| Coagulase em lâmina | Slidex Staph plus ou Slidex Staphi kit da Biomérieux                     | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | Quinzenalmente ou na mudança do lote |
| Coagulase em tubo   | Nu tubo de hemólise suspender a estirpe no plasma liofilizado da Iberlab | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | Quinzenalmente ou na mudança do lote |

| <b>Técnica</b>                                                    | <b>Descrição</b>                                                                                | <b>Controlo positivo</b>                      | <b>Controlo negativo</b>                        | <b>Frequência</b>                                                    |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Teste da Optoquina                                                | Semear em meio Columbia com 5% sangue de carneiro. Sensível - halo de inibição deve ter >15 mm. | <i>Streptococcus pneumoniae</i><br>ATCC 49619 | -                                               | Quinzenalmente ou na mudança do lote                                 |
| Oxidase                                                           | Masta ID Oxidase Strips Iberlab                                                                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853   | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922           | Quinzenalmente ou na mudança do lote                                 |
| Factores X, V e X+V                                               | Discos da Iberlab em Mueller-Hinton 2. Desenvolvimento em X+V                                   | <i>Haemophilus influenzae</i><br>ATCC 49247   | -                                               | Quinzenalmente ou na mudança do lote                                 |
| DNase                                                             |                                                                                                 | <i>Moraxella catarrhalis</i><br>ATCC 25238    | <i>Staphylococcus epidermidis</i><br>ATCC 12228 | Sempre que se identificar <i>Moraxella catarrhalis</i> numa amostra. |
| Grupagem serológica dos <i>Streptococci</i> $\beta$ - hemólíticos | Mastastrep da Iberlab                                                                           | <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615      | -                                               | Quinzenalmente ou na mudança do lote                                 |

| Técnica                                                                      | Descrição                                                                                       | Controlo positivo                        | Controlo negativo                       | Frequência                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Teste da Bacitracina + SXT                                                   | Discos da Biomérieux em Columbia + 5% sangue de carneiro. O halo de inibição deve ser sensível. | <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 | -                                       | Quinzenalmente ou na mudança do lote                           |
| Aglutinação serológica de Salmonellas                                        |                                                                                                 | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 |                                         | Sempre que se suspeitar de <i>Salmonella</i> spp. numa amostra |
| Aglutinação serológica de Shigellas, E. coli enteropatogénico e E. coli O157 | Apenas é controlado através da avaliação externa do NEQAS.                                      |                                          |                                         |                                                                |
| Catalase                                                                     | Teste feito com água oxigenada a 10 volumes                                                     | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213  | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | Quinzenalmente ou na mudança do lote                           |
| Teste Germinativo                                                            |                                                                                                 | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231       | -                                       | Mensalmente                                                    |

| Técnica           | Descrição | Controlo positivo                       | Controlo negativo                  | Frequência                                                                         |
|-------------------|-----------|-----------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Coloração de Gram |           | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Sempre que se muda o lote de qualquer reagente fazer 2 esfregaços com os controlos |

Tabela 6-5 – Controlo de qualidade interno dos meios usados em rotina.

| Técnica                      | Descrição                                                                             | Controlo positivo                        | Controlo negativo | Frequência      |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Meio de Gardnerella          | Meio selectivo para a <i>Gardnerella vaginalis</i>                                    | <i>Gardnerella Vaginalis</i> ATCC 14018  | -                 | Mudança de lote |
| Gelose de Chocolate PVX      | Meio para bactérias fastidiosas. Testado em ambiente de CO <sub>2</sub> e anaerobiose | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226  | -                 | Mudança de lote |
| Meio Yersinia                | Gelose Yersinia CIN da Biomérieux                                                     | <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610 | -                 | Mudança de lote |
| Meio para Campylobacter      | Meio selectivo para <i>Campylobacter</i>                                              | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291   | -                 | Mudança de lote |
| Meio TSI (Triple Sugar Iron) | -                                                                                     | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | -                 | Mudança de lote |

| Técnica          | Descrição | Controlo positivo                           | Controlo negativo                           | Frequência                                                |
|------------------|-----------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Meio Lysine Iron | -         | <i>Salmonella enteritidis</i><br>ATCC 13076 | -                                           | Mudança de lote                                           |
| Meio Ureia Indol | -         | <i>Proteus vulgaris</i><br>ATCC 6380        | <i>Salmonella enteritidis</i><br>ATCC 13076 | Mudança de lote ou na abertura de um frasco do mesmo lote |

Tabela 6-6 – Controlo de qualidade interno das galerias de antibióticos, teste do FA directo, e atmosferas de CO<sub>2</sub> e microaerofilia.

| Técnica                   | Descrição                        | Controlo positivo                             | Controlo negativo                          | Frequência                                                     |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ATB Haemo                 | Galerias                         | <i>Haemophilus influenzae</i><br>ATCC 49247   | <i>Moraxella catarrhalis</i><br>ATCC 25238 | Quinzenalmente                                                 |
| ATB Strepto               | Galerias                         | <i>Streptococcus pneumoniae</i><br>ATCC 49619 | <i>Streptococci</i> β-hemolíticos          | Quinzenalmente                                                 |
| FA Directo                |                                  | <i>Streptococcus pyogenes</i><br>ATCC 19615   | -                                          | Sempre que se muda o lote do kit fazer juntamente com amostra  |
| TSA <i>N. gonorrhoeae</i> | Difusão de discos de Kirby-Bauer | <i>Neisseria gonorrhoeae</i><br>ATCC 49226    | -                                          | Sempre que se suspeitar de <i>N. gonorrhoeae</i> numa amostra. |
| Cartas YST                |                                  | <i>Candida glabrata</i><br>ATCC MYA 2950      | -                                          | Mensalmente ou em mudança de lote                              |

| Técnica                     | Descrição                                                         | Controlo positivo                       | Controlo negativo | Frequência                                                  |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| Atmosfera CO <sub>2</sub>   | Sementeira em gelose de chocolate em atmosfera de CO <sub>2</sub> | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226 | -                 | Mensalmente ou mudança de lote fazer juntamente com amostra |
| Atmosfera de microaerofilia | Sementeira em gelose Campyloset em atmosfera de microaerofilia    | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291  | -                 | Mudança de lote, fazer juntamente com amostra.              |

Tabela 6-7 – Controlo de qualidade interno do equipamento VITEK® 2.

| Equipamento | Descrição                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Estirpes                                                                                                                                                                                                                                   | Frequência                     |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| VITEK 2     | Estirpes usadas até serem detectados desvios (dentro da validade) ou renovadas de 6 em 6 semanas.<br>Excepção:<br><i>Campylobacter jejunii</i> ,<br><i>Gardnerella vaginalis</i> ,<br><i>Neisseria gonorrhoeae</i> ,<br><i>Streptococcus pneumoniae</i> ,<br><i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Candida glabrata</i> ATCC MYA 2950 – Carta YST                                                                                                                                                                                          | Mensalmente ou mudança de lote |
|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 - Carta TSA<br><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 – Carta TSA<br><i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 700324 – Carta GN<br><i>Streptococcus equi</i> spp.<br><i>Zooepidermicus</i> ATCC 43079 – Carta GP | 1ª Semana                      |

| Equipamento | Descrição | Estirpes                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Frequência |
|-------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|             |           | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC<br>6380 – Carta GN<br><i>Enterococcus casseliflavus</i><br>ATCC 700327 – Carta GP<br><i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213 – Cartas GP e<br>TSA<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 – Carta TSA<br><i>Streptococcus</i><br><i>pneumoniae</i> ATCC 49619 –<br>Carta TSA | 2ª Semana  |

### 6.5.2. Avaliação Externa da Qualidade

A AEQ permite a avaliação da dispersão de valores em torno do valor alvo e permite verificar os métodos mais problemáticos bem como auxiliar na escolha de métodos para os quais se conseguem melhores resultados em detrimento daqueles que costumam dar resultados menos satisfatórios.

No âmbito da microbiologia clínica não há resultados fixos pois são valores qualitativos. De acordo com os resultados dos laboratórios participantes no programa, é estabelecido um limite de desempenho aceitável. Os resultados são dados com base na média e desvio padrão de todos os laboratórios participantes.

De seguida, encontra-se a tabela que descreve a avaliação externa da qualidade a que o laboratório está sujeito.

Tabela 6-8 – Avaliação externa de qualidade do laboratório.

| Parâmetros                     | Descrição                                                            | Frequência               |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Bacteriologia                  | 3 Identificações + 2 antibiogramas. Uma das amostras é sempre fezes. | 12 Amostras em 11 meses. |
| Micobactérias (exame cultural) | 4 Identificações                                                     | De 3 em 3 meses          |

| Parâmetros                    | Descrição             | Frequência             |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Micobactérias (exame directo) | 4 Identificações      |                        |
| Parasitologia fecal           | 2 ou 3 identificações | 8 amostras em 11 meses |

## 7. CONCLUSÃO

O estágio profissionalizante do Mestrado em Análises Clínicas realizado nos Laboratórios de Imunologia, Virologia e Bioquímica do IPOLFG e no Laboratório de Microbiologia da Clínica de Diagnósticos Dr. Fernando Teixeira cumpriu com os objectivos.

Com este estágio foi possível aplicar os conhecimentos ministrados ao longo da componente curricular do Mestrado e adquirir a capacidade de conduzir correctamente a análise de um determinado produto biológico de forma a obter resultados exactos e consequentemente fiáveis. Especificamente, durante o período em que o estágio decorreu foi possível; aplicar conhecimentos relacionados com a organização das actividades diárias do laboratório de Análises Clínicas; desenvolver capacidade crítica e de autocrítica no âmbito da actividade profissional das Análises Clínicas; demonstrar capacidade para exercer actividade em equipas multidisciplinares; adquirir conhecimentos que permitam a compreensão e aplicação dos princípios do controlo e garantia da qualidade; e desenvolver capacidade para realizar trabalho autónomo associado ao diagnóstico laboratorial.

**BIBLIOGRAFIA**

- Barin F. Diagnosis and Monitoring HIV Infection. BioMérieux.
- Bula do kit Hydragel 4 IF da Sebia
- Bula do kit Hydragel 54 Protein(e) da Sebia
- Bula do kit Hydragel 7 Hemoglobin(e) da Sebia
- Bula do Mini API. BioMérieux
- Bulas da Abbott Laboratories, Diagnostics Division dos reagentes utilizados no equipamento Architect c8000.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz fundamentals of Clinical Chemistry. 6<sup>th</sup> ed. London: Saunders; 2008.
- Cástera L, Pawlotsky JM. Diagnosis and Monitoring of Viral Hepatitis. BioMérieux
- Compendium Urinalysis - Urinalysis with Test Strips. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH. 2008
- Cunha ML: Manual da Qualidade do Serviço de Patologia Clínica IPOLFG. 2011.
- Instruções de trabalho do Laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Instruções de trabalho do Laboratório de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Instruções de trabalho do Laboratório de Virologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Jacobs DS, DeMott WR, Oxley DK. Jacobs & DeMott Laboratory text handbook. 5th ed. Cleveland: Lexi-Comp, Inc; 2001.
- Johnson AM, Ritchie RF, Ledue TB. Protein Learning Guide. USA: Abbott Laboratories, Diagnostics Division; 2004
- Kaltzmann JA, Kyle RA, Benson J, Larson DR, Snyder MR, Lust JA, Rajkumar SV, Dispenzieri A. Screening panels for Detection of Monoclonal Gammopathies. Clin Chem. 2009; 55: 1517-22
- Kaltzmann JA. Screening algorithm for Monoclonal Gammopathies. Clin Chem. 2008; 54:1753-5
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby Immunology. 6<sup>th</sup> ed. W.H.Freeman & Co Ltd; 2006

- McPhee SJ. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine. 5<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Higher Education; 2005.
- Métodos de ensaio do Laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Métodos de ensaio do Laboratório de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Métodos de ensaio do Laboratório de Virologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG
- Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999
- Murray PR, Baron EL, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology, 1999.
- Prieto Valtueña, J.M, Balcells. La Clínica y el Laboratorio. 20<sup>a</sup> ed. Masson; 2006.
- qPCR Technical Guide. Sigma-Aldrich; 2008
- Rapidlab Analisador de pH/gases sanguíneos 348 - Manual do operador. Bayer HealthCare LLC. 2003
- Reed R. Learning Guide Clinical Chemistry. USA: Abbott Laboratories, Diagnostics Division. 2010
- Slides das aulas das disciplinas de Imunologia, Bioquímica Clínica I, Bioquímica Clínica II, Virologia, Bacteriologia, Micologia, Parasitologia, leccionadas no Mestrado em Análises Clínicas 2009-2011.
- Spicer JW. Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica. 1<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan; 2002.
- Strasinger S, Diloranzo M. Urinalysis and Body Fluids. 5<sup>th</sup> ed. F.A Davis Company; 2008
- Thomas L. Proteins in Clinical and Laboratory Medicine. Siemens Editions.
- Bula do Vitek 2. BioMérieux.
- Bio-Rad [Internet]. [Citado a 15 Jun 2011]. Disponível de: <http://www.bio-rad.com/>
- Struthers JK, Westran RP. Clinical Bacteriology. London: Manson Publishing; 2003;

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FÁRMACIA**



**MONOGRAFIA:  
TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DA FENILCETONÚRIA**

**ORIENTAÇÃO:**  
Professora Doutora Isabel Maria Antolin M. C. Croce Rivera

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

*Catarina Carapucinha Cabeçadas*

**LISBOA, 2011**

## Resumo

A fenilcetonúria (*Phenylketonuria* - PKU) é um erro do metabolismo da fenilalanina, de hereditariedade autossômica recessiva, que resulta de uma deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase (*phenylalanine hydroxylase* – PAH). A PKU e as hiperfenilalaninémias associadas (*hyperphenylalaninaemia* – HPA) são causadas por mutações no gene da PAH, localizado no cromossoma 12q23.2. A PKU não tratada associa-se a um fenótipo anómalo, que varia de acordo com o genótipo do doente e pode manifestar-se através de atraso no crescimento, microcefalia, convulsões e atraso mental e intelectual. No entanto, desde a introdução dos programas de rastreio neonatal e devido à intervenção dietética, as crianças afectadas têm a possibilidade ter uma vida relativamente normal.

A frequente desistência da dieta verificada, principalmente, na adolescência e vida adulta conduziu a uma crescente investigação de novas estratégias terapêuticas, algumas já aplicadas na prática clínica. O rastreio pré-natal seguido de genotipagem é também visto como uma opção para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos fenilcetonúricos, pois permitirá a aplicação de uma dieta mais personalizada.

Embora haja um grande interesse e desenvolvimento nesta área, é necessária ainda uma melhor compreensão das bases, bioquímicas, genéticas e moleculares da PKU de maneira a ultrapassar esses obstáculos, providenciando um melhor tratamento aos doentes fenilcetonúricos.

## **Abstract**

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive inborn error of phenylalanine metabolism resulting from deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH). Most forms of PKU and hyperphenylalaninaemia (HPA) are caused by mutations in the *PAH* gene on chromosome 12q23.2. Untreated PKU is associated with an abnormal phenotype, that varies according with the patient genotype and it can include growth failure, microcephaly, seizures and global developmental and intellectual delay. However, since the introduction of newborn screening programs and with early dietary intervention, children born with PKU can expect to lead relatively normal lives.

The verified frequent discontinuance of the diet, mostly in adolescence and adult life, lead to a growing research of new therapeutic strategies, some are already applied in the clinical use. The prenatal screening followed by genotyping is also seen like an option to improve the quality of life of the phenylketonuric individuals because it will allow the application of a more personalized diet.

Although there is a great deal of interest and development in this area, it is still needed a better understanding of the biochemistry, genetics and molecular basis of PKU to overcome these obstacles, providing a better treatment for the phenylketonuric patients.

## ÍNDICE

|                                                      |     |
|------------------------------------------------------|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS                                    | 193 |
| LISTA DE ABREVIATURAS                                | 194 |
| 8. INTRODUÇÃO                                        | 195 |
| 9. HISTÓRIA                                          | 197 |
| 10. BIOQUÍMICA DA FENILCETONÚRIA                     | 199 |
| 10.1. Metabolismo da Fenilalanina                    | 200 |
| 10.2. Fenilalanina Hidroxilase – propriedades e gene | 202 |
| 11. PATOGÉNESE DA FENILCETONÚRIA                     | 205 |
| 12. FENILCETONÚRIA MATERNA                           | 206 |
| 13. RASTREIO E DIAGNÓSTICO                           | 208 |
| 13.1. Métodos de Rastreio                            | 208 |
| 13.2. Diagnóstico                                    | 210 |
| 13.3. Rastreio Pré-Natal                             | 212 |
| 13.4. Diagnóstico Molecular                          | 212 |
| 14. TRATAMENTO                                       | 213 |
| 14.1. Restrição Dietética                            | 213 |
| 14.2. Terapia com BH <sub>4</sub>                    | 216 |
| 14.3. Terapia de Substituição Enzimática             | 218 |
| 14.4. Terapia com Aminoácidos Neutros Grandes        | 219 |
| 14.5. Terapia Génica                                 | 221 |
| 15. FENILCETONÚRIA EM PORTUGAL                       | 223 |
| 16. CONCLUSÃO                                        | 225 |
| BIBLIOGRAFIA                                         | 227 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 – Metabolismo da fenilalanina e principais vias de entrada e saída da fenilalanina                            | 199 |
| Figura 2 – Biossíntese e regeneração do cofactor tetra-hidrobiopterina e hidroxilação dos aminoácidos aromáticos. .... | 200 |
| Figura 3 – Metabolismo da Fenilalanina .....                                                                           | 201 |
| Figura 4 – Estrutura do gene <i>PAH</i> humano .....                                                                   | 203 |
| Figura 5 – Exemplo de um cartão para gotas de sangue seco usado para a colheita de sangue de recém-nascidos.....       | 209 |
| Figura 6 – Algoritmo para um resultado de fenilalanina elevada no rastreio de recém-nascidos .....                     | 211 |
| Figura 7 – Saqueta de PKU gel. ....                                                                                    | 216 |
| Figura 8 – Saqueta de PKU Express.....                                                                                 | 216 |
| Figura 9 – Dicloridrato de sapropterina.....                                                                           | 217 |
| Figura 10 – Degradação da fenilalanina. ....                                                                           | 218 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 6-PT** - 6-piruvoíl-tetra-hidropterina (*6-pyruvil tetrahydrobiopterin*)
- 6-PTS** - 6-piruvoíl-tetra-hidropterina sintetase (*6-pyruvil tetrahydrobiopterin synthase*)
- ACMG** - Colégio Americano de Genética Médica (*American College of Medical Genetics*)
- APOFEN** - Associação Portuguesa de Fenilcetonúria
- BH<sub>2</sub>** - Di-hidrobiopterina
- BH<sub>4</sub>** - Tetra-hidrobiopterina (*Tetrahydrobiopterin*)
- DHFR** - Dihidrofolato Redutase (*Dihydrofolate Reductase*)
- DHPN** - Di-hidroneopterina-trifosfato (*Dihydoneopterin triphosphate*)
- DHPR** - Di-hidropterina Redutase (*Dihydropterin Reductase*)
- DNA** - Ácido desoxirribonucleíco (*Deoxyribonucleic acid*)
- EUA** – Estados Unidos da América
- GTP** - Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)
- GTPCH** - GTP ciclo-hidrolase (*Guanosine triphosphate cyclohydrolase*)
- HPA** - Hiperfenilalaninémia (*Hyperphenylalaninemia*)
- LCR** – Líquido Cefalorraquidiano
- LNAA** - Aminoácidos neutros grandes (*Large neutral amino acid*)
- NADH** - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)
- NADPH** – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)
- OMIM** - Online Mendelian Inheritance in Man
- PAH** - Fenilalanina hidroxilase (*Phenylalanine hydroxylase*)
- PAL** - Fenilalanina Amónia Liase (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*)
- PEG-PAL** - Fenilalanina Amónia Liase pegilada
- PKU** - Fenilcetonúria (*Phenylketonuria*)
- rAAV** - Vírus do Tipo Adenovírus Recombinantes (*Recombinant Adeno-Associated Viral*)
- RFLP** - Padrões de Restrição Polimórficos (*Restriction fragment length polymorphism*)
- RNA** - Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
- TRH** - Triptofano Hidroxilase (*Tryptophan Hydroxylase*)
- TYH** - Tirosina Hidroxilase (*Tyrosine Hydroxylase*)

## 1. INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria e as hiperfenilalaninémias com ela relacionadas, constitui o mais comum dos erros hereditários do metabolismo dos aminoácidos. Trata-se de uma doença genética autossômica recessiva, cuja incidência é de 1:13.500 a 1:19.000, nos Estados Unidos da América (1). A fenilcetonúria é também a primeira doença metabólica na qual um agente tóxico, a fenilalanina, foi identificado como a causa de atraso mental e cujo tratamento foi reconhecido por prevenir os sintomas clínicos (2). A sua causa primária é a existência de mutações no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1), uma enzima hepática responsável pela hidroxilação de fenilalanina em tirosina. As mutações (mais de 500 até agora detectadas) ocorrem no *PAH* gene, localizado no cromossoma 12q23.2, e resultam numa diminuição ou ausência de actividade da PAH (3). A deficiente actividade catalítica desta enzima provoca acumulação de fenilalanina no organismo, que se reflecte num aumento dos seus níveis plasmáticos e diminuição dos níveis de tirosina. Consequentemente, a fenilcetonúria, quando não tratada, caracteriza-se por um profundo atraso mental, intelectual e físico, microcefalia e convulsões (4, 5).

A detecção precoce dos recém-nascidos afectados é possível através de um sistema de rastreio neonatal, instituído na maioria dos países desenvolvidos desde a década de 80 (6). Após um resultado positivo no rastreio, é necessário realizar um teste de diagnóstico a fim de classificar a fenilcetonúria, com vista a aplicar o tratamento mais apropriado. A fenilcetonúria causada pela deficiência em PAH apresenta uma grande heterogeneidade fenotípica devido à natureza das mutações (7), o que se vai reflectir em diferentes concentrações de fenilalanina no sangue dos doentes. Os níveis plasmáticos de fenilalanina permitem assim a classificação dos diferentes fenótipos: PKU clássica ([fenilalanina] >1200  $\mu\text{mol/L}$ ), PKU moderada ([fenilalanina] = 600-1200  $\mu\text{mol/L}$ ), hiperfenilalaninémia moderada não-PKU ([fenilalanina] >600  $\mu\text{mol/L}$ ) (8).

Os doentes fenilcetonúricos têm tido a possibilidade de ter uma vida relativamente normal, ausente de sintomas clínicos, desde o aparecimento da terapia dietética há 60 anos (4). A dieta da PKU consiste numa restrição do consumo de proteínas naturais de maneira a minimizar a ingestão de fenilalanina. Esta condição dietética pode ser conseguida através de comidas especializadas e suplementos suficientes de aminoácidos essenciais, energia vitaminas e minerais (9). De maneira a evitar o atraso mental, a dieta deve ser iniciada logo nas primeiras semanas de vida (5) e por isso o rastreio neonatal é essencial para a identificação precoce destes doentes. O tratamento deve ser mantido durante toda a vida uma vez que a

hiperfenilalaninémia nos adultos tem sido associada a dificuldades na atenção e concentração, instabilidade de humor e degeneração na matéria branca (1) (10). Durante a gravidez, os níveis de fenilalanina moderadamente altos na mãe pode causar microcefalia, atraso mental e doença cardíaca congênita no feto (11), resultando no síndrome de PKU materna.

O tratamento com base na restrição dietética, apesar da sua eficácia na prevenção do atraso mental, tem algumas desvantagens como o risco de desnutrição, grandes custos quer económicos quer sociais para o doente e a família, para além de se ter observado que mesmo os doentes tratados apresentam algum atraso nas suas funções neurológicas (12). Assim, não é de surpreender a frequente desistência da dieta que se verifica a partir, principalmente, da adolescência (9) (13). Por estas razões, nas últimas décadas, tem-se verificado uma crescente procura de alternativas à restrição dietética com vista a aumentar a qualidade de vida dos doentes fenilcetonúricos. Esta procura tem passado por fórmulas medicinais de melhor sabor (14), suplementação de aminoácidos grandes e neutros (15), novas terapias farmacológicas, como é o caso da terapia com  $BH_4$  (16) e terapias de substituição (17). A necessidade de um diagnóstico mais precoce e específico de modo a aplicar um tratamento mais personalizado também tem sido alvo de investigação nos últimos anos, sendo estes os dois temas principais da monografia.

## 2. HISTÓRIA

A fenilcetonúria clássica foi detectada pela primeira vez pelo médico norueguês Asbjørn Følling (Figura 2-1), em 1934 (18). A descoberta aconteceu quando a mãe de duas crianças, ambas com atraso mental, perguntou a Følling se o odor bolorento da urina das crianças poderia estar relacionado com o seu atraso mental. Suspeitando que o cheiro pudesse estar relacionado com a excreção de acetoacetato, Følling testou a urina com cloreto férrico, usado na pesquisa de corpos cetónicos. O resultado foi uma coloração verde escura, em vez da cor púrpura esperada. Após não ter chegado a quaisquer conclusões com este resultado, o médico procedeu a análises químicas mais detalhadas, envolvendo extracção orgânica, purificação e determinação da temperatura de fusão do composto em estudo, identificando a substância como sendo ácido fenilpirúvico (18).

Følling decidiu proceder a análise de 430 amostras de urina de doentes com atraso mental, provenientes de algumas instituições locais, acabando por obter um resultado semelhante ao anterior em oito desses doentes (18). Følling publicou as suas descobertas e sugeriu o termo “*imbecillitas phenylpyruvica*” para descrever a doença (19). Em 1937, George Jervis sugeriu o termo “*phenylpyruvic oligophrenia*” que, ainda no mesmo ano, foi substituído por “fenilcetonúria”, sugerido pelo geneticista britânico Lionel Penrose, que justificou a sua escolha com a presença característica do ácido fenilpirúvico na urina (20). Esta designação foi amplamente aceite e perdura até hoje. No mesmo ano, a PKU foi associada à disfunção da enzima fenilalanina hidroxilase por George Jervis,

Na terceira década após a descoberta de Følling, entre 1954 e 1964, centrou-se no tratamento e na detecção precoce da doença. Bickel, médico alemão, verificou que a ausência de fenilalanina na dieta dos doentes conduzia a melhorias no estado geral dos doentes, inclusivamente a nível mental (21). Em 1956, é identificada, pela primeira vez, a PKU materna como a síndrome correspondente a grávidas que apresentem níveis elevados de fenilalanina no sangue, concebendo crianças com microcefalia e atraso mental, embora sem hiperfenilalaninémia (22). O teste de Guthrie, desenvolvido por Robert Guthrie, em Buffalo, surge na década de 60 (23). O teste de Guthrie consiste num teste de rastreio de PKU em massa para recém-nascidos, preciso e barato, feito a partir de uma porção de sangue colocada num papel de filtro (24). Nos EUA, é iniciado o rastreio em massa de recém-nascidos usando o teste de Guthrie e em 1967, já 37 estados dos EUA tinham leis sobre o rastreio neonatal para a PKU (24). Ainda na mesma década, vários programas de rastreio neonatal surgiram em todo o mundo com o objectivo de se realizar um diagnóstico e tratamento precoces a fim de evitar

o atraso mental em doentes fenilcetonúricos. A fenilcetonúria torna-se assim um protótipo de diagnóstico genético.

Em 1983 o gene que codifica para a PAH humana é isolado, clonado e mapeado no cromossoma 12 por Savio Woo (25). Após 10 anos, é criado um rato fenilcetonúrico geneticamente alterado, por David McDonald e Alexandra Shedolovsky (26). Este modelo permite assim o desenvolvimento de estudos eticamente impossíveis em humanos.

Em 2007, surge o primeiro fármaco (Kuvan, BioMarin), aprovado pela FDA, responsável por baixar os níveis de fenilalanina no sangue de alguns doentes fenilcetonúricos (27). Em 2009, a BioMarin inicia um estudo usando a enzima fenilalanina amónia liase (PEG-PAL) como terapia de substituição.

A descoberta da PKU por Asbjørn Følling foi um marco importante na história da medicina, tornando a PKU um modelo de demonstração dos efeitos neurológicos que os erros metabólicos podem ter e de como a terapêutica pode alterar drasticamente as manifestações da doença. Por outro lado, o desenvolvimento do teste de Guthrie e a restrição dietética levaram à prevenção do atraso mental nas crianças com PKU de todo o mundo. Além disso, a fenilcetonúria tem sido usada como modelo para a descoberta de mais de 200 erros metabólicos.

### 3. BIOQUÍMICA DA FENILCETONÚRIA

A fenilalanina, apesar de existir sob a forma de enantiómeros D e L, é na forma L (L-phe) que se torna um aminoácido essencial e importante na dieta humana para a síntese de proteínas (28). Tal como acontece com outros metabolitos, a fenilalanina encontra-se sujeita a mecanismos reguladores que permitem apenas pequenas oscilações das concentrações de fenilalanina nos diferentes tecidos, promovendo assim a homeostasia da fenilalanina. As concentrações de fenilalanina, apesar de diferentes nos vários compartimentos biológicos, são mantidas num estado estacionário. Este estado resulta de um balanço entre: mecanismos de aporte, exógenos através da dieta e endógenos através da *pool* de aminoácidos livres e de polipéptidos; e mecanismos de eliminação que envolvem a incorporação da fenilalanina em proteínas, a sua oxidação em tirosina e a sua conversão em metabolitos menores (29) (Figura 1). Um distúrbio num destes mecanismos pode levar a um desequilíbrio e conduzir a uma doença metabólica, a fenilcetonúria.

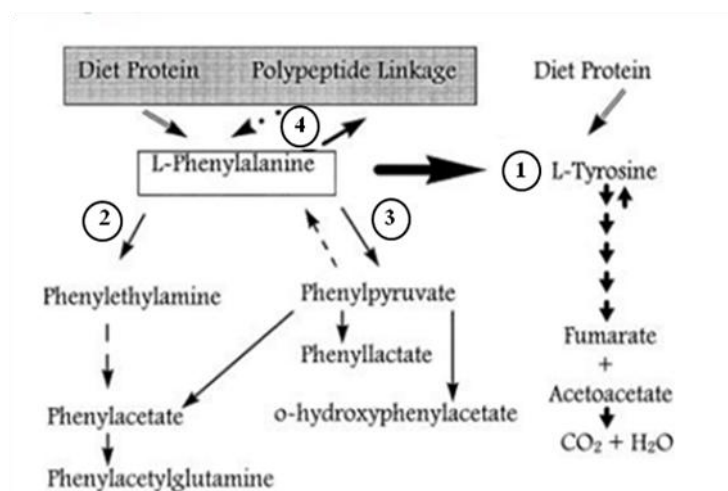


Figura 59 – Metabolismo da fenilalanina e principais vias de entrada e saída da fenilalanina. 1 - Via de saída através da hidroxilação para a tirosina (reação catalisada pela PAH, seguida de oxidação); 2 – Via de saída através da descarboxilação para feniletilamina; 3 – Via de saída através de transaminação para fenilpiruvato; 4 - Via de saída através da incorporação de fenilalanina em pools de polipéptidos. Adaptado de (29)

A fenilcetonúria e as variantes de hiperfenilalaninémia têm origem num bloqueio do sistema de hidroxilação (discutido posteriormente). Este bloqueio pode ser ao nível da enzima fenilalanina hidroxilase ou ao nível da regeneração e síntese do cofactor tetrahidrobiopterina. No organismo, existem outras hidroxilases cujo cofactor é  $\text{BH}_4$  e que actuam sobre outros aminoácidos, nomeadamente, a tirosina e triptofano (Figura 2). A tirosina hidroxilase catalisa a hidroxilação do triptofano em 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA), um importante

Diagnóstico e Tratamento da Fenilcetonúria

neurotransmissor e precursor da epinefrina e norepinefrina. A triptofano hidroxilase catalisa a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano, um precursor da serotonina.

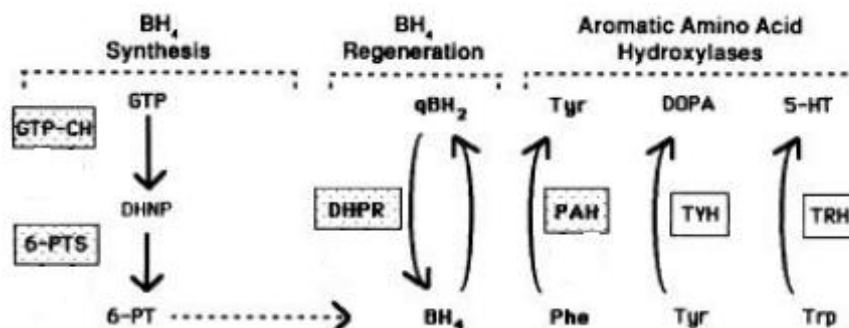


Figura 60 – Biossíntese e regeneração do cofator tetra-hidrobiopterina e hidroxilação dos aminoácidos aromáticos. GTP – Guanosina trifosfato (Guanosine triphosphate); GTPCH – GTP ciclo-hidrolase (Guanosine triphosphate cyclohydrolase); DHNP - dihidroneopterin-trifosfato (dihydoneopterin triphosphate); 6-PTS – 6- piruvil-tetra-hidropterina sintetase (6 - pyruvil tetrahydrobiopterin synthase); 6-PT - 6- piruvil-tetra-hidropterina (6 - pyruvil tetrahydrobiopterin); DHPR-di-hidropterina redutase (dihydropterin reductase); BH<sub>2</sub> – di-hidrobiopterina; TYH – tirosina hidroxilase (tyrosine hydroxylase); TRH- triptofano hidroxilase (tryptophan hydroxylase)

Assim, uma deficiência ao nível da PAH conduz apenas a elevação dos níveis de fenilalanina no sangue, designando-se esta doença de fenilcetonúria. Por outro lado, uma deficiência ao nível do cofator BH<sub>4</sub> provoca não só aumento das concentração plasmáticas de fenilalanina como também uma síntese deficiente dos neurotransmissores, catecolaminas e serotonina, levando a sintomas neurológicos graves, designando-se esta situação de PKU maligna.

### 3.1. Metabolismo da Fenilalanina

A fenilalanina pode sofrer metabolização por três vias: hidroxilação a tirosina, transaminação e descarboxilação (Figura 3).

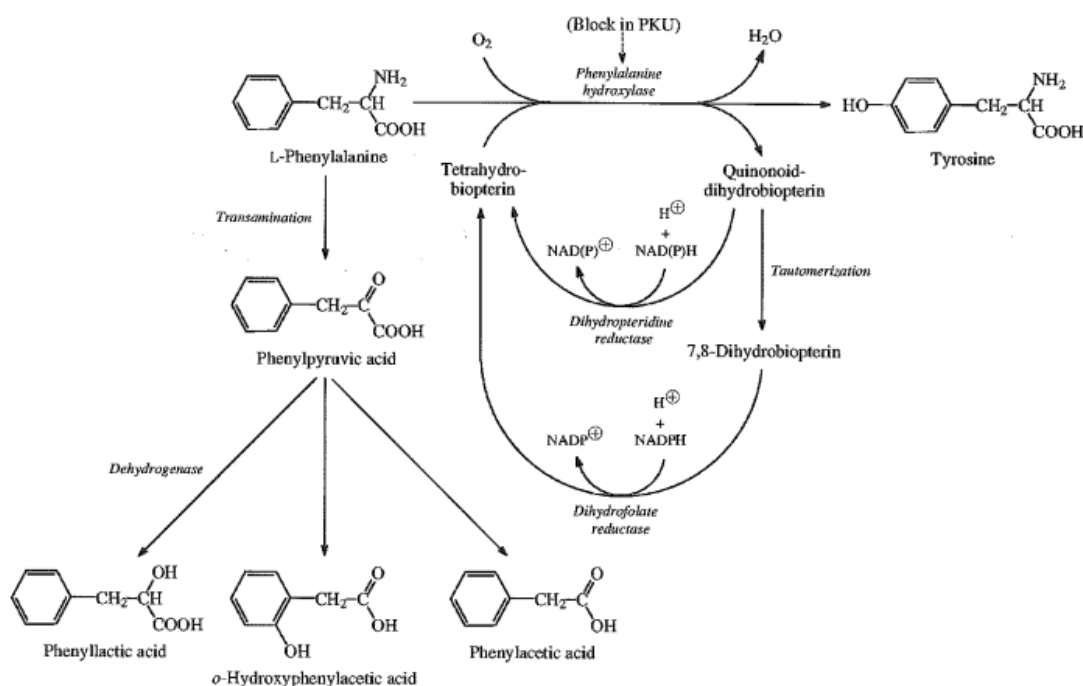


Figura 61 – Metabolismo da Fenilalanina. Fonte: (30)

O sistema de hidroxilação da fenilalanina em tirosina (31) ocorre no fígado e depende dos seguintes componentes:

- Enzima fenilalanina hidroxilase (PAH);
- Cofactor de natureza não proteica tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ );
- Enzimas usadas na regeneração do  $BH_4$ : dihidropteridina redutase (DHPR) e 4 $\alpha$ -carbinolamina desidratase.

A fenilalanina é convertida em tirosina por acção da PAH, que necessita do cofactor  $BH_4$  para exercer a sua actividade catalítica (32). Durante a reacção, a  $BH_4$  é inicialmente convertido em 4- $\alpha$ -carbinolamina e, seguidamente, em di-hidrobiopterina quinonóide, conversão catalisada pela 4- $\alpha$ -carbinolamina desidratase (33). A  $BH_4$  é regenerada a partir da forma quinonóide por acção da DHPR, sendo usado NADH como coenzima. Na ausência de DHPR, a di-hidrobiopterina quinonóide rearranja-se de uma forma não enzimática em 7,8-dihidrobiopterina, a qual é convertida a  $BH_4$ , por acção da dihidrofolato redutase (DHFR) (34), usando como coenzima NADPH.

A hidroxilação da fenilalanina é um passo obrigatório e limitante na via catabólica da fenilalanina, que conduz inicialmente à formação do aminoácido não-essencial tirosina e, seguidamente, à oxidação a dióxido de carbono e água. O catabolismo da fenilalanina fornece ainda dois compostos, um cetogénico (acetoacetato) e outro gluconeogénico (fumarato)

(Figura 1), contribuindo para a *pool* de metabolitos de 2 carbonos e como fonte de glucose, respectivamente (29). Deste modo, o catabolismo da fenilalanina tem um papel relevante na função e desenvolvimento cerebral normal, visto ser uma fonte de glucose, metabolito vital para o cérebro. Além disso, o metabolismo da fenilalanina constitui também uma fonte endógena de tirosina, que se pode tornar em aminoácido essencial quando ocorre uma alteração nesta via, como é o caso da fenilcetonúria.

No caso da fenilcetonúria, esta via encontra-se comprometida conduzindo a uma acumulação de fenilalanina de tal maneira que a via fica sem capacidade de resposta, condição que ocorre nas formas mais graves da doença. O organismo, para contornar esta situação, promove a metabolização da fenilalanina por uma das vias alternativas. A via prioritária a seguir à hidroxilação é a transaminação, que resulta na formação de fenilpiruvato, fenilactato, e hidroxifenilacetato, que são excretados na urina. Esta via é restrita à metabolização da cadeia lateral de alanina, sem que ocorra qualquer alteração do anel aromático, como se verifica na via de hidroxilação (35). A via de transaminação não é completamente funcional no bebé prematuro nem na fase inicial da doença e é induzida pelo substrato, ou seja, ocorre apenas quando há acumulação de fenilalanina (29).

A terceira via de metabolização da fenilalanina consiste na sua descarboxilação em feniletilamina. No entanto, não é uma via importante para a eliminação do excesso de fenilalanina uma vez que os inibidores da monoamino oxidase bloqueiam o metabolismo posterior da feniletilamina (36).

As taxas de eliminação da fenilalanina, pelas vias metabólicas alternativas, diferem entre genótipos idênticos e influenciam o fenótipo de PKU (37).

### 3.2. Fenilalanina Hidroxilase – propriedades e gene

Como referido anteriormente, a fenilcetonúria pode ser causada por mutações no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase. A fenilalanina hidroxilase é maioritariamente expressa no fígado (para além do rim e pâncreas) e catalisa irreversivelmente a hidroxilação da fenilalanina em tirosina (31).

A PAH é uma proteína oligomérica que requer ferro e oxigénio molecular assim como o cofactor pterina,  $\text{BH}_4$ , para a sua actividade catalítica. A PAH é constituída por subunidades com idêntica estrutura primária e em solução existe numa mistura de tetrâmeros e dímeros, tendo cada subunidade uma massa molecular de 50 kDa (38). O  $K_m$  aparente da enzima para a fenilalanina, na presença de  $\text{BH}_4$ , é de  $50\mu\text{M}$  (39).

A enzima possui diferentes domínios funcionais: o domínio regulador contém um resíduo de serina, envolvido na sua activação por fosforilação; o domínio catalítico contém um motivo de cerca de 27 aminoácidos responsável pela ligação ao cofactor pterinínico; o domínio C-terminal pensa-se estar relacionado com a ligação inter-subunidades (38).

A PAH é extremamente sensível a variações na concentração de fenilalanina. Esta sensibilidade assegura que a exposição dos tecidos a altas concentrações de fenilalanina seja mínima e assegura que a hidroxilação de fenilalanina em tirosina não conduza a uma depleção da fenilalanina de maneira a comprometer a síntese proteica (29). Este equilíbrio é conseguido através dos seguintes mecanismos de regulação: activação/inactivação alostérica causada pela interacção com o substrato fenilalanina ou com o cofactor BH<sub>4</sub>, respectivamente (29); activação/desactivação por processos de fosforilação/desfosforilação, catalisados por acção da proteína cinase cAMP-dependente (29, 40).

O gene *PAH* encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 12, na região 12q23.2, ocupa cerca de 171,266 pb de DNA genómico e estrutura-se em 13 exões (40, 41). O mensageiro tem cerca de 2,4 kb, constituindo 2,9 % da sequência genómica e codifica um polipéptido de 452 aminoácidos (Figura 4) (29).

O gene humano da *PAH* apresenta uma grande variação alélica tendo sido já descobertas 528 nos 13 exões do gene e nas regiões que o ladeiam (3).

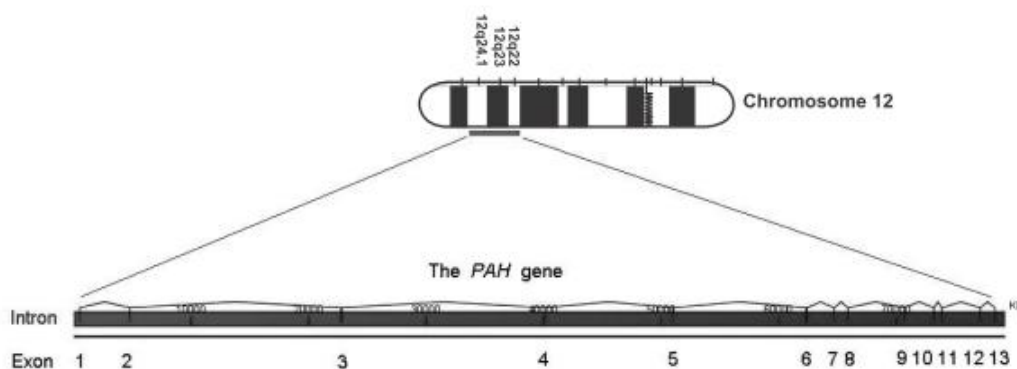


Figura 62 – Estrutura do gene *PAH* humano. Fonte: (42)

As mutações podem ser de vários tipos (29):

- Mutações *missense*: 62% dos alelos PAH;
- Pequenas e grande deleções: 13%;
- Defeitos de *splicing*: 11%;
- Polimorfismos silenciosos: 6%;

- Mutações *nonsense*: 5%
- Inserções: 2%

Algumas mutações são mais graves que outras, dependendo do seu efeito na estrutura e função da enzima. No entanto, o efeito destas no fenótipo do indivíduo é variável (43), não havendo ainda um consenso se, por exemplo, existe ou não uma correlação entre o quociente de inteligência do indivíduo fenilcetonúrico e o seu genótipo *PAH* (44) (45). Vários estudos relacionam a gravidade das mutações com as taxas de hidroxilação da fenilalanina na maioria dos indivíduos (46). No entanto, existem excepções relacionadas com o facto de a actividade da *PAH* depender do cofactor  $\text{BH}_4$  (47), pelo que há genótipos que respondem melhor a um tratamento com  $\text{BH}_4$  que outros (48), fenómeno discutido no capítulo 7.

#### 4. PATOGÉNESE DA FENILCETONÚRIA

A PKU quando não tratada, como se verifica nalguns casos de abandono da terapêutica na adolescência (9) apresenta um fenótipo anómalo que inclui microcefalia, deficiência no crescimento, convulsões (29), um atraso intelectual e mental profundo, distúrbios motores, problemas na atenção e percepção (49), verificando-se também alguns comportamentos alterados como hiperactividade e agressividade (50).

Clinicamente, o principal efeito da hiperfenilalaninémia no fenótipo da PKU ocorre a nível do desenvolvimento e função cerebrais. Os mecanismos propostos para explicar esta acção patogénica são os seguintes: hipomielinização e desmielinização; um efeito nos processos de transporte e distribuição de metabolitos no cérebro; efeitos nos processos neuroquímicos e metabólicos.

A primeira hipótese baseia-se no facto de elevados níveis de fenilalanina inibirem uma via metabólica essencial dos oligodendrócitos, comprometendo a produção e manutenção de mielina por parte destes (50). A mielina parece influenciar o desenvolvimento axonal, durante o qual ocorre a produção de neurotransmissores. Por outro lado, a fenilalanina pode diminuir a produção das aminas neurotransmissoras, dopamina, noradrenalina e serotonina, cujos precursores são a tirosina e triptofano. O excesso de fenilalanina pode provocar a inibição competitiva da tirosina e triptofano hidroxilases, conduzindo a uma deficiente produção das aminas (51). Outra hipótese baseia-se no facto de os aminoácidos neutros grandes (*Large Neutral Amino Acids* - LNAA) e a fenilalanina partilharem o mesmo transportador de barreira hemato-encefálica. Assim, numa situação de hiperfenilalaninémia, a competição pelo transportador vai provocar uma diminuição no transporte dos LNAA pela barreira, afectando a síntese proteica no cérebro. No entanto, nenhuma destas hipóteses consegue explicar por si só, o fenótipo cerebral evidenciado pelos doentes fenilcetonúricos.

## 5. FENILCETONÚRIA MATERNA

A fenilcetonúria materna é um problema conhecido há muito tempo mas adquiriu especial atenção quando a primeira geração sujeita ao rastreio neonatal atingiu a idade gestacional. O síndrome da fenilcetonúria materna trata-se então de uma embriopatia/fetopatia que afecta crianças nascidas de mães hiperfenilalaninémicas, que não seguiram um controlo metabólico durante a gravidez. As crianças apresentam este síndrome independentemente do seu genótipo pois, uma vez que a fenilcetonúria é uma doença autossómica recessiva, todas as crianças nascidas de mães fenilcetonúricas possuem pelo menos 1 gene mutado no *locus PAH*, herdado da mãe homozigótica. A criança será homozigótica ou heterozigótica (portador) para a fenilcetonúria, dependendo do genótipo do pai.

Esta patologia é consequência de um excesso de fenilalanina intrauterina no compartimento fetal devido a um gradiente transplacentário positivo (52). A razão feto:mãe média para a hiperfenilalaninémia materna é de 1,5 tendo-se, contudo, registado valores que variam desde 1,1 a 2,9, o que torna difícil prever o valor plasmático de fenilalanina do feto a partir do valor correspondente da mãe (29). Assim, o tratamento pré-concepcional terá como objectivo a manutenção dos valores de fenilalanina o mais próximo possível do normal e o mais cedo possível na gravidez. Os valores recomendados são de 100-360µmol/L (53).

A fenilcetonúria materna tem uma grande relevância clínica na medida em que está provado que altas concentrações de fenilalanina são teratogénicas e aumentam o risco de aborto (54). Além disso, constatou-se que as crianças e/ou fetos, que nascem de mães hiperfenilalaninémicas não tratadas, apresentam atraso no crescimento intra-uterino, dismorfismo facial, baixa estatura, microcefalia, doença cardíaca congénita, anomalias ósseas e atraso intelectual (53, 55, 56).

A prevenção torna-se assim o caminho correcto a seguir. Tem-se constatado que a implementação de uma dieta restrita em fenilalanina, iniciada antes da concepção e mantida até ao parto, promove o nascimento de uma criança mental, psicológica e fisicamente normal, a partir de uma mulher hiperfenilalaninémica (57-59). A normalização dos níveis de fenilalanina no sangue deve ocorrer antes da concepção e os valores medidos semanalmente (29). Este controlo metabólico é essencial principalmente no 1º trimestre uma vez que este corresponde ao período de menor tolerância materna à fenilalanina e de maior desenvolvimento dos órgãos fetais. No segundo e terceiro trimestres verifica-se um aumento da tolerância devido ao aumento da síntese proteica e, provavelmente, de uma maior capacidade do feto heterozigótico em metabolizar a fenilalanina (29). Além disso, um estudo

demonstrou que mulheres que engravidam durante uma dieta não restrita sentem maiores dificuldades em conseguir um bom controlo metabólico durante o resto da gravidez (57). Torna-se então certo que as mulheres com fenilcetonúria devem iniciar uma dieta restrita em fenilalanina antes da concepção, a fim de melhorar o crescimento cerebral e neurológico do feto (57).

A fenilcetonúria materna bem como a fenilcetonúria clássica resultam em atraso mental, como já foi referido. No entanto, o mecanismo responsável por este fenótipo nas duas patologias parece ser distinto uma vez que um dos sintomas da fenilcetonúria materna é a microcefalia, enquanto na hiperfenilalaninémia pós-natal o mesmo não acontece. Assim, apesar dos efeitos da fenilcetonúria clássica serem, possivelmente mediados pela redução na função das células gliais, como já foi referido anteriormente, o atraso mental e a microcefalia no feto parecem estar relacionados com a reduzida proliferação de astrócitos, provocada pelo excesso de metabolitos de fenilalanina, tais como ácido fenilacético, ácido fenil-láctico, ácido fenilpirúvico, ácido hidroxifenilacético, feniletilamina e ácido mandélico (60).

Apesar dos esforços, a fenilcetonúria materna continua a ser um grande desafio pois existem factores não biológicos, que nem sempre são fáceis de contornar, como o nível socioeconómico e educacional, a adesão ao tratamento, a qualidade do apoio emocional e psicológico da mulher em tratamento bem como o ambiente pós-natal para a criança (20). A solução para estes problemas requer a identificação de obstáculos, sociais, comportamentais e políticos que poderá conduzir a reestruturações dos serviços de saúde, formação de pessoal especializado no cuidado de adultos com doenças metabólicas hereditárias, bem como uma educação adequada da mulher desde a infância, a fim de dar a conhecer a doença e a necessidade de uma dieta restrita antes da concepção (57, 61). Além disso, tem-se verificado que não existe uma correlação simples entre o fenótipo intelectual de doentes fenilcetonúricos e o seu genótipo devido, provavelmente, a factores ambientais e outros genes que possam contribuir para o fenótipo clínico (43, 57), o que poderá influenciar a fenilcetonúria materna.

## 6. RASTREIO E DIAGNÓSTICO

Os objectivos do rastreio neonatal e do diagnóstico da hiperfenilalaninémia são a intervenção médica precoce e correcta, respectivamente, de doenças que seriam detectadas apenas com o aparecimento de manifestações irreversíveis ou mesmo da morte. A detecção e intervenção precoces conduziram, nos últimos anos, a uma eliminação ou diminuição da mortalidade e das incapacidades associadas a estas doenças (24, 62), pois a fenilcetonúria, apesar de relativamente rara, tem uma morbilidade significativa (63). A introdução do rastreio neonatal veio alterar muito o prognóstico da doença, permitindo que muitas das crianças e adultos fenilcetonúricos sejam mental e fisicamente normais. O prognóstico depende da idade em que é diagnosticada a doença e iniciado o tratamento mas também do tipo de mutação no gene *PAH*. Actualmente, crê-se que cerca de 95-100% da população dos países desenvolvidos, está coberta pelo rastreio neonatal (62, 64).

Os valores de fenilalanina no sangue dos recém-nascidos fenilcetonúricos apenas começam a aumentar após a separação da placenta. Segundo o *American Academy of Pediatrics Committee on Genetics*, as determinações de fenilalanina plasmática devem ser feitas entre o 2º e o 4º dia de vida (65). Caso seja dada alta antes das 24 horas de vida do recém-nascido, é recomendado uma colheita inicial no hospital e uma repetição ao fim de 7-21 dias de vida (65).

### 6.1. Métodos de Rastreio

O rastreio neonatal é uma actividade de saúde pública que teve início na década de 60 graças ao Dr. Robert Guthrie, que desenvolveu um teste de diagnóstico para a fenilcetonúria – Teste de Guthrie (23). O teste é feito partir de uma pequena porção de sangue colhida do calcanhar do recém-nascido e depositada num papel de filtro (Figura 5) (23). O método original é simples e baseia-se numa inibição bacteriana: uma cultura padrão de *Bacillus subtilis* incubada em agar na presença de um antagonista da fenilalanina ( $\beta$ -2-tienilalanina) que impede o crescimento bacteriano. Quando os discos de sangue seco são postos em contacto com o agar, a presença de fenilalanina supera a inibição do crescimento bacteriano, permitindo a determinação de excesso de fenilalanina através do crescimento bacteriano (23).

**NSW Newborn Screening Programme**

Baby's last name \_\_\_\_\_

Mother's full name \_\_\_\_\_

Baby's date of birth \_\_\_\_\_ Sex M / F

Birth weight \_\_\_\_\_ g Gestation \_\_\_\_\_ weeks

Date of sample \_\_\_\_\_ Test less than 48 hr [ ]

Feeds: Breast / Formula / Soy based / TPN / Other \_\_\_\_\_

Hospital/Sample source \_\_\_\_\_

Paediatrician/Doctor in charge \_\_\_\_\_

Figura 63 – Exemplo de um cartão para gotas de sangue seco usado para a colheita de sangue de recém-nascidos. Fonte: (30)

O teste tem como vantagens ser barato, simples e fiável pois o sangue seco no papel de filtro é estável durante anos, apresentando uma taxa de erro baixa (29). Apesar destas vantagens, a baixa precisão para níveis baixos de fenilalanina é uma limitação, levando ao aparecimento de falsos negativos (66). Nos últimos anos, este método foi sendo substituído por outros mais eficazes como métodos enzimáticos, cromatográficos, fluorimétricos e, mais recentemente, a espectrometria de massa, que medem o conteúdo em fenilalanina das amostras de sangue colhidas em papel de filtro (29).

Actualmente, a tendência é a mãe e o recém-nascido permanecerem no hospital o menos tempo possível depois do parto de modo a diminuir os custos com os cuidados de saúde. Esta condição, juntamente com o facto do método microbiológico apresentar uma taxa de falsos negativos significativa (67), conduziu à necessidade de métodos mais sensíveis e rápidos sem conduzir ao aumento de resultados falsos positivos (63). Assim, a espectrometria de massa tornou-se o método de rotina para os testes de rastreio, substituindo os métodos anteriormente descritos (63). Além disso, com a espectrometria de massa é possível fazer o rastreio de mais de 25 doenças genéticas num só ensaio (63, 68), tais como: hipotireoidismo congénito, homocistinúria, tirosinémia, galactosémia, hemoglobinopatias, fibrose quística, distrofia muscular de Duchenne, hiperlipidémia familiar fazem também parte das doenças que são possíveis determinar no rastreio neonatal (69). Este método é altamente sensível, rápido e eficaz em amostras de recém-nascidos apenas com 24 horas de vida sem aumentar a taxa de resultados falsos positivos (70).

A taxa de casos não diagnosticados do rastreio neonatal para a fenilcetonúria clássica é muito pequena (1 em 70 casos) (62). Os resultados falsos negativos podem ser causados por erros no procedimento (62) ou mesmo ter causas biológicas como é o caso de hiperfenilalaninémia não-PKU (62, 67). Além disso, os resultados podem ser enviesados devido a contaminação da amostra com ampicilina, nutrição parentérica, suplementação de aminoácidos ou variação entre lotes dos papéis de filtro (29).

## 6.2. Diagnóstico

Um resultado positivo do teste identifica um recém-nascido com hiperfenilalaninémia e o teste de diagnóstico identifica o fenótipo metabólico através da quantificação dos níveis plasmáticos da fenilalanina que devem ser inferiores a 150uM nos recém-nascidos e a 120 uM nos restantes doentes (29). Embora alguns casos correspondam a hiperfenilalaninémias transitórias, sem consequências clínicas posteriores (por exemplo a deficiência em 4 $\alpha$ -carbinolamina desidratase transitória), ou resultarem de hiperfenilalaninémia materna, cerca de 98% dos casos de hiperfenilalaninémia é causada por mutações no *locus PAH* (29). Alguns alelos *PAH* causam um fenótipo PKU, no qual a concentração de fenilalanina no sangue excede os 600uM (10,5 mg/dL) enquanto outros alelos causam hiperfenilalaninémia não-PKU no qual os valores de fenilalanina se encontram abaixo de 600uM (29). A distinção destes fenótipos é importante, uma vez que hiperfenilalaninémia não-PKU não causa danos neurológicos, ao contrário da PKU clássica. Os restantes 2% correspondem a hiperfenilalaninémia causada por deficiente síntese e regeneração do cofactor tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (71), em que os doentes são tratados de maneira diferente dos doentes fenilcetonúricos, de modo a compensar a deficiência em BH<sub>4</sub>.

A identificação da deficiência em fenilalanina hidroxilase como causa da hiperfenilalaninémia, ou seja, exclusão da deficiência em BH<sub>4</sub>, pode ser feita através das seguintes determinações:

- Teor urinário em metabolitos pterínicos (biopterina total e neopterina) (72); O cofactor BH<sub>4</sub> pode também ser determinado a partir do sangue seco dos cartões de Guthrie (73). Os níveis de BH<sub>4</sub> encontram-se abaixo do normal no plasma, LCR e urina dos doentes com deficiência no cofactor enquanto a razão neopterina:biopterina apresenta um valor dentro dos parâmetros normais no caso das hiperfenilalaninémias provocadas pela deficiência em PAH (29).

- Actividade enzimática da dihidropterina redutase (DHPR) a partir do sangue seco do papel de filtro (74). A deficiência em BH<sub>4</sub> pode ser devido a uma síntese deficiente na enzima DHPR (Figura 2), encontrando-se esta abaixo do normal nos casos de hiperfenilalaninémia causada pela deficiência no cofactor e em níveis normais na hiperfenilalaninémia causada por uma mutação no gene *PAH*. A determinação desta enzima pode então permitir diferenciar os dois tipos de hiperfenilalaninémia (75).
- Níveis de neurotransmissores (76). Os níveis, no LCR, de ácido homovanílico e ácido 5-hidroxi-indoleacético (derivados da tirosina e do triptofano, respectivamente) estão diminuídos nas doenças relacionadas com a síntese e regeneração de BH<sub>4</sub>.

Na figura seguinte encontra-se um algoritmo para o diagnóstico diferencial acima descrito, recomendado pelo *American College of Medical Genetics, ACMG*.



Figura 64 – Algoritmo para um resultado de fenilalanina elevada no rastreio de recém-nascidos. Adaptado de (77)

### 6.3. Rastreio Pré-Natal

O diagnóstico pré-natal é uma alternativa ao rastreio neonatal e consiste na caracterização genotípica do feto através da análise de DNA fetal, com a condição de já haver um filho fenilcetonúrico na família (78). O DNA fetal pode ser obtido a partir de amniócitos; vilosidades coriônicas, tendo em conta que estas podem estar contaminadas com tecidos maternos; ou ainda de sangue fetal, caso a cultura dos amniócitos não seja bem sucedida (78). Caso as mutações de ambos os alelos mutados do paciente fenilcetonúrico já estejam identificadas, é feita a pesquisa das mesmas no DNA fetal. Quando isto não é possível, procede-se ao estabelecimento do haplotipo através da identificação dos padrões de restrição polimórficos (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* – RFLP) do *locus PAH* de ambos os pais e a sua associação com a mutação (40, 79). Até agora os RFLPs usados são: Bgl II, Pvu II(a), Pvu II(b), Eco RI, Msp I, Xmn I, Hind III, Eco RV, assim como um VNTR no sítio Hind III (80, 81).

### 6.4. Diagnóstico Molecular

O rastreio e diagnóstico da PKU pode ser feito também ao nível do genótipo, através da identificação de mutações no DNA do doente. A análise de mutações no gene *PAH* pode ser especialmente útil no diagnóstico pré-natal e na detecção de portadores, como é referido posteriormente. Actualmente, é usada uma grande variedade de técnicas de genética molecular, tais como *southern blotting*, digestão com enzimas de restrição, análise de heteroduplex, electroforese em gel com gradiente desnaturante, *chemical cleavage of mismatch*, hibridização com oligonucleótidos específicos de alelos e RT-PCR (29). Existem diversos tecidos usados como fonte de DNA, tais como sangue venoso, sangue seco a partir dos cartões de Guthrie, células da cavidade bucal e fibroblastos (29, 82).

A análise de DNA tem grande potencial por possibilitar a correspondência entre o genótipo e o fenótipo através da determinação da actividade enzimática de PAH, permitindo um melhor prognóstico e a implementação de uma dieta mais personalizada, de acordo com o grau de deficiência em PAH (83, 84).

## 7. TRATAMENTO

A fenilcetonúria, além de ser uma doença genética hereditária, pode ser também considerada uma doença nutricional por depender do teor de um aminoácido essencial, a fenilalanina, encontrado numa dieta normal. O tratamento clássico da hiperfenilalaninémia é a normalização das concentrações de fenilalanina no sangue, através de uma dieta restrita ou pobre em fenilalanina, a fim de prevenir os danos psicológicos e neurológicos, característicos desta doença. No entanto, devido à dificuldade em manter a dieta na adolescência e vida adulta têm surgido várias alternativas, como substituintes proteicos, terapia com tetra-hidrobiopterina, substituição enzimática, uso de aminoácidos grandes neutros e terapia genica.

Os substituintes proteicos com hidratos de carbono, gordura, vitaminas e minerais são normalmente os substituintes de eleição (9) pois são fáceis de preparar e asseguram a quantidade certa de vitaminas e minerais prescritos. No entanto, estes substituintes são altamente calóricos e é necessário consumir um grande volume para atingir a dose adequada de aminoácidos (9).

Estudos demonstram que chaperones farmacológicos constituem uma abordagem terapêutica realista uma vez que são capazes de restaurar a actividade da PAH quando o gene apresenta mutações menos graves (16).

A relevância do *misfolding* de proteínas em doenças hereditárias levou ao aparecimento de novas estratégias terapêuticas com base na estabilização da conformação proteica ou na restauração a função de algumas vias metabólicas. Uma delas é o BH4, recentemente aprovado pela FDA e EMEA (27).

O modo de actuação da BH4, na deficiência de PAH não está relacionado com a acção do cofactor mas sim com a estabilização da proteína ao desacelerar a agregação e a degradação e reduzindo a hidrofobicidade da proteína (85)

### 7.1. Restrição Dietética

O tratamento com base na dieta pobre em fenilalanina permite o controlo dos níveis deste aminoácido no sangue a fim de prevenir os danos neurológicos e, consequentemente, melhorar o desempenho psicológico e neurológico e (86), uma vez que se sabe que as manifestações clínicas características, como a deficiência mental e intelectual na fenilcetonúria, são devido à acumulação de fenilalanina ou um dos seus metabolitos (2, 87).

No entanto, antes de iniciar o tratamento, é aconselhado que a hipótese de deficiência em tetra-hidrobiopterina seja excluída.

O tratamento óptimo deve ser: iniciado o mais cedo possível após o nascimento; mantido para o resto da vida mesmo durante a concepção e gravidez em mulheres fenilcetonúricas; restrição do consumo de fenilalanina a pequenas quantidades, de maneira a manter os seus níveis no sangue o mais perto possível do normal, mas o suficiente para garantir a normal síntese proteica (a restrição excessiva pode comprometer o bom desenvolvimento e crescimento) (1, 88). A altura correcta para iniciar a dieta ainda não é de consenso geral mas alguns profissionais concordam que a dieta deve ser iniciada ao fim de 7-10 dias de vida para recém-nascidos que apresentem níveis de fenilalanina superiores a 10 mg/dL (1). A importância do seguimento da dieta para o resto da vida deve-se ao facto de, a sua interrupção, conduzir à deterioração na capacidade de aprendizagem e concentração, resultante de um desenvolvimento de doença neurodegenerativa da matéria branca e, no caso das grávidas com PKU, teratogénese com deficiência no desenvolvimento fetal, microcefalia, atraso mental e doença cardíaca congénita, designado síndrome de PKU materna (como discutido anteriormente) (13, 87). A restrição dietética inicia-se com pequenas quantidades de fenilalanina proveniente do leite materno ou de fórmulas comercializadas adequadas (42). Em crianças mais velhas o consumo de proteína diário é calculado, dependendo das concentrações de fenilalanina no plasma e o controlo metabólico é conseguido através da ingestão de pequenas quantidades de fenilalanina através do consumo de comidas medicinais, fontes de proteínas medicinais, produtos modificados de baixo teor proteico bem como de vegetais e frutas (pobres em fenilalanina) (1, 89). A monitorização é feita através de determinações periódicas de fenilalanina no sangue juntamente com uma análise do consumo e estado nutricional (1).

A tolerância à fenilalanina (200-500 mg/dia) tem uma variação quer interindividual quer intrafamiliar, ou seja, doentes com o mesmo genótipo mutante de *PAH* apresentam tolerâncias diferentes, mesmo dentro da mesma família, o que dificulta o tratamento (45). Isto pode dever-se à influência do estado metabólico e de saúde de cada doente. O exercício físico, crescimento, gravidez e infecções são exemplos de factores que podem alterar as necessidades de fenilalanina pelo que, a dieta deve ser calibrada para cada doente de modo a que: os metabolitos de fenilalanina não atinjam níveis tóxicos e; o consumo de outros aminoácidos seja suficiente para as necessidades metabólicas do doente.

Os valores óptimos de fenilalanina no sangue ainda não são consensuais. A política britânica, por exemplo recomenda valores de fenilalanina no sangue de 2-6 mg/dL para

crianças (1). Estes são também os valores recomendados para crianças menores de 12 anos nas clínicas dos Estados Unidos, sendo recomendado os valores de 2-10 mg/dL para pessoas com idade superior aos 12 anos. Por outro lado, o *German Working Group for Metabolic Diseases* recomenda que os valores de fenilalanina no sangue devem ser mantidos no intervalo de 0,7-4 mg/dL até aos 10 anos, 0,7-15 mg/dL para idades compreendidas entre os 10 e 15 anos e 0,7-20mg/dL para pessoas maiores de 15 anos (1).

A composição da dieta sofreu poucas alterações desde a sua introdução na década de 50. Consiste numa dieta pobre em proteínas suplementada com uma mistura de aminoácidos, sem fenilalanina, minerais, vitaminas e outros nutrientes (1). Para os doentes fenilcetonúricos, alimentos como leite, produtos lácteos, carne, ovos, trigo, feijão, milho e lentilhas são proibidos. O leite materno, frutas e vegetais devem ser consumidos controladamente (1, 9). A dieta é extremamente restritiva e difícil de manter especialmente, na adolescência e vida adulta (9, 90). No início da adolescência, o cumprimento da dieta torna-se complicado devido a um menor controlo parental, e ao surgimento de ocasiões sociais, em que os doentes fenilcetonúricos estão mais expostos a comidas proibidas e por isso a tentação é maior (9). Além disso, fazer as refeições na escola pode implicar discriminação por parte dos colegas por causa da dieta e das comidas proibidas. Isto aliado ao paladar desagradável da maior parte das comidas leva ao comprometimento da qualidade de vida e a adesão à dieta diminui com a idade do doente (89). Apesar dos esforços a nível clínico para encorajar a aceitação do tratamento, ainda existem poucas tentativas para avaliar os efeitos sociais de tal tratamento e, no final, depende do próprio indivíduo, a adesão à dieta de acordo com a sua percepção dos aspectos positivos e negativos relacionados com o cumprimento da mesma (13). Assim, a motivação pode ser o factor determinante na adesão à dieta e pode ser adquirida através de programas coordenados por equipas médicas, que impliquem uma formação, a fim de promover uma melhor compreensão da doença, as desvantagens do descontrolo ou interrupção da dieta e conhecimento de novas opções terapêuticas (9, 13). Como já referido, o controlo frequente de fenilalanina e a comunicação dos resultados podem ser uma maneira de encorajar o seguimento da dieta (13). O apoio na dieta como, por exemplo, dar a conhecer comidas alternativas de baixo conteúdo proteico ou receitas alternativas de acordo com a gastronomia local podem ser soluções viáveis para a discriminação social a que os doentes estão sujeitos. Por fim, é essencial assistência financeira e apoio psicológico tanto para os doentes como para as próprias famílias a fim de encorajar uma melhor aceitação do diagnóstico de PKU.

Outro problema inerente a este tratamento é o risco de deficiência nutricional em aminoácidos essenciais, colesterol, ácidos gordos e distúrbios no metabolismo dos folatos (28, 89, 91). Este problema tem sido contornado através do consumo de substituintes proteicos, ricos em aminoácidos e nos nutrientes deficitários (14, 92, 93). Apesar de, inicialmente, estes substituintes terem um paladar desagradável e terem de ser consumidos em grandes quantidades, essas características têm vindo a ser melhoradas nos últimos anos. Estes substituintes proteicos são, maioritariamente, indicados para doentes fenilcetonúricos adultos e existem principalmente em forma de pasta ou gel que deve ser tomada juntamente com água ou sumo (92). Como exemplo de substituintes proteicos temos as saquetas PKU Gel (Figura 7) e PKU Express (Figura 8), comercializadas pela Vitaflo (94). Ambos os produtos são de baixo volume, encontram-se disponíveis em vários sabores e contêm vitaminas, minerais, aminoácidos não essenciais e baixo teor em hidratos de carbono. (92).



Figura 65 – Saqueta de PKU gel. Fonte: (94)



Figura 66 – Saqueta de PKU Express. Fonte: (94)

Apesar do grande número de soluções disponíveis para melhorar a qualidade de vida do doente, a interrupção da dieta e desmotivação em retomá-la continua a ser recorrente, o que conduziu a uma emergente investigação de terapias alternativas, como será discutido seguidamente.

## 7.2. Terapia com $\text{BH}_4$

Nos últimos 30 anos, têm surgido estudos que demonstraram ser possível aumentar a tolerância à fenilalanina, não só em doentes com fenilcetonúria moderada, como também severa, após a administração do cofactor tetra-hidoxibiopterina  $\text{BH}_4$  (95-98). No entanto, estudos demonstraram que o fenótipo de fenilcetonúria severa apenas apresenta resposta

positiva à administração de BH<sub>4</sub>, caso o doente possua pelo menos uma mutação moderada é que responderão (95, 96).

A administração de BH<sub>4</sub> promove uma resposta positiva contínua neste subgrupo de doentes permitindo a eliminação de dieta como tratamento ou uma diminuição na restrição dietética, dependendo do seu genótipo (95-97, 99). Os mecanismos inerentes a esta resposta positiva parecem ser: estimular os alelos variantes que apresentam cinéticas que afectam a ligação de BH<sub>4</sub> à enzima PAH e; o cofactor actuar como chaperone, evitando o *misfolding* da PAH mutante e a sua degradação proteolítica, mantendo a enzima numa configuração activa (100-103)

A descoberta desta característica farmacológica incentivou a investigação e desenvolvimento de fármacos com base numa forma sintética de BH<sub>4</sub>, dicloridrato de sapropterina (16, 99, 104, 105). Um dos exemplos desses fármacos é o Kuvan, comercializado pela BioMarin Corporation e pela Merck-Serono (106), aprovado recentemente pela FDA e Comissão (105, 107, 108). O dicloridrato de sapropterina (Figura 9) é a versão sintética do cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Como já referido, para os indivíduos, como doentes *BH<sub>4</sub>-responsive*, a terapia com dicloridrato de sapropterina permite melhorar o controlo e até mesmo eliminar a necessidade de restrição dietética em indivíduos com formas muito moderadas de hiperfenilalaninémia, tornando-se assim uma alternativa à dieta viável e aliciente para muitos doentes. O Kuvan é comercializado em embalagens de comprimidos de 100 mg que podem ser tomados directamente ou dissolvidos em água (105, 106). Apenas doentes com idade igual ou superior a 4 anos e com resposta positiva para o teste de sobrecarga em BH<sub>4</sub> é que poderão tomar Kuvan (97, 107). O tempo de semi-vida médio da sapropterina em doentes fenilcetonúricos é de 6,7 horas e estudos indicam que é excretada na urina (105).

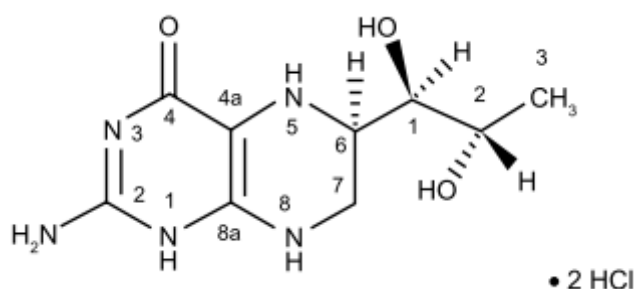


Figura 67 – Dicloridrato de sapropterina. Fonte: (105)

Apesar de a introdução deste fármaco no uso clínico representar uma grande evolução no tratamento da fenilcetonúria, não é acessível a todos os doentes devido aos seus custos elevados. O custo da terapia diária com dicloridrato de sapropterina na dose de 20mg/kg/dia, nos EUA, é de 100,000\$ a 150,000\$ por ano, enquanto a dieta é de 15,000\$ a 20,000\$ por ano (105).

### 7.3. Terapia de Substituição Enzimática

A enzima fenilalanina amónia liase (PAL) (EC 4.3.1.5) tem sido investigada nas ultimas décadas como potencial enzima para terapia de substituição enzimática (109-111), constituindo outra alternativa à terapêutica da fenilcetonúria. A PAL, com origem em bactérias ou leveduras, não necessita de cofactor e provou ser capaz de metabolizar a fenilalanina num derivado não tóxico, o ácido *trans*-cinâmico e numa pequena quantidade de amónia (Figura 10). A enzima degrada a fenilalanina no lúmen intestinal prevenindo a sua absorção.

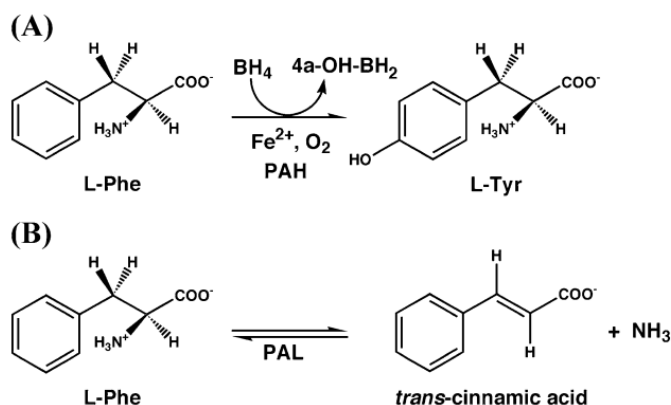


Figura 68 – Degradação da fenilalanina. Reacção catalisada por: (A) Fenilalanina Hidroxilase (PAH) e (B) Fenilalanina amónia liase. Fonte: (111)

No entanto foram observados três principais problemas na utilização de PAL (112, 113): necessidade de grande quantidade de PAL purificada com elevada actividade específica; por ser uma enzima tem de ser bem tolerada pelo organismo dos doentes fenilcetonúricos pois a administração repetida pode conduzir à produção de anticorpos contra PAL levando à eliminação da sua actividade catalítica e a reacções alérgicas; a enzima tem de ser estável em circulação para assegurar os efeitos terapêuticos por um longo período de tempo.

Muitas foram as vias estudadas e propostas para a administração de PAL a doentes fenilcetonúricos a fim de evitar os problemas acima descritos. Na década de 80, foi testada a

administração de PAL a doentes fenilcetonúricos por dois métodos: colocação de um reator ligado a circulação extracorpórea e ingestão oral de cápsulas de revestimento entérico (29). Apesar de os estudos terem sido breves e de curto âmbito foi possível observar uma queda modesta nos níveis plasmáticos de fenilalanina. Sarkissian et al. estudou o uso de enzima recombinante a partir de *R. toruloides* com o objectivo de diminuir os custos e aumentar a biodisponibilidade da enzima (114). Recentemente a pegilação (acoplamento covalente de moléculas de polietilenoglicol (PEG) à proteína de interesse) de PAL tornou-se uma via viável para eliminar a imunogenicidade da molécula e torná-la farmacologicamente viável (114-116). PEG-PAL mostrou ser uma molécula imunogenicamente inactiva, promovendo uma redução de fenilalanina 16 vezes maior que a PAL nativa, devido à sua alta estabilidade em circulação e com um tempo de semi-vida maior (112, 114, 115). O mecanismo reside no facto de a pegilação “mascarar” os epitopos imunogénicos de PAL e, consequentemente, diminuir a resposta imunológica (117).

Além da PAL, parece ser possível a terapia de substituição enzimática com PAH. Gamez et al. Relatou várias tentativas em produzir uma forma estável e não imunogénica da PAH viável para a terapia de substituição enzimática (115). Apesar de o uso de PAH em terapia de substituição enzimática implicar a administração do cofactor  $BH_4$ , a PAH apresenta grandes vantagens, como sejam a estabilidade após a sua pegilação e o facto da suplementação de tirosina ser dispensável.

Os avanços na terapia de substituição enzimática têm sido grandes. No entanto, ainda existem problemas por contornar relacionados com a estabilidade das enzimas, consistência na resposta e respostas imunológicas não desejadas.

#### **7.4. Terapia com Aminoácidos Neutros Grandes**

Como discutido anteriormente, um dos mecanismos propostos para a deterioração neuronal na PKU é a competição entre a fenilalanina e outros grandes aminoácidos neutros (*Large Neutral Amino Acid* - LNAA) para o transportador de aminoácidos do tipo L (118).

Na fenilcetonúria, a fenilalanina plasmática encontra-se em muito maior quantidade que os outros aminoácidos neutros pelo que pode impedir a ligação destes ao transportador e atravessar a barreira hemato-encefálica (118).

Os LNAA incluem tirosina, triptofano, treonina, metionina, valina, isoleucina, leucina e histidina (119). Nos indivíduos saudáveis todos, com excepção da tirosina, são aminoácidos essenciais. No entanto, como já referido, em indivíduos fenilcetonúricos, a tirosina torna-se

um aminoácido essencial. O facto de estudos terem observado que alguns doentes adolescentes em dieta apresentavam níveis reduzidos dos neurotransmissores serotonina e dopamina (120), cujos precursores são tirosina e triptofano, conduziu à investigação do uso de LNAA no tratamento da PKU. Constatou-se ser possível bloquear o influxo de fenilalanina através da barreira hemato-encefálica, mesmo com concentrações plasmáticas superiores a 1000umol/L, através da suplementação de LNAA (121, 122). O consumo de LNAA reduz os níveis de fenilalanina, não só no cérebro como também no sangue (123, 124), apesar de alguns autores não terem referido esse efeito (121, 122). Assim, os objectivos do tratamento com LNAA são: diminuição de concentrações de fenilalanina no cérebro (122), no sangue (124) e aumentar a síntese de neurotransmissores no cérebro (125) a fim de evitar danos neurológicos.

A suplementação de LNAA permite uma dieta com menor restrição e por isso tem a vantagem de possibilitar que os doentes mantenham uma vida socialmente activa com o normal acesso a actividades como a escola, trabalho, desportos e férias. Consequentemente, a adesão a este tratamento é maior que à restrição dietética simples.

Ao contrário da terapia com BH<sub>4</sub>, os LNAA diminuem as concentrações plasmáticas de fenilalanina em todos os doentes fenilcetonúricos (123). A terapia com LNAA demonstrou assim ser uma nova opção de tratamento de fenilcetonúria quando o tratamento de rotina com comidas especializadas de baixo teor proteico não é bem sucedido em diminuir os níveis de fenilalanina no sangue. No entanto, alguns autores defendem que o suplemento não é um substituto da dieta mas sim um complemento (124) e que, apesar de a suplementação reduzir os níveis de fenilalanina no sangue, a restrição dietética continua a ser a melhor intervenção para crianças a fim de evitar futuros danos neurológicos (125).

Como exemplos de LNAA comercializados existe os comprimidos PreKUnil e NeoPhe da Solace Nutrition (126). Estes comprimidos sem fenilalanina, são suplementados com vitaminas B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> e estão indicados para indivíduos fenilcetonúricos com idade superior aos 8 anos e podem ser tomados por indivíduos não tratados ou diagnosticados tardiamente. Não devem ser usados durante a gravidez. PreKUnil e NeoPhe permitem assim uma dieta mais relaxada com consumo moderado de comida natural reduzindo o consumo de produtos modificados de baixo teor proteico e, consequentemente, os custos inerentes a estes (126).

## 7.5. Terapia Génica

À semelhança do que acontece com outras doenças genéticas, também para a PKU a terapia génica tem sido alvo de investigação. A terapia génica, no caso da PKU, consiste na incorporação de um gene funcional de *PAH* no genoma das células hepáticas por ser o local de expressão da fenilalanina hidroxilase.

Para que esta metodologia seja bem sucedida é necessário: um clone de cDNA que produza uma proteína funcional (127); vectores que permitam uma transferência eficiente desse cDNA para as células alvo bem como a sua integração no genoma molecular (128-130); e um modelo animal que permita testar a sua eficiência (26, 131). O modelo animal foi conseguido através de mutagénese química de um ratinho com o agente alquilante N-etil-N-nitrososurea (ENU) (26). O resultado foi um ratinho hiperfenilalaninémico com uma mutação *missense* (F263S, designada de *Pah<sup>enu2</sup>*. Consequentemente, o ratinho *PAH<sup>enu2</sup>* tem muitas características fenotípicas comuns à fenilcetonúria humana, nomeadamente, atraso no crescimento, perímetro da cabeça menor que o normal, distúrbios comportamentais e PKU materna (26, 131).

O desenvolvimento do método mais eficaz para a transferência génica para o tratamento de PKU tem sido a prioridade. No entanto, o desenvolvimento de resposta imunitária aos vectores utilizados na transferência de cDNA para as células alvo e a dificuldade da sua integração no genoma nuclear e uma expressão génica sustentada têm sido um obstáculo para o avanço desta terapia (129, 132). Nos últimos anos, muitos têm sido os esforços para ultrapassar esses obstáculos e a expressão do cDNA de *PAH* já foi possível em muitas culturas de células de mamíferos. Peng et al conseguiu infectar hepatócitos de ratinhos infectados com retrovírus permitindo a expressão cDNA de *PAH* humana nestas células (133). Harding et al mostrou ser possível a expressão da *PAH* humana, com o auxílio do promotor de creatina cinase do músculo, em células do músculo cardíaco e esquelético de ratinhos mas não em células do fígado e dos rins (134). A expressão do gene *PAH* na medula óssea de ratinhos fenilcetonúricos, apesar de bem sucedida a nível molecular, não teve qualquer efeito no fenótipo metabólico (135). Cristiano et al. usou adenovírus recombinantes como vectores e conseguiu restabelecer a actividade hepática de *PAH* (10-80%) e normalizar os níveis plasmáticos de fenilalanina em ratinhos transgénicos com deficiência em *PAH* (129, 130). A integração nem sempre é estável, a expressão é transitória e a readministração do vector exprimindo o cDNA da *PAH* parece ser inactivada por uma resposta imunitária ao adenovírus. Os vectores adenovirais foram modificados para diminuir ou eliminar a expressão

dos genes adenovirais responsáveis por promover uma resposta imunitária mediada por linfócitos T (129).

Muitos foram os estudos com vectores virais do tipo adenovírus recombinantes (*recombinant adeno-associated viral* – rAAV) (135-137). Estes vectores mostraram ser promissores por possibilitarem a reconstituição da actividade da PAH hepática com reconstituição do fenótipo normal em ratinhos PKU<sup>enu2</sup>, incluindo redução da fenilalanina plasmática expressão do gene e uma resposta terapêutica prolongada (mais de 40 dias) (136), melhorias neuropatológicas (138), melhorias no comportamento e correcção da hipopigmentação (136).

A terapia génica é assim um tratamento promissor para a PKU, ainda que com muitos obstáculos relativamente à integração e expressão génica, por ultrapassar.

## 8. FENILCETONÚRIA EM PORTUGAL

Em Portugal, o rastreio neonatal iniciou-se em 1979 pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce da PKU, por iniciativa conjunta do Ministério da Saúde e do Instituto de Genética Médica para a PKU. Dois anos mais tarde, inicia-se o rastreio simultâneo do Hipotiroidismo Congénito, o primeiro alargamento do rastreio neonatal (139). Após divulgação dos objectivos do rastreio e discussão do modelo organizativo proposto, os distritos de Porto, Braga e Funchal foram os primeiros a apresentar taxas de cobertura significativas. Em 1986 a taxa de cobertura atingiu os 85%.

Em 1987, a Faculdade de Farmácia de Lisboa iniciou o estudo de exclusão de PKU maligna através do perfil de metabolitos pterínicos e da actividade de DHPR e, no ano seguinte, o Ministério da Saúde aprovou a comparticipação no custo dos alimentos hipoproteicos. Em 1992, um milhão de crianças tinha sido rastreado e em 1993, foi criada a Associação Portuguesa de Fenilcetonúria (APOFEN). A APOFEN foi criada com o objectivo de implementar um melhor relacionamento dos pais e doentes PKU portugueses com os dos outros países europeus.

O rastreio em Portugal é efectuado através do sangue colhido por picada no pé, actualmente entre o 3º e o 6º dia, para uma ficha com um papel de filtro adequado. Esta colheita de sangue pode ser efectuada nos vários Centros de Saúde do país. Desde 2005, o rastreio é realizado apenas por espectrometria de massa em *Tandem* (MS/MS) (140). Presentemente, o rastreio identifica 25 doenças: o Hipotiroidismo Congénito e 24 Doenças Hereditárias do Metabolismo, das quais 16 ligadas ao metabolismo das proteínas (140).

O rastreio em Portugal é voluntário e abrange actualmente cerca de 99% da população, com um tempo médio de início de tratamento de 11,2 dias após o nascimento (141). Em 2009, a prevalência para a PKU em Portugal foi de 1/16.635 com o rastreio de 6 novos casos em 99.809 recém-nascidos rastreados. Desde o início do programa até final de 2009 foram rastreados 3.003.159 recém-nascidos, tendo sido detectados cerca de 300 casos de PKU e HPA. A prevalência em Portugal, desde o início do Diagnóstico de Precoce até ao final de 2009, foi de 1/10.960 (142).

Na população Portuguesa, a mutação mais frequente é a IVS10nt-11G>A (143), sendo o que acontece em todos os países da orla mediterrânica. Seguidamente, a segunda mutação com maior expressão na nossa população é a R261Q (143), sendo uma das mais prevalentes a nível mundial. Com igual incidência, seguem-se as mutações R270K e V388M e a fechar o grupo das mutações mais frequentes na população Portuguesa temos a I65T, sendo uma das

cinco mais prevalentes mundialmente e que origina fenótipos desde formas clássicas às suaves (143).

Um estudo com 83 doentes fenilcetonúricos do sul de Portugal identificou 34 mutações, sendo os resultados semelhantes aos descritos anteriormente: IVS10nt-11G<A (14,6%), V388M (10,8%), R261Q (8,2%) e R270K (7,6%) (144). Das mutações identificadas, com excepção de R270K, todas tinham sido descritas noutras populações. A mutação R270K tinha apenas sido descrita nos Estados Unidos em indivíduos com ascendência Portuguesa (143, 144).

Cerca de metade das mutações identificadas na população do sul de Portugal pertencem a um grupo de 70 identificadas em doentes BH<sub>4</sub> – *responsive*, ou seja, respondem positivamente a uma terapia com BH<sub>4</sub>. Assim, Rivera et al concluiu que cerca de 30-35% dos doentes fenilcetonúricos do sul de Portugal podem ser tratados com BH<sub>4</sub> em combinação com uma dieta menos restrita ou, eventualmente, em monoterapia, contribuindo para uma melhoria na qualidade de vida dos doentes (144).

## 9. CONCLUSÃO

A fenilcetonúria é um erro metabólico hereditário de grande importância uma vez que permitiu uma melhor compreensão e identificação dos componentes genómicos inerentes à saúde e à doença e impulsionou a investigação relacionada com outros erros do metabolismo. A sua descoberta há 70 anos permitiu fazer a ligação entre a doença metabólica e o atraso intelectual e a investigação que surgiu após a sua descoberta permitiu demonstrar o quanto um tratamento, com base numa restrição em fenilalanina, é importante para que os indivíduos afectados pudessem ter uma vida relativamente normal, ausente de sintomas clínicos.

O ensaio de inibição bacteriana criado por Guthrie rapidamente conduziu ao desenvolvimento de programas de rastreio neonatal aceites e implementados a nível mundial. Presentemente, encontra-se em investigação a possível implementação do rastreio pré-natal com base na análise de RFLPs, que permitirá a detecção precisa de portadores de PKU e possibilitará que famílias em risco tenham conhecimento do diagnóstico pré-natal de gravidezes futuras.

O actual rastreio neonatal da PKU, a implementação precoce de uma dieta restritiva em fenilalanina e a possibilidade de evitar os danos cerebrais característicos da doença têm sido um grande sucesso. No entanto, as dificuldades em aderir a uma dieta rigorosa para a vida e a presença de défices neurológicos, apesar do tratamento, fizeram com que a busca de outros métodos terapêuticos fosse indispensável.

Nos últimos anos, verificou-se um crescimento exponencial na investigação de novas abordagens terapêuticas, à medida que os conhecimentos sobre a patogénese da doença foram aumentando. Actualmente, já existem muitas alternativas à restrição dietética mas, a sua aplicação clínica tem encontrado muitos obstáculos. No caso da terapia de substituição enzimática, ainda há muito que investigar de forma a melhorar a estabilidade das enzimas bem como aumentar a tolerância do organismo às mesmas. Por outro lado, a terapia com LNAA é vista como um suplemento e não uma substituição total da dieta restritiva. A terapia génica, apesar de bastante promissora, é um tratamento ainda com muitas características por melhorar, uma vez que se tem sentido dificuldades em produzir vectores que permitam uma transferência eficiente para as células alvo bem como a sua integração eficaz no genoma molecular. O uso da tetra-hidrobiopterina já se encontra clinicamente disponível mas não é possível a sua aplicação em todos os doentes fenilcetonúricos uma vez que depende do genótipo do doente.

Muitas questões sobre as terapias existentes continuam por ser respondidas e muito trabalho tem ainda de ser feito antes das novas tecnologias serem aplicadas no contexto clínico. De referir ainda que o sucesso do tratamento depende não só da sua eficácia, como também da aceitação pelo próprio indivíduo, pelos profissionais de saúde responsáveis pelo diagnóstico da PKU, pediatras, nutricionistas e profissionais de saúde mental, encarregados pelo supervisionamento da terapia e de um melhor aconselhamento do doente e família envolvente.

Assim, no futuro, após uma melhor compreensão das bases moleculares, bioquímicas e genéticas da PKU, várias terapias estarão disponíveis permitindo um tratamento mais personalizado, dependendo do genótipo de cada indivíduo e de outras condições como a idade e a gravidez.

**BIBLIOGRAFIA**

1. National Institutes of Health (NIH) to host a consensus development conference on screening and management for phenylketonuria (PKU). *Pediatric nursing*. 2000;26:539.
2. Woolf L, Griffiths R, Moncrieff A. Treatment of phenylketonuria with a diet low in phenylalanine. *Br Med J*. 1955;1:57-64.
3. PAH: Phenylalanine hydroxylase locus knowledgebase. [database on the Internet]. [citado a 5 Set 2011]. Available from: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>.
4. Alonso-Fernandez JR, Colon C. The contributions of Louis I Woolf to the treatment, early diagnosis and understanding of phenylketonuria. *J Med Screen*. 2009;16:205-11.
5. Armstrong M, Tyler F. Studies on phenylketonuria. I. Restricted phenylalanine intake in phenylketonuria. *J Clin Invest*. 1955;34:565-80.
6. Levy H, Albers S. Genetic Screening of Newborns. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:139-77.
7. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 1997;61:1309-17.
8. Hanley W. Adult phenylketonuria. *Am J Med*. 2004;117:590-5.
9. MacDonald A. Diet and compliance in phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 2000;159 Suppl 2:S136-41.
10. Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol Genet Metab*. 2010;101:99-109.
11. Levy HL, Waisbren SE, Guttler F, Hanley WB, Matalon R, Rouse B, et al. Pregnancy experiences in the woman with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatrics*. 2003;112:1548-52.
12. Gentile J, Ten Hoedt A, Bosch A. Psychosocial aspects of PKU: hidden disabilities - a review. *Mol Genet Metab*. 2010;99:S64-7.
13. Gassi  R CJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Cambra FJ, Fust  E. Do adult patients with phenylketonuria improve their quality of life after introduction/resumption of a phenylalanine-restricted diet. *Acta Paediatr*. 2003;92:1474-78.
14. MacDonald A, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall S, Rylance G, et al. Protein substitutes for PKU: what's new? *J Inherit Metab Dis*. 2004;27:363-71.

15. Ahring KK. Large neutral amino acids in daily practice. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2010 [Citado a 3 Nov 2011]. Disponível de: <http://www.springerlink.com/content/3748x52775308584/>
16. Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thony B, et al. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest*. 2008;118:2858-67.
17. Ding Z, Harding CO, Thony B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab*. 2004;81:3-8.
18. Folling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr*. 1994;407:4-10.
19. Christ S. Asbjørn Følling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci*. 2003;12:44-54.
20. Penrose L, Quastel J. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J*. 1937;31:266-74.
21. Bickel H, Gerrard J, Hickmans E. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuria child. *Acta Paediatr*. 1954;43:64-77.
22. Anónimo. Maternal phenylketonuria. *Br Med J*. 1970;4:192.
23. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963;32:338-43.
24. Guthrie R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. A personal history. *Eur J Pediatr*. 1996;155:S4-S5.
25. Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*. 1983;306:151-5.
26. Shedlovsky A, McDonald JD, Symula D, Dove WF. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics*. 1993;134:1205-10.
27. Biomarin [Internet]. [Citado a 15 Out 2011]; Disponível de: <http://www.bmrn.com/products/kuvan.php>.
28. Young VR, Pellett PL. Protein intake and requirements with reference to diet and health. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:1323-43.
29. Donlo J, Levy H, Scriver C. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Valle D, Beaudet A, Vogelstein B, Kinzler K, Antonarakis S, Ballabio A, et al., editors. *Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 2008.
30. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz fundamentals of Clin Chem*. 6th ed. ed. Philadelphia, Pa. ; [London]: Saunders; 2008. p. 952.

31. Kaufman S. The phenylalanine hydroxylating system. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1994;67:77-264.
32. Citron BA, Kaufman S, Milstien S, Naylor EW, Greene CL, Davis MD. Mutation in the 4a-carbinolamine dehydratase gene leads to mild hyperphenylalaninemia with defective cofactor metabolism. *Am J Hum Genet.* 1993;53:768-74.
33. Lazarus R, Benkovic S. Phenylalanine hydroxylase stimulator protein is a 4a-carbinolamine dehydratase. *J Biol Chem.* 1983;258:10960-62.
34. Kaufman S. Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *J Biol Chem.* 1967;242:3934-43.
35. Kaufman S. A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3160-4.
36. Rampini S, Völlmin J, Bosshard H, Müller M, Curtius H. Aromatic acids in urine of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia, and phenylketonuria before and after phenylalanine load. *Pediatr Res.* 1974;8:704-9.
37. Treacy E, Pitt JJ, Seller K, Thompson GN, Ramus S, Cotton RG. In vivo disposal of phenylalanine in phenylketonuria: a study of two siblings. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19:595-602.
38. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J.* 1995;311 ( Pt 2):353-66.
39. Ledley FD, Grenett HE, Woo SL. Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1987;262:2228-33.
40. Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:6221-5.
41. Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SL. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1992;31:8363-8.
42. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev.* 2008;29:31-41.
43. Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr.* 2002;140:502-6.
44. Kayaalp E, Treacy E, Waters P, Byck S, Nowacki P, Scriver C. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 1997;61:1309-17.

45. Ramus SJ, Forrest SM, Pitt DB, Saleeba JA, Cotton RG. Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet.* 1993;30:401-5.
46. Treacy EP, Delente JJ, Elkas G, Carter K, Lambert M, Waters PJ, et al. Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine oxidation rates in vivo: a pilot study. *Pediatr Res.* 1997;42:430-5.
47. Perez B, Desviat LR, Gomez-Puertas P, Martinez A, Stevens RC, Ugarte M. Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH4-responsive patients. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S11-6.
48. Spaapen LJ, Rubio-Gozalbo ME. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab.* 2003;78:93-9.
49. VanZutphen KH, Packman W, Sporri L, Needham MC, Morgan C, Weisiger K, et al. Executive functioning in children and adolescents with phenylketonuria. *Clin Genet.* 2007;72:13-8.
50. Dyer CA. Pathophysiology of phenylketonuria. *Dev Disabil Res Rev.* 1999;5:104-12.
51. Curtius HC, Niederwieser A, Viscontini M, Leimbacher W, Wegmann H, Blehova B, et al. Serotonin and dopamine synthesis in phenylketonuria. *Adv Exp Med Biol.* 1981;133:277-91.
52. Widaman KF. Phenylketonuria in Children and Mothers: Genes, Environments, Behavior. *Curr Dir Psychol Sci.* 2009;18:48.
53. Lee PJ, Ridout D, Walter JH, Cockburn F. Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97. *Arch Dis Child.* 2005;90:143-6.
54. American Academy of Pediatrics. Committee on G. American Academy of Pediatrics: Maternal phenylketonuria. *Pediatrics.* 2001;107:427-8.
55. Zaleski LA, Casey RE, Zaleski W. Maternal phenylketonuria: dietary treatment during pregnancy. *Can Med Assoc J.* 1979;121:1591-4.
56. Knerr I, Zschocke J, Schellmoser S, Topf HG, Weigel C, Dotsch J, et al. An exceptional Albanian family with seven children presenting with dysmorphic features and mental retardation: maternal phenylketonuria. *BMC Pediatr.* 2005;5:5.
57. Lee PJ, Lilburn M, Baudin J. Maternal phenylketonuria: experiences from the United Kingdom. *Pediatrics.* 2003;112:1553-6.
58. Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon K, Matalon R, Rouse B, et al. The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002. *Pediatrics.* 2003;112:1523-9.

59. Maillot F, Lilburn M, Baudin J, Morley DW, Lee PJ. Factors influencing outcomes in the offspring of mothers with phenylketonuria during pregnancy: the importance of variation in maternal blood phenylalanine. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:700-5.
60. Oberdoerster J, Guizzetti M, Costa LG. Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:295-301.
61. Clarke JT. The Maternal Phenylketonuria Project: a summary of progress and challenges for the future. *Pediatrics*. 2003;112:1584-7.
62. Routine neonatal screening for phenylketonuria in the United Kingdom 1964-78. Medical Research Council Steering Committee for the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981;282:1680-4.
63. Levy HL, Albers S. Genetic screening of newborns. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:139-77.
64. Streetly A, Grant C, Pollitt RJ, Addison GM. Survey of scope of neonatal screening in the United Kingdom. *BMJ*. 1995;311:726.
65. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics: New issues in newborn screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. *Pediatrics*. 1982;69:104-6.
66. Smith I, Cook B, Beasley M. Review of neonatal screening programme for phenylketonuria. *BMJ*. 1991;303:333-5.
67. Hanley WB, Demshar H, Preston MA, Borczyk A, Schoonheydt WE, Clarke JT, et al. Newborn phenylketonuria (PKU) Guthrie (BIA) screening and early hospital discharge. *Early Hum Dev*. 1997;47:87-96.
68. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem*. 1997;43:1129-41.
69. Seymour CA, Thomason MJ, Chalmers RA, Addison GM, Bain MD, Cockburn F, et al. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. *Health Technol Assess*. 1997;1:i-iv, 1-95.
70. Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin Chem*. 1998;44:2405-9.

71. Blau N, Barnes I, Dhondt JL. International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J Inher Metab Dis*. 1996;19:8-14.
72. Leeming RJ, Blair JA, Green A, Raine DN. Biopterin derivatives in normal and phenylketonuric patients after oral loads of L-phenylalanine, L-tyrosine, and L-tryptophan. *Arch Dis Child*. 1976;51:771-7.
73. Leeming RJ, Barford PA, Blair JA, Smith I. Blood spots on Guthrie cards can be used for inherited tetrahydrobiopterin deficiency screening in hyperphenylalaninaemic infants. *Arch Dis Child*. 1984;59:58-61.
74. Surplice IM, Griffiths PD, Green A, Leeming RJ. Dihydropteridine reductase activity in eluates from dried blood spots: automation of an assay for a national screening service. *J Inher Metab Dis*. 1990;13:169-77.
75. Niederwieser A, Ponzzone A, Curtius HC. Differential diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1985;8 Suppl 1:34-8.
76. Niederwieser A, Curtius HC, Wang M, Leupold D. Atypical phenylketonuria with defective biopterin metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin, screening and study of biosynthesis in man. *Eur J Pediatr*. 1982;138:110-2.
77. American College of Medical Genetics [Internet]. [citado a 20 Mai 2011]; Disponível de: <http://www.acmg.net>.
78. Cleary MA, Wraith JE. Antenatal diagnosis of inborn errors of metabolism. *Arch Dis Child*. 1991;66:816-22.
79. Chakraborty R, Lidsky AS, Daiger SP, Guttler F, Sullivan S, Dilella AG, et al. Polymorphic DNA haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria. *Hum Genet*. 1987;76:40-6.
80. Woo SL. Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet*. 1988;43:781-3.
81. Kozak L, Kuhrova V, Blazkova M, Romano V, Fajkusova L, Dvorakova D, et al. Phenylketonuria mutations and their relation to RFLP haplotypes at the PAH locus in Czech PKU families. *Hum Genet*. 1995;96:472-6.
82. McCabe ER, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum Genet*. 1987;75:213-6.
83. Guldberg P, Mikkelsen I, Henriksen KF, Lou HC, Guttler F. In vivo assessment of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene by phenylalanine loading: characterization of seven common mutations. *Eur J Pediatr*. 1995;154:551-6.

84. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998;63:71-9.
85. Pey A, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thony B, et al. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest.* 2008;118:2858-67.
86. Hanley W. Adult phenylketonuria. *Am J Med.* 2004;117:590-5.
87. Blainey JD, Gulliford R. Phenylalanine-restricted diets in the treatment of phenylketonuria. *Arch Dis Child.* 1956;31:452-66.
88. Koch R, Azen C, Friedman EG, Fishler K, Baumann-Frischling C, Lin T. Care of the adult with phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S90-2.
89. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:145-52.
90. Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet.* 2002;360:55-7.
91. Lucock M, Yates Z, Hall K, Leeming R, Rylance G, MacDonald A, et al. The impact of phenylketonuria on folate metabolism. *Mol Genet Metab.* 2002;76:305-12.
92. Macdonald A, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall SK, Rylance G, et al. Protein substitutes for PKU: what's new? *J Inherit Metab Dis.* 2004;27:363-71.
93. MacDonald A, Lilburn M, Davies P, Evans S, Daly A, Hall SK, et al. 'Ready to drink' protein substitute is easier for people with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:526-31.
94. Vitaflo [Internet]. [citado a 26 Nov 2011]; Disponível de: [www.vitaflo.co.uk](http://www.vitaflo.co.uk).
95. Hennermann JB, Buhrer C, Blau N, Vetter B, Monch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S86-90.
96. Michals-Matalon K, Bhatia G, Guttler F, Tying SK, Matalon R. Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin. *J Nutr.* 2007;137:1564S-7S; discussion 73S-75S.
97. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002;347:2122-32.

98. Perez-Duenas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gomez L, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2004;37:1083-90.
99. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2007;370:504-10.
100. Langenbeck U. Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:67-72.
101. Thony B, Ding Z, Martinez A. Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. *FEBS Lett.* 2004;577:507-11.
102. Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, et al. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16903-8.
103. Gersting SW, Lagler FB, Eichinger A, Kemter KF, Danecka MK, Messing DD, et al. Pahenu1 is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacological chaperone mechanism in vivo. *Hum Mol Genet.* 2010;19:2039-49.
104. Muntau AC, Gersting SW. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:649-58.
105. Harding CO. New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride. *Biologics.* 2010;4:231-6.
106. KUVAN, Prescription Medicine for PKU [Internet]. [citado 27 Nov 2011]; Disponível de: [www.kuvan.com](http://www.kuvan.com).
107. Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:700-7.
108. Burton BK, Nowacka M, Hennermann JB, Lipson M, Grange DK, Chakrapani A, et al. Safety of extended treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria: results of a phase 3b study. *Mol Genet Metab.* 2011;103:315-22.

109. Hodgins DS. Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J Biol Chem.* 1971;246:2977-85.
110. Sarkissian CN, Gamez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S22-6.
111. Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, et al. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol Ther.* 2004;10:220-4.
112. Ikeda K, Schiltz E, Fujii T, Takahashi M, Mitsui K, Kodera Y, et al. Phenylalanine ammonia-lyase modified with polyethylene glycol: potential therapeutic agent for phenylketonuria. *Amino acids.* 2005;29:283-7.
113. Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW. Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *J Biol Chem.* 1976;251:4646-50.
114. Sarkissian CN, Gamez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:20894-9.
115. Gamez A, Wang L, Straub M, Patch MG, Stevens RC. Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Mol Ther.* 2004;9:124-9.
116. Wang L, Gamez A, Sarkissian CN, Straub M, Patch MG, Han GW, et al. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2005;86:134-40.
117. Gamez A, Sarkissian CN, Wang L, Kim W, Straub M, Patch MG, et al. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol Ther.* 2005;11:986-9.
118. Hargreaves KM, Pardridge WM. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1988;263:19392-7.
119. van Spronsen FJ, de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:671-6.
120. Burlina AB, Bonafe L, Ferrari V, Suppiej A, Zacchello F, Burlina AP. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23:313-6.
121. Koch R, Moseley KD, Yano S, Nelson M, Jr., Moats RA. Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol Genet Metab.* 2003;79:110-3.

122. Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;103:1169-78.
123. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:732-8.
124. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Burlina AB, Burlina AP, Braga C, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:153-8.
125. Lykkelund C, Nielsen JB, Lou HC, Rasmussen V, Gerdes AM, Christensen E, et al. Increased neurotransmitter biosynthesis in phenylketonuria induced by phenylalanine restriction or by supplementation of unrestricted diet with large amounts of tyrosine. *Eur J Pediatr.* 1988;148:238-45.
126. Solace Nutrition [Internet]. [citato a 1 Dec 2011]; Disponível de: [www.solacenutrition.com](http://www.solacenutrition.com).
127. Ledley FD, Grenett HE, DiLella AG, Kwok SC, Woo SL. Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science.* 1985;228:77-9.
128. Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem.* 1987;262:4429-32.
129. Eisensmith RC, Woo SL. Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S16-9.
130. Cristiano RJ, Smith LC, Woo SL. Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:2122-6.
131. McDonald JD, Andriolo M, Cali F, Mirisola M, Puglisi-Allegra S, Romano V, et al. The phenylketonuria mouse model: a meeting review. *Mol Genet Metab.* 2002;76:256-61.
132. Ding Z HC, Thony B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab.* 2004;81:3-8.
133. Peng H, Armentano D, MacKenzie-Graham L, Shen RF, Darlington G, Ledley FD, et al. Retroviral-mediated gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase in primary mouse hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:8146-50.
134. Harding CO, Wild K, Chang D, Messing A, Wolff JA. Metabolic engineering as therapy for inborn errors of metabolism--development of mice with phenylalanine hydroxylase expression in muscle. *Gene Ther.* 1998;5:677-83.

135. Harding CO, Neff M, Jones K, Wild K, Wolff JA. Expression of phenylalanine hydroxylase (PAH) in erythrogenic bone marrow does not correct hyperphenylalaninemia in Pah(enu2) mice. *J Gene Med.* 2003;5:984-93.
136. Mochizuki S, Mizukami H, Ogura T, Kure S, Ichinohe A, Kojima K, et al. Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther.* 2004;11:1081-6.
137. Harding CO, Gillingham MB, Hamman K, Clark H, Goebel-Daghighi E, Bird A, et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* 2006;13:457-62.
138. Embury JE, Charron CE, Martynyuk A, Zori AG, Liu B, Ali SF, et al. PKU is a reversible neurodegenerative process within the nigrostriatum that begins as early as 4 weeks of age in Pah(enu2) mice. *Brain Res.* 2007;1127:136-50.
139. Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares M, Almeida MF, Carmona C, E M. Programa Nacional para o Diagnóstico Precoces - 20 anos de rastreio neonatal. *Arq Med.* 1999;13:163-8.
140. Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcao A, Fonseca H, Bogas M, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* [Internet]. 2010; [Citado a 19 Dec 2011]. Disponível de: <http://www.springerlink.com/content/68732705661765k6/>
141. Programa Nacional de Diagnóstico Precoces [Internet]. [citado a 19 Dec 2011]; Disponível de: <http://www.diagnosticoprecoces.org/>.
142. Relatório de Actividades do Diagnóstico Precoces de 2009. 2009.
143. Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Tavares de Almeida I, Rivera I. Fenilcetonúria Revisitada. *Arq Med.* 2006;20:161-72.
144. Rivera I, Mendes D, Afonso A, Barroso M, Ramos R, Janeiro P, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: Molecular epidemiology and predictable BH(4)-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S86-92.