

**A INTOXICAÇÃO POR ALUMÍNIO NOS
DOENTES EM HEMODIÁLISE
- UMA PERSPETIVA HISTÓRICA -**

Monografia do 2.º Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Análises Clínicas

Ana Isabel Magalhães Rodrigues

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor Agostinho Almeida

Setembro 2012

É autorizada a reprodução integral desta monografia apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

Em primeiro lugar ao Professor Doutor Agostinho Almeida pela disponibilização do tema, e pela prontidão com que aceitou orientar este trabalho.

Aos meus pais e irmão pelo apoio constante e incondicional.

A todos os meus amigos e colegas que durante estes meses sempre me incentivaram, acompanharam e suportaram em todos os momentos.

Em especial, à Ana, à Eli, à Moniquinha, ao Gustavo e ao Zé.

Resumo

O alumínio (Al) é um metal muito abundante na crosta terrestre. Por isso os seres humanos estão em constante contato com ele. No entanto, não possui funções biológicas conhecidas e, quando em excesso, leva a intoxicação, podendo nomeadamente causar elevada morbidade na população com doença renal crónica. Especialmente nos doentes em tratamento por hemodiálise.

Nestes doentes, no passado, para além dos alimentos e da água ingerida, a exposição a água para diálise contaminada com Al, os quelantes do fosfato e os antiácidos foram as maiores fontes adicionais. Atualmente estas fontes foram praticamente eliminadas. As principais complicações desenvolvidas nestes doentes eram demência de diálise, distrofia óssea e anemia microcítica, complicações que em alguns casos levaram mesmo até à morte. No entanto, desde os anos 80, com a substituição dos quelantes do fosfato contendo Al e com a melhoria dos processos de purificação da água, a incidência destas complicações diminuiu drasticamente.

Neste trabalho, e numa perspetiva histórica, é abordada a problemática da intoxicação por Al no doentes em hemodiálise e destacado o importante contributo que a evolução das técnicas instrumentais de análise, particularmente da espectrofotometria de absorção atómica com atomização eletrotérmica, ao tornar possível a determinação fiável das concentrações plasmáticas de Al, contribui para a resolução dos problemas associados à sua sobrecarga nos doentes em hemodiálise.

Palavras chave: insuficiência renal crónica, hemodiálise, Al, fontes de exposição, efeitos tóxicos.

Abstract

Aluminum (Al) is a very abundant metal in the earth's crust. Therefore, humans are permanently exposed to it. However, it does not have any known biological functions, and excessive exposure leads to intoxication, increasing morbidity in patients with renal disease, especially in those on hemodialysis.

In the past, the exposure to contaminated dialysis water, aluminium-based phosphate binders and antacids have been the largest sources of Al contamination amongst these patients, besides food and drinking water.

Nowadays these sources have been virtually eliminated.

The major complications for patients on hemodialysis were dialysis dementia, osteodystrophy and microcytic anemia, which in some cases lead to death. However, since the 1980's, with the replacement of aluminum-based phosphate binders and the improvement of water purification systems, the incidence of these complications has greatly decreased.

This monograph addresses, in a historical perspective, the issue of Al intoxication in hemodialysis patients and highlights the important contribution of the instrumental analytical techniques evolution, particularly the development of graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. By making possible the reliable determination of serum Al concentrations, it significantly contributed to solve the problems associated with its overload in patients on haemodialysis.

Keywords: end stage renal disease, hemodialysis, aluminum, exposure sources, toxic effects

Índice

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Função Renal e Insuficiência Renal Crónica	1
1.1 Função Renal.....	1
1.2 Doença Renal Crónica e Insuficiência Renal Crónica	2
2. Diálise	4
2.1 Tipos de Diálise e respetivas modalidades	4
2.2 Hemodiálise.....	6
2.2.1 Acesso vascular nos doentes em HD	6
2.2.3 Constituição da solução dialisante.....	8
3. Alumínio	9
3.1 Absorção.....	10
3.2 Distribuição	10
3.3 Metabolismo	11
3.4 Excreção.....	11
3.5 Toxicocinética.....	11
4. Fontes de contaminação por Al nos doentes em HD.....	12
4.1 Solução dialisante	12
4.1.1 Um caso de intoxicação por Al de doentes em HD, em Portugal	16
4.2 Quelantes do fosfato para o tratamento da hiperfosfatémia.....	17
4.3 Outros medicamentos.....	19
5. Efeitos tóxicos do Al nos doentes em diálise.....	21
5.1 Demência de Diálise	21
5.2 Osteodistrofia renal.....	23
5.3 Anemia	24
5.4 Perturbações nos níveis de elementos vestigiais.....	26
5.5 Stress Oxidativo e Inflamação	27
6.Tratamento da intoxicação por Al	29

7. Técnicas usadas na determinação de Al	30
7.1 Considerações gerais	30
7.2 EAA-AE	30
7.3 ICP-MS.....	35
7.4 Controlo da contaminação.....	36
7.5 Determinação da concentração de Al na solução dialisante.....	37
8. Conclusão	38
9. Referências Bibliográficas	39

Índice de Figuras

Figura 1. Diálise Peritoneal.....	5
Figura 2. FAV (em cima) e PVA (em baixo)	6
Figura 3. Hemodiálise.....	7
Figura 4. Difusão (à esquerda) e Ultrafiltração (à direita).....	8
Figura 5. Osmose e Osmose inversa	14
Figura 6. Sistema “amaciador”	14
Figura 7. Notícia no British Medical Journal (5 de junho 1993) sobre o caso de intoxicação por Al na unidade de HD do Hospital de Évora	16
Figura 8. Aumento da absorção de Al pelo citrato.....	20
Figura 11. Tubos de grafite com aquecimento longitudinal e com aquecimento transversal (THGA). *Plataforma de L’vov.....	32

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estádios da IRC	3
Tabela 2. Modalidades de HD	4
Tabela 3. Modalidades da DP manual e da DP automatizada	5
Tabela 4. Alguns valores "normais" de Al no soro publicados na literatura bioanalítica até 1985 ⁽⁹⁴⁾	34

Lista de Abreviaturas

- AAN – Análise por ativação neutrónica
Al – Alumínio
ALA-D – Desidratase do ácido delta aminolevulínico
As – Arsénio
CVC – cateter venoso central
DP – Diálise peritoneal
DPCA – Diálise peritoneal contínua ambulatoria
DPCC – Diálise peritoneal contínua cíclica
DPI – Diálise peritoneal intermitente
DRC – Doença Renal Crónica
EAA-AE – Espectrofotometria de absorção atómica com atomização eletrotérmica
EPO – Eritropoietina
FAV – Fístula arteriovenosa
FCF – Fator de crescimentos dos fibroblastos
FDA – Food and Drug Administration
Fe – Ferro
GPx – Glutathione Peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
HD – Hemodiálise
ICP-MS – *Inductively coupled plasma-mass spectrometry*
ICP-AES – *Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*
IRA – Insuficiência renal aguda
IRC – Insuficiência renal crónica
KDIGO – *Kidney Disease Global Outcomes*
KDOQI – *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*
MDA – Malonildialdeído
Mn – Manganês
NKF – *National Kidney Foundation*
Pb – Chumbo
PTH – Paratormona
PVA – Prótese vascular arteriovenosa
rHuEPO – Eritropoietina recombinante
Se – Selénio
SOD – Superóxido dismutase

STPF – Stabilized temperature platform furnace

TFG – Taxa de filtração glomerular

THGA – *Transversely-heated graphite atomizer*

VMA – Valor máximo admitido

Zn – Zinco

1. Função Renal e Insuficiência Renal Crónica

1.1 Função Renal

Os rins são um par de órgãos vitais, fundamentais para a manutenção da homeostasia dos fluídos do corpo humano.

A unidade funcional do rim é o nefrónio e cada rim possui cerca de um milhão destas unidades.⁽¹⁾ Acontece que o rim não consegue regenerar novos nefrónios pelo que, com algum distúrbio renal, doença, e mesmo o próprio envelhecimento, há uma diminuição no número destas unidades funcionais.^(2, 3)

Os rins possuem diversas funções de homeostasia (p. ex., a eliminação de produtos metabólicos) e bioquímicas (p. ex., a reabsorção de glucose e aminoácidos). São os rins os responsáveis pela formação da urina onde são eliminados diversos produtos indesejáveis, sendo que diariamente os rins excretam entre 1,5-2,5 L de urina.^(4, 2) De seguida sintetizam-se algumas das mais importantes funções dos rins:

Os rins excretam produtos que já não são necessários e são tóxicos para o organismo, como a ureia (resultante do metabolismo dos aminoácidos), a creatinina (resultante da creatina muscular), o ácido úrico (proveniente dos ácidos nucleicos), e produtos finais da degradação da hemoglobina (como a bilirrubina) e alguns metabolitos de várias hormonas. É importante que estes produtos possam ser eliminados na mesma taxa com que são produzidos. Os rins excretam também toxinas e outras substâncias exógenas, como pesticidas, fármacos e aditivos alimentares, e/ou seus metabolitos.⁽²⁾

Os rins contribuem para o equilíbrio ácido base, juntamente com outros órgãos, como os pulmões, e sistemas tampão naturalmente presentes nos fluídos corporais. Por exemplo, o rim é o único órgão capaz de eliminar do organismo ácidos como o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico, produzidos no metabolismo das proteínas.

Para a manutenção da homeostasia corporal, a excreção de água e de eletrólitos deve coincidir com a entrada dos mesmos. Se para uma dada substância a entrada exceder a excreção, a sua quantidade no organismo vai aumentar, e vice-versa. A entrada de água e de muitos eletrólitos no organismo é regulada pelos hábitos alimentares, requerendo-se aos rins o ajuste das taxas de excreção para coincidir com essa entrada.⁽²⁾ Elevadas concentrações de produtos resultantes da atividade metabólica e excesso de água afetam os tecidos, comprometendo em particular o sistema cardiovascular e o cérebro.⁽¹⁾

Os rins têm ainda um papel importante na regulação da pressão arterial, pois eliminam quantidades variáveis de água e sódio. Para o efeito, também contribuem, por exemplo, através da secreção da renina, que catalisa a formação de produtos vasoativos (angiotensina II).⁽²⁾

Por fim, quanto à sua função endócrina, os rins produzem três importantes hormonas: eritropoietina (EPO), renina (referida acima) e calcitriol.⁽⁴⁾ A secreção de EPO estimula a produção de eritrócitos pelas células estaminais hematopoiéticas na medula óssea. Por isso é comum que em pessoas com doença renal grave se desenvolva anemia como resultado da produção diminuída de EPO.

Os rins regulam a produção da forma ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D₃ (ou calcitriol) através da hidroxilação da pró-vitamina na posição 1. A forma ativa da vitamina D é essencial para a normal deposição de cálcio nos ossos e para a reabsorção do cálcio no trato gastrointestinal.

É também reconhecida a importância dos rins no processo de gluconeogénese.⁽²⁾

1.2 Doença Renal Crónica e Insuficiência Renal Crónica

A doença renal crónica (DRC) é mais frequente nos países desenvolvidos, em comparação com os países em desenvolvimento.⁽⁵⁾ Qualquer indivíduo pode desenvolver doença renal e em qualquer idade, no entanto, há fatores que predis põem para o desenvolvimento deste tipo de doença: diabetes, hipertensão, fatores genéticos e a própria idade (envelhecimento).⁽⁶⁾

A perda progressiva e irreversível de uma grande quantidade de nefrónios funcionais leva a insuficiência renal crónica (IRC). Esta pode ocorrer devido a distúrbios nos vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos e trato urinário inferior. O mesmo se passa com a insuficiência renal aguda (IRA).⁽⁷⁾ A IRC é um problema que afeta entre 5 a 10% da população mundial.⁽⁸⁾ E tem-se verificado um aumento da prevalência tanto da DRC como da IRC.^(1, 5)

A perda de nefrónios funcionais requer que os restantes tenham de excretar mais água e solutos. Logo, a diminuição do número de nefrónios funcionais tem como consequência uma redução da taxa de filtração glomerular (TFG), ocorrendo assim uma maior retenção de água e solutos.

As complicações mais frequentes da IRC são uremia (aumento da concentração de ureia no sangue), anemia (devido sobretudo à diminuição da produção de EPO) e

osteomalacia (provocada pela diminuição da produção de vitamina D ativa e pela hiperfosfatemia).

As causas mais comuns de IRC são diabetes mellitus, hipertensão, glomerulonefrite e doença poliquística do rim. Existem, no entanto, outras causas como, por exemplo, obesidade, amiloidose, infeções (pielonefrites, tuberculose renal), obstrução do trato urinário por cálculos renais, hipertrofia da próstata e constrição uretral.^(1, 7)

Quanto aos sintomas, muitos doentes não apresentam sintomatologia significativa até estadios avançados da IRC, isto é, até o número de nefrónios funcionais cair para menos de 70-75%. Na realidade, muitos eletrólitos são mantidos em concentrações séricas normais até uma diminuição no número de nefrónios funcionais de 20-25%.⁽⁶⁾ Abaixo deste valor o funcionamento do órgão fica significativamente comprometido.⁽⁷⁾

No entanto, quando os doentes apresentam sintomas pode-se observar: fadiga, falta de apetite, perda de peso, prurido, edema periférico, distúrbios do sono, acrescida necessidade de urinar, especialmente à noite, câibras musculares durante a noite, problemas de concentração e pele desidratada.^(6, 9, 10)

Para rastreio de doença renal, uma vez que esta se pode desenvolver sem sintomas, a *National Kidney Foundation* (NKF) recomenda três testes simples: medição da pressão arterial, pesquisa de albumina/proteínas na urina e cálculo da TFG, através da medição da clearance da creatinina. A medição da ureia dá informação adicional.⁽⁴⁾

Na tabela seguinte estão representados os diferentes estadios da IRC segundo as normas *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO)⁽¹¹⁾, da NKF:

Tabela 1. Estadios da IRC

Estadio	TFG (mL/min x 1,73 m²)	Descrição
1	>90	Dano renal com TFG normal ou aumentada
2	60-89	Dano renal com diminuição moderada da TFG
3	30-59	Diminuição moderada da TFG
4	15-29	Diminuição acentuada da TFG
5	<15	Falência renal

Os doentes no estadio 5 necessitam de transplantação renal ou de tratamento dialítico para sobreviverem.

2. Diálise

A diálise é um processo de depuração que tem como objetivo a remoção de resíduos indesejados do sangue e a reposição dos equilíbrios hidro-eletrolíticos e ácido-base, alterados nos pacientes com IRC.⁽¹⁾

A primeira diálise (hemodiálise) bem sucedida da história da medicina foi realizada em 1945, por Wilhem Kolf, na Holanda. O paciente sobreviveu por mais de 6 anos.⁽⁹⁾ No entanto, a hemodiálise só passou a ser um tratamento comum nos anos 60.⁽¹²⁾

2.1 Tipos de Diálise e respetivas modalidades

Os dois principais tipos de diálise são a hemodiálise (HD) e a diálise peritoneal (DP), sendo a primeira a mais usada.⁽⁹⁾

Ao longo dos anos tem-se procurado tornar os equipamentos de diálise cada vez mais eficientes no sentido de minimizar os efeitos indesejáveis. Máquinas mais simples e compactas tornaram mesmo mais viável o processo de diálise em casa. No entanto, a HD continua a ser um tratamento complicado, que requer o acompanhamento e supervisão de uma equipa especializada.⁽¹²⁾

Na tabela seguinte estão referidas as diferentes modalidades de HD⁽¹³⁾:

Tabela 2. Modalidades de HD

Modalidades de HD
HD convencional
HD de alta eficácia
HD de alto fluxo
Hemodiafiltração
Hemofiltração

O outro tipo de diálise é a DP. É uma técnica de depuração extra-renal, que utiliza o peritoneu como membrana dialisante.⁽¹³⁾

O peritoneu possui uma extensa superfície e uma vasta rede de vasos sanguíneos. Muitas substâncias do sangue podem passar através do peritoneu para o interior da cavidade abdominal. A solução dialisante é introduzida através de um cateter que penetra através da parede abdominal até ao espaço peritoneal, no interior do abdómen (Fig. 1). O cateter permite a passagem de aproximadamente 1,5-3 L de solução dialisante. Esta solução deve permanecer no abdómen durante 2-4 horas para permitir e os resíduos

metabólicos presentes na circulação sanguínea passam lentamente para a solução dialisante. Este processo é repetido várias vezes por dia para permitir uma boa remoção das toxinas, água e eletrólitos.^(9, 14)

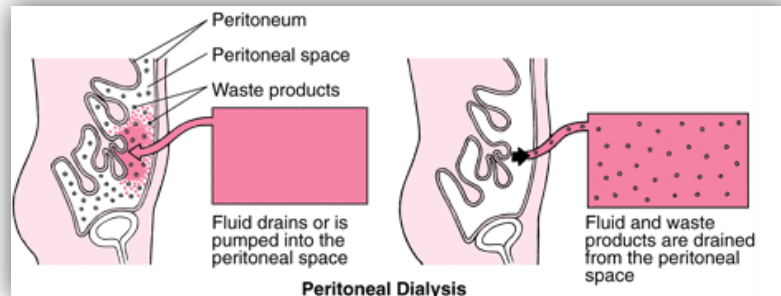


Figura 1. Diálise Peritoneal⁽¹⁵⁾

Podem distinguir-se dois grandes grupos de DP⁽¹³⁾:

Tabela 3. Modalidades da DP manual e da DP automatizada

DP manual	DP automatizada
DP contínua ambulatoria (DPCA)	DP contínua cíclica (DPCC)
DP intermitente ou descontínua	DP contínua cíclica de alta dose
	DP intermitente noturna
	DP intermitente (DPI)

Na DP manual as trocas de soluções dialisantes são feitas manualmente; no caso da DP automatizada, a troca é efetuada recorrendo a máquinas cicladoras. Estas máquinas desempenham várias funções, como drenar e infundir volumes exatos de solução dialisante a ritmos programados, quantificar e registar os balanços hídricos e aquecer a solução dialisante, que deve estar a 37 °C.

Outro tipo de diálise é a diálise híbrida, em que são utilizadas quer modalidades da DP quer modalidades de HD.⁽¹³⁾

Para este trabalho assume maior importância a HD. Por isso, este tipo de diálise será abordado mais detalhadamente.

2.2 Hemodiálise

Para o processo de HD é necessário um equipamento próprio (máquina de diálise). Esta realiza três tarefas essenciais: bombear o sangue e monitorizar o fluxo sanguíneo, remover os resíduos do sangue e controlar a pressão sanguínea e a taxa de remoção de fluídos do organismo.⁽¹²⁾ Absolutamente indispensável para o processo é a solução dialisante, a qual consiste num fluído que ajuda a remover os resíduos e o excesso de água do sangue, pois possui uma composição química semelhante aos líquidos normais do organismo.^(4, 16) E é ainda necessário criar um acesso vascular no doente.

2.2.1 Acesso vascular nos doentes em HD

Para facilitar o acesso de forma repetida à circulação sanguínea, semanas ou meses antes do início do tratamento é criada cirurgicamente uma anastomose direta (ligação entre uma artéria e uma veia), criando-se, assim, uma fístula arteriovenosa (FAV). A criação deste acesso torna mais fácil e mais eficiente a remoção e o retorno do sangue ao organismo, com menos complicações.^(12, 16)

A FAV deve ser considerada a primeira escolha, pois tem uma maior durabilidade e acarreta menores complicações no que toca a infeções e formação de coágulos. No entanto, quando os doentes não possuem vasos suficientemente fortes, existem outras alternativas.⁽¹⁷⁾ Entre essas possibilidades estão: a inserção de uma prótese vascular arteriovenosa (PVA) (uso de um tubo sintético para ligar uma artéria e uma veia), que tem uma cicatrização mais rápida mas uma elevada taxa de infeção; e o uso de um cateter venoso central (CVC), que tem a vantagem de poder ser usado imediatamente. Este é útil por exemplo quando é necessário aguardar pela cicatrização da PVA ou da FAV.^(9, 13, 17) Na Fig. 2 estão representadas quer a FAV quer a PVA.

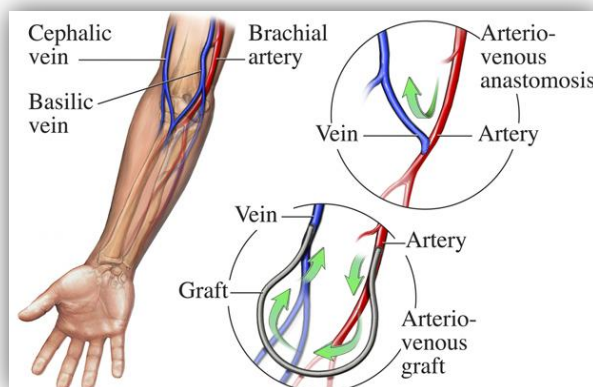


Figura 2. FAV (em cima) e PVA (em baixo)⁽¹⁸⁾

Resumidamente, no processo de HD (Fig.3) o sangue sai por um tubo ligado à FAV e é bombeado para o dialisador.

Dentro do dialisador, que funciona como um rim artificial, uma membrana semipermeável seletiva separa dois compartimentos, um por onde circula o sangue e outro por onde circula a solução dialisante. Estes circulam em direções opostas. A pressão no compartimento da solução dialisante é mais baixa que a do compartimento do sangue, permitindo assim que o líquido, os produtos residuais e as substâncias tóxicas do sangue passem através da membrana que separa ambos os compartimentos.

Contudo, as células sanguíneas e as proteínas de grandes dimensões não passam através dos pequenos poros da membrana.⁽¹⁶⁾

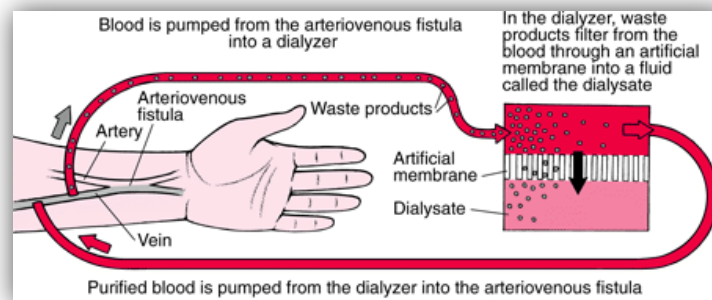


Figura 3. Hemodiálise⁽¹⁹⁾

O plasma é, assim, purificado dos resíduos à medida que estes passam do sangue para a solução dialisante. Ao contrário dos túbulos renais, no entanto, a membrana de diálise não consegue reabsorver sódio, potássio, glucose, e outras moléculas. Para que estas substâncias permaneçam no sangue, são incluídas na solução dialisante, de modo a que não haja um gradiente de concentração que favoreça a sua difusão através da membrana.

O sangue purificado é depois devolvido ao organismo.^(9, 16, 20)

Durante a HD, o restabelecimento da composição normal do fluido intracelular e extracelular do organismo é alcançado pelo transporte de solutos (como por exemplo a ureia) do sangue para a solução dialisante, e pelo transporte de solutos (por exemplo bicarbonato) da solução dialisante para a corrente sanguínea, através de um processo de difusão (gradiente de concentração).

O eventual excesso de água é removido por ultrafiltração. Para o efeito, cria-se um gradiente de pressão através da membrana usando uma bomba que aumenta a pressão no

compartimento sanguíneo, causando a passagem de água para o compartimento da solução dialisante.

Os dois mecanismos que permitem a passagem de solutos de uma solução para outra estão esquematizados na Fig. 4. Há difusão de solutos devido ao gradiente de concentração química, e a ultrafiltração permite a eliminação do excesso de água, através de uma membrana semipermeável.⁽¹⁾

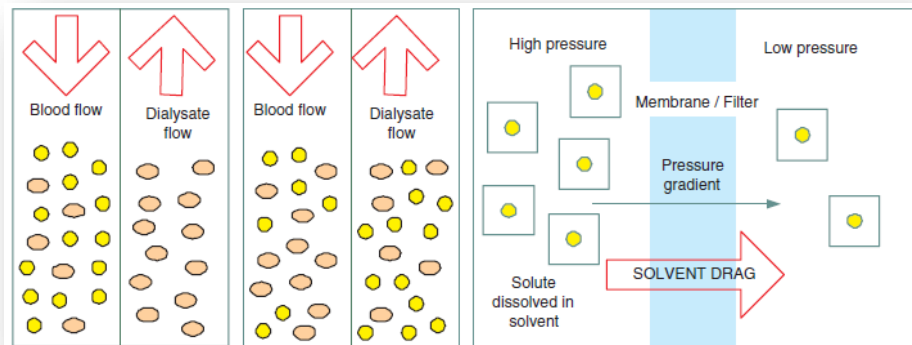


Figura 4. Difusão (à esquerda) e Ultrafiltração (à direita)⁽¹⁾

2.2.3 Constituição da solução dialisante

A solução dialisante consiste numa solução de eletrólitos dissolvidos em água. Existem diferentes tipos de soluções dialisantes disponíveis comercialmente. Uma solução típica contém 130-145 mEq/L de sódio, 2-3 mEq/L de potássio, 2,5-3,5 mEq/L de cálcio e 100-200 mg/dL de glucose, juntamente com magnésio e substâncias com poder tampão, para manter o pH sistémico. O bicarbonato, sob a forma de pó seco, é adicionado extemporaneamente, uma vez que é muito instável para poder estar já presente na solução.⁽⁹⁾ A sua adição permite a correção da acidose metabólica, que é uma complicação da uremia. A glucose é adicionada com o intuito de prevenir a hipoglicemia.^(21, 22)

3. Alumínio

Em pacientes submetidos a tratamento dialítico, a ausência de uma eficiente eliminação renal, juntamente com o uso de quelantes de fosfato contendo alumínio (Al), bem como o uso de soluções dialisantes contaminadas com este metal, podem levar a acumulações de Al no organismo.^(23, 24)

Pelo facto de a intoxicação por Al ser um problema importante nos doentes em diálise, descreve-se de seguida o seu perfil toxicológico.

O Al corresponde a cerca de 8% (m/m) da massa da crosta terrestre, onde é o terceiro elemento mais abundante, depois do oxigénio (47%) e do silício (28%), sendo o primeiro entre os metais.⁽²³⁻²⁵⁾

É um elemento muito reativo, pelo que nunca é encontrado livre na natureza, antes encontrando-se combinado sob a forma de hidróxidos, silicatos, fosfatos ou sulfatos⁽²⁵⁻²⁷⁾ Por ser um metal ubíquo, existem variadas fontes de Al a que o ser humano está exposto diariamente. Algumas mais significativas são:

Exposição ambiental: O ser humano está continuamente exposto ao Al através do solo, do ar e da água. No solo, as maiores concentrações devem-se a contaminação com resíduos de indústrias, p. ex., resíduos da combustão de carvão ou da fundição de Al. Na atmosfera, o Al é maioritariamente encontrado como aluminossilicatos na chamada “matéria particulada” (partículas sólidas em suspensão no ar). Na água, as concentrações de Al são baixas em águas naturais, mas podem ser bastante elevadas em áreas urbanas. Um fator que contribui para o aumento da concentração de Al na água é a chuva ácida.⁽²⁸⁾

Exposição através da dieta: Os alimentos possuem naturalmente Al, pois crescem em solos que contêm este metal. O Al está também presente em muitos aditivos alimentares. São mesmo os alimentos a principal fonte de exposição.⁽²⁶⁾ Foi estimado que cerca de 20% da ingestão diária de alumínio terá origem no uso de utensílios domésticos feitos de Al (p. ex., talheres, panelas).⁽²⁸⁾

Exposição iatrogénica: A introdução do Al diretamente na corrente sanguínea através de soluções dialisantes com elevadas concentrações de Al (como acontece nos doentes em tratamento dialítico), a administração de elevadas doses de quelantes de fosfato contendo Al na sua composição e os antiácidos são as mais importantes causas de sobrecarga de Al devida a medicação.

Exposição ocupacional: A exposição ocupacional (i.e. no ambiente de trabalho) ao Al é inevitável devido ao seu amplo uso em variadas indústrias. A exposição é mais intensa em trabalhadores de refinarias de Al e em indústrias que utilizem o metal.⁽²⁸⁾

3.1 Absorção

Diariamente, o ser humano ingere pequenas quantidades de Al, cerca de 4-5 mg através dos alimentos e entre 10-1000 µg/L pela ingestão de água.⁽²⁹⁾ Mas o organismo humano possui barreiras como a pele, pulmões e trato gastrointestinal que limitam grandemente a sua absorção sistémica, pelo que o Al é pouco absorvido depois de exposição oral, inalatória ou dérmica.⁽²⁶⁾

Em particular, a absorção a nível do trato gastrointestinal é bastante baixa (0,1%), mas existem componentes da dieta que complexam o Al, podendo aumentar ou diminuir a sua absorção.⁽²⁸⁾ Por exemplo, na presença de fosfato, a absorção de Al é inibida, assim como na presença de hidróxido de Al há inibição da absorção de fosfato.

Outro exemplo é a ligação do Al a compostos orgânicos de baixo peso molecular, predominantemente o citrato, o que aumenta a sua absorção.⁽²⁵⁾

O principal mecanismo de absorção do Al é provavelmente a difusão passiva através de vias paracelulares.⁽²⁶⁾

3.2 Distribuição

O Al acumula-se em diferentes extensões em vários tecidos, incluindo pulmões, fígado, baço, osso, coração, músculo, cérebro e glândulas paratiroideias.^(30, 31) O tecido ósseo é um dos locais preferenciais de acumulação de Al, principalmente em áreas do osso metabolicamente ativas.⁽²⁶⁾

No sangue, aproximadamente 10% do Al encontra-se nos eritrócitos. Os níveis normais de Al no plasma são aproximadamente de 1–3 µg/L. Aqui, cerca de 90% do Al encontra-se ligado à transferrina, isto é partilha com o ferro (Fe) a sua proteína transportadora. Existem recetores desta proteína em muitos tecidos, e é a densidade destes recetores que influencia a distribuição do Al no organismo. A entrada de Al nos órgãos e tecidos é relativamente lenta e, como referido, dependente da transferrina.⁽²⁶⁾

Os restantes 10% do Al plasmático estão associados com o citrato.^(26, 32)

No interior das células, o Al acumula-se nos lisossomas, núcleo celular e cromatina.⁽²⁸⁾

3.3 Metabolismo

O Al pode existir no organismo sob diferentes formas. Pode existir como iões livres (catiões trivalentes), mas facilmente se liga a outras moléculas, formando complexos. Pode ligar-se a nucleótidos, aminoácidos, ácidos orgânicos, fosfatos, e formar complexos de baixo peso molecular, estáveis, metabolicamente ativos, principalmente os complexos apolares. Pode formar complexos com macromoléculas, por exemplo aminoglicosídeos ou proteínas, que são metabolicamente menos ativos que os anteriores. Pode também formar complexos irreversíveis com macromoléculas, que são muito estáveis.⁽²⁶⁾

3.4 Excreção

Em pessoas saudáveis, o Al que é absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado pelos rins, através da urina, e em menor extensão pela bile.^(26, 33) Os níveis de Al na urina em indivíduos saudáveis são normalmente baixos, inferiores a 10 µg/L.

Como se referiu, grande parte do Al presente na dieta está sob a forma insolúvel e não absorvível.⁽²³⁾ O Al não absorvido é eliminado pelas fezes.⁽²⁶⁾

3.5 Toxicocinética

Apesar de o ser humano se encontrar continuamente exposto ao Al, não lhe é atribuída utilidade nos sistemas biológicos. Pelo contrário, este metal é tóxico para as plantas, para muitos animais aquáticos e para os seres humanos.^(23, 25, 28)

A toxicocinética do Al depende do tipo de complexos em que se encontra presente. Se o Al estiver sob a forma de um complexo de elevado peso molecular, por exemplo com a transferrina, não é filtrado nos glomérulos, e não é excretado. O contrário acontece quando o Al se encontra sob a forma de complexos de baixo peso molecular.⁽²⁶⁾

4. Fontes de contaminação por Al nos doentes em HD

4.1 Solução dialisante

Como anteriormente referido, a solução dialisante resulta da mistura (diluição) do concentrado polieletrólítico (comercial) com água de abastecimento municipal devidamente tratada/purificada (na unidade de diálise).

A contaminação da solução pode ter origem nas duas fontes. No entanto, a contaminação da água usada no tratamento por HD com Al foi desde sempre apontada como a principal responsável pela encefalopatia, anemia e osteodistrofia observada nos doentes em diálise.⁽²⁴⁾

A água funciona como a principal via de contaminação porque os doentes em HD não estão apenas expostos à água de consumo que ingerem, mas a uma elevada quantidade, entre 300-400 L por semana, de água usada na preparação das soluções dialisantes. E enquanto a água ingerida atinge a corrente sanguínea apenas após a passagem pela mucosa gastrointestinal, que é altamente seletiva e grandemente impede a absorção de Al, a solução dialisante entra em contacto praticamente direto com a corrente sanguínea, apenas tendo a separá-las uma membrana artificial semipermeável.^(21, 22)

O Al na água, a pH neutro, predomina sob a forma de complexos e é altamente insolúvel (podendo ser filtrado). Mas por ser anfotérico, pequenas variações de pH podem aumentar a concentração de Al dissolvido. E o aumento da concentração de Al na água, e consequentemente na solução dialisante com ela preparada, faz com que exista um gradiente de Al “difundível” para o compartimento sanguíneo. O balanço de Al na HD depende então de fatores como o tipo de membranas de diálise (superfície e espessura), pH da solução dialisante e, principalmente, da concentração de Al nessa mesma solução dialisante.^(24, 34, 35)

Desde a década de 70 que se começou a relacionar a intoxicação por Al com a contaminação por este metal da água usada na HD. Alguns episódios concretos permitiram ter evidências diretas desta associação.

Por exemplo, em 1976, em Heindoven, na Holanda verificou-se uma relação direta entre a concentração de Al presente na água usada para a preparação da solução dialisante e a demência de diálise. Parte da água usada para preparar a solução dialisante era água da rede de abastecimento público, enquanto outra parte era obtida de uma caldeira própria do hospital. Na caldeira, haviam sido colocados ânodos de Al, com o objetivo de evitar a corrosão. Acontece que os ânodos de Al, que pesavam cerca de 32 kg, tinham-se desintegrado por completo em dois anos. Como resultado, a concentração de Al nas

soluções dialisantes era extremamente elevada. Noutras unidades de diálise da mesma cidade, em que a preparação da solução dialisante era semelhante mas em que as caldeiras não possuíam ânodos de Al, não tinham ocorrido casos de demência de diálise.⁽³⁶⁾

No ano seguinte, em 1977, Platts e colaboradores⁽³⁷⁾ registaram uma elevada prevalência de demência de diálise e fraturas espontâneas em doentes em HD. Notaram que a distribuição geográfica deste problema era desigual e decidiram investigar as águas de abastecimento. Observaram então, que a água usada nos pacientes que desenvolveram fraturas ou encefalopatia possuía menores concentrações de cálcio e flúor, e elevadas concentrações de Al e manganês (Mn) por comparação com as concentrações destes mesmos elementos na água utilizada em pacientes que não desenvolveram estas complicações.

Verificaram igualmente que os pacientes com múltiplas fraturas tinham realizado HD com água que possuía maior concentração de Al e Mn que aqueles que possuíam apenas uma fratura. Os autores não culpabilizaram o Al administrado oralmente, porque somente alguns pacientes estavam em terapêutica com quelantes do fosfato contendo Al. Concluíram, no entanto, que algum contaminante presente na água era provavelmente responsável pelo desenvolvimento da demência de diálise e pela osteodistrofia. Propuseram então que nas zonas em que a água possuísse elevadas concentrações de Al fossem usados desionizadores para o seu tratamento. Após a introdução destes dispositivos, Ward e colaboradores⁽²⁴⁾ verificaram que a percentagem de doentes em HD que desenvolvia osteomalacia era menor relativamente aqueles que usavam simplesmente água “amaciada”, não desionizada, da mesma fonte.

Ward e colaboradores observaram que o processo de desionização, mais propriamente o processo de osmose inversa, era muito eficiente na remoção do Al da água de abastecimento público.

O princípio básico da osmose inversa (Fig. 5) consiste em forçar a água a passar através de uma membrana que é tão espessa que apenas as moléculas de H₂O e iões passam. Assim, tanto do ponto de vista químico como do ponto de vista microbiológico, com uma membrana de osmose inversa pode ser produzida água pura.⁽³⁸⁾ Esta membrana remove praticamente todos os compostos orgânicos e 90-99% dos iões. São necessárias pressões de 10-70 bar para o processo de purificação ocorrer eficazmente. Esta técnica requer menos energia que um processo de destilação e possui a mesma eficiência que uma resina de troca iónica.⁽³⁹⁾

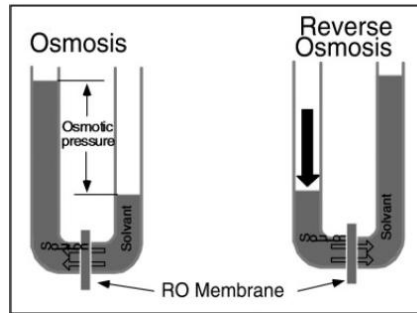


Figura 5. Osmose e Osmose inversa⁽³⁹⁾

A introdução de módulos de osmose inversa foi pois um passo fundamental para a obtenção de água apropriada para a preparação da solução dialisante, já que até então os processos de purificação da água eram inexistentes, ou bastante rudimentares. Aliás, quando o tratamento hemodialítico foi introduzido eram comuns episódios de contaminação química, como é exemplo a chamada “síndrome da água dura”.⁽²²⁾ Esta síndrome era devida a elevadas concentrações de cálcio e magnésio na água, que provocavam episódios de vômitos, letargia e fraqueza muscular nos pacientes durante as sessões de HD.

Assim, ao contrário do que aconteceu até a década de 70, em que se acreditava que a água potável servia para a HD, nos anos 80 era já claro que a causa mais importante da toxicidade epidémica do Al era a contaminação por este metal da água utilizada para a preparação da solução dialisante.⁽³⁶⁾

O equipamento de tratamento de água numa unidade de diálise, antes dos anos 70, consistia simplesmente em filtros de sedimentação (remoção de partículas), filtros de carbono ativado (adsorviam a matéria orgânica dissolvida) e “amaciadores” (Fig. 6) (para evitar a síndrome da água dura).⁽³⁸⁾

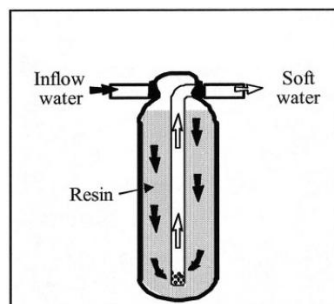


Figura 6. Sistema “amaciador”⁽³⁹⁾

Mas como tem vindo a ser referido, tornava-se evidente que a água usada para tratamentos hemodialíticos precisava de satisfazer requisitos e padrões de qualidade específicos, para prevenir episódios de intoxicação/toxicidade, quer na IRA quer na IRC.⁽³⁹⁾

Atualmente todas as unidades de diálise possuem um sistema de tratamento de água para HD. Com este sistema pretende-se garantir um grau de purificação da água para preparação da solução dialisante que respeite os padrões definidos. Este sistema tem também como objetivo garantir sempre condições de caudal e pressão previamente estabelecidas.

O sistema de tratamento referido inclui um tanque de sedimentação, grupo hidropressor, sistema de cloragem, filtro de sedimentação, descalcificador, filtro de carvão (para remoção de compostos halogenados, inorgânicos e orgânicos de baixo peso molecular), filtro de partículas (“cartuchos”), módulos de osmose inversa e um sistema de distribuição da água tratada. É opcional que as unidades de diálise possuam um tanque com a água tratada.

Segundo o mais recente Manual das Boas Práticas em Diálise (2011), o valor máximo admitido (VMA) de Al na água usada para diálise é de 4 µg/L. E a monitorização da água para HD relativamente ao conteúdo de Al deve ser realizada trimestralmente.⁽¹³⁾

Importa referir que o Al é intencionalmente adicionado no próprio tratamento da água de abastecimento público. Atualmente as etapas de tratamento de água municipal incluem processos como pré-filtração (remoção de partículas em suspensão), clarificação (para reduzir a turvação), desinfecção e ajuste do pH.⁽³⁹⁾ O Al é usado na forma de sais de Al, como os sulfatos, funcionando como “coagulante” no processo de clarificação, isto é, estes sais são adicionados para provocar a coagulação/floculação das partículas coloidais em suspensão, originando precipitados que possam ser eliminados por filtração, ficando a água mais límpida e adequada ao consumo. No entanto, parte do Al adicionado fica em solução e faz parte do Al residual presente na água de consumo.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾

Em síntese, o desenvolvimento de sistemas mais sofisticados para a purificação da água (osmose inversa) minimizou significativamente a possibilidade de intoxicação por Al através da via parenteral em pacientes em HD.⁽³⁰⁾ A monitorização periódica das águas que abastecem as unidades de diálise é importante, uma vez que as próprias variações sazonais alteram as concentrações de Al na água, tal como alteram a necessidade de adicionar mais ou menos sais de Al para a sua “clarificação”.⁽²³⁾

4.1.1 Um caso de intoxicação por Al de doentes em HD, em Portugal

Um caso de intoxicação grave por Al ocorreu em Portugal, em 1993, na Unidade de Hemodiálise do Hospital Distrital de Évora, e de que resultou a morte de vinte e cinco pessoas. O mau funcionamento das membranas, juntamente com o elevado teor de Al na água (devido a seca verificada nessa altura no Alentejo e à consequente maior necessidade de adicionar sais de Al para o seu tratamento) foram as causas apontadas.

Este ocorrência teve um grande impacto mediático, inclusive na literatura médica (Fig. 7), pois nesta altura já eram bem conhecidos os efeitos da intoxicação por alumínio e a absoluta necessidade da purificação da água usada para HD.



Figura 7. Notícia no British Medical Journal (5 de junho 1993) sobre o caso de intoxicação por Al na unidade de HD do Hospital de Évora

4.2 Quelantes do fosfato para o tratamento da hiperfosfatémia

A IRC leva a uma perda progressiva da capacidade do rim de excretar o fosfato, de produzir a forma ativa de vitamina D (a 1,25-dihidroxitamina D₃) e de manter a homeostasia do cálcio. O aumento dos níveis séricos de fosfato (hiperfosfatémia) e a diminuição dos níveis de vitamina D levam a um aumento dos valores da paratormona (PTH), conhecido como hiperparatiroidismo secundário, e a um aumento no fator de crescimento dos fibroblastos 23 (FCF 23). Estes dois últimos são reconhecidos pelo seu papel na osteodistrofia renal.^(43, 44)

No hiperparatiroidismo secundário (HPTS) associado à insuficiência renal crónica observam-se alterações quer endocrinológicas, quer do metabolismo fosfo-cálcico e da própria remodelação óssea, que resultam do aumento da secreção de PTH (i.e. hiperativação das glândulas paratiroideias).⁽⁴⁵⁾

O problema da hiperfosfatémia foi reconhecido muito cedo na história da diálise. A calcificação vascular (devido à deposição de fosfato de cálcio nas paredes dos vasos sanguíneos) e de tecidos moles podia ser facilmente visualizada através de exame com raios X.⁽³⁶⁾

A preocupação com a hiperfosfatémia deve-se ao facto de esta estar associada ao desenvolvimento de doença cardiovascular, e consequentemente ao aumento da mortalidade nos doentes em diálise.⁽⁴³⁾ É então fundamental a monitorização das concentrações séricas de fosfato nos doentes com IRC. Para o tratamento da hiperfosfatémia em geral, uma vez que o fósforo é proveniente da dieta (principalmente das proteínas), recomenda-se uma dieta restrita em fósforo. Mas uma vez que nos doentes em diálise esta restrição não é suficiente, recorre-se ao uso de quelantes do fosfato, como o hidróxido de alumínio e o carbonato de cálcio, de modo a inibir a absorção gastrointestinal do mesmo.

Nos anos 70 a administração destas duas substâncias aos doentes em HD era uma prática universal.⁽³⁶⁾ O hidróxido de alumínio era tido como padrão neste tratamento, por ser muito eficiente. No entanto, o seu uso prolongado começou também a ser associado à acumulação de Al e à toxicidade já referida (encefalopatia, osteomalacia, anemia microcítica e miopatia). No início dos anos 80, houve então uma limitação do uso deste agente, ou mesmo a sua abolição. Atualmente o hidróxido de alumínio é utilizado apenas por muito curtos períodos de tempo.^(36, 46)

Surgiram então, como alternativa aos quelantes do fosfato contendo Al, os sais de cálcio (carbonato de cálcio e acetato de cálcio). O carbonato de cálcio controlava eficazmente a

hiperfosfatémia, ainda que sendo menos eficaz que o hidróxido de alumínio. No entanto, o seu uso podia levar a fenómenos de hipercalcémia. Efetivamente, o carbonato de cálcio possui uma proporção elevada de cálcio elementar (40%). Quando administrado em doses elevadas, ou quando é administrado com vitamina D (que aumenta a sua absorção gastrointestinal) pode levar a um aumento da concentração sérica de cálcio. O uso de soluções de diálise com elevadas concentrações de cálcio também contribui para este fenómeno.

O acetato de cálcio apareceu depois como alternativa ao carbonato de cálcio. Possui uma menor percentagem de cálcio elementar (25%), era bem tolerado e diminuía significativamente e mantinha os níveis de fósforo sérico e o produto cálcio x fosfato (Ca x P). No entanto, a ocorrência de hipercalcémia estava associada tanto ao carbonato como ao acetato de cálcio. E a hipercalcémia em doentes em diálise era preocupante pois estava associada a progressivas calcificações vasculares, contribuindo para o aumento da mortalidade destes doentes.⁽⁴⁶⁾ Com o aumento das concentrações de cálcio, aumenta também o produto Ca x P, e quando este produto excede os 55 mg/dL há um risco elevado de calcificação ectópica (calcificação fora do tecido ósseo).⁽⁴⁷⁾

Sendo assim, também eram necessárias alternativas a estes quelantes de fosfato contendo cálcio. Durante vários anos estudaram-se sais de magnésio (hidróxido e carbonato de magnésio), mas estes não se revelaram muito eficazes e exigiam ajustes nas soluções dialisantes relativamente à concentração de magnésio.⁽⁴⁶⁾

Depois surgiu o cloridrato de sevelâmero, um polímero quelante do fosfato que não contém nem alumínio nem cálcio. Disponível em Portugal desde 2000, reduz os níveis séricos de fósforo sem afetar os valores de cálcio. No entanto, o tratamento com este agente quelante está frequentemente associado a distúrbios gastrointestinais, nomeadamente flatulência.⁽⁴⁸⁾

A primeira formulação de sevelâmero a ser aprovada continha o hidrocloreto de sevelâmero. Seguiu-se depois o carbonato de sevelâmero,⁽⁴⁷⁾ desenvolvido com o intuito de fazer baixar os níveis de fosfato sem o risco de agravar a acidose metabólica associada ao hidrocloreto de sevelâmero e a conseqüente necessidade de monitorizar alterações nas concentrações séricas de cloreto e bicarbonato.^(44, 49)

Posteriormente, para tratamento da hiperfosfatémia nos pacientes em diálise, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) o carbonato de lantânio (está aprovado em Portugal desde Julho de 2005). O carbonato de lantânio é pouco solúvel, mas no ambiente ácido do estômago e na parte superior do intestino delgado, dissocia-se de modo a deixar o ião lantânio (La^{3+}) disponível para a ligação ao fosfato.

O carbonato de lantânio mostrou ser tão eficaz como o hidróxido de alumínio e mais eficaz que os compostos anteriormente referidos na quelatação do fosfato.⁽⁴⁶⁾ No entanto, é possível que o seu uso a longo prazo possa ter alguns efeitos tóxicos.⁽³⁶⁾

De qualquer modo, estes dois últimos quelantes de fosfato (cloridrato de sevelâmero e carbonato de lantânio) não contêm nem cálcio nem alumínio e são eficazes na diminuição dos níveis de fosfato. A principal desvantagem é o seu custo mais elevado, pelo que não têm ainda um uso alargado em alguns países.⁽⁵⁰⁾

Em síntese, os quelantes de fosfato baseados em cálcio têm uma boa eficácia e são os mais usados na prática clínica. No entanto em pacientes com reduzida ou ausente função renal, pode ocorrer calcificação extra-óssea.^(51, 52) Existem então quelantes do fosfato que não contêm cálcio que são eficazes na diminuição nos níveis de fosfato, como é o caso do carbonato de lantânio. Após um ano de tratamento, o La^{3+} tende a acumular-se, mas os efeitos da sua acumulação crónica ainda não estão bem entendidos. Por isto, é necessária mais investigação neste campo, para definir bem o perfil risco-benefício dos diferentes quelantes do fosfato.⁽⁴⁴⁾

4.3 Outros medicamentos

Apesar dos quelantes de fosfato contendo Al serem atualmente pouco utilizados, existem outros medicamentos que podem provocar toxicidade devido à presença de Al, nomeadamente, antiácidos, analgésicos, vacinas, agentes anti-diarreicos e sucralfato (protetor da mucosa gástrica).⁽⁵³⁾ A utilização deste último é desaconselhada em indivíduos em diálise. E em doentes com DRC deve ser administrado cautelosamente devido ao risco de acumulação de Al.

Nas vacinas o alumínio é comumente usado como adjuvante sob a forma de hidróxido de Al, fosfato de Al ou alúmen ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).⁽⁵⁴⁾

Alguns estudos realizados por Froment e colaboradores⁽³⁶⁾ revelaram que o citrato de Al é muito mais solúvel a um pH fisiológico do que o hidróxido de Al ou o cloreto de Al. A elevada solubilidade do citrato de Al reforça a absorção gastrointestinal do Al (Fig. 8), sendo este facto responsável por valores elevados de Al no soro e conseqüente sintomatologia neurológica em pacientes que tomavam suplementos contendo citrato. O citrato foi então substituído pelo bicarbonato no tratamento de acidose urémica. Para além do citrato, também o lactato e o ascorbato facilitam a absorção gastrointestinal do Al.⁽²⁷⁾

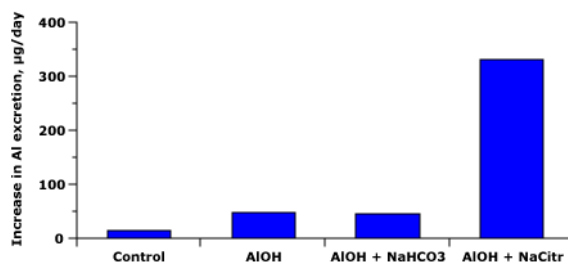


Figura 8. Aumento da absorção de Al pelo citrato

Existe igualmente a preocupação de que algumas soluções de nutrição parenteral possam estar contaminadas com Al.⁽⁵³⁾ O mesmo se aplica a soluções de administração parenteral em grande volume (“soros”).

Há ainda estudos que demonstraram que os doentes em diálise que recebiam terapêutica injetável, como ferro, insulina ou EPO, três das substâncias mais frequentemente administradas a doentes em diálise, tinham níveis de Al plasmáticos superiores aos que não recebiam essa terapêutica.⁽⁵⁵⁾

5. Efeitos tóxicos do Al nos doentes em diálise

Como destacado atrás, no passado as principais fontes de intoxicação pelo Al nos doentes em diálise eram as soluções dialisantes contaminadas, os quelantes de fosfato contendo Al e os antiácidos. Atualmente estas fontes foram quase totalmente eliminadas.^(56, 57)

Como também já foi referido, o Al é excretado essencialmente pelo rim. Logo os doentes com DRC podem sofrer acumulação com conseqüente intoxicação pelo metal.

Os principais sinais e sintomas da intoxicação alumínica são a anemia hipocrômica microcítica, a neurotoxicidade aguda, demência de diálise e a doença óssea relacionada com o Al (osteomalacia ou doença óssea adinâmica).⁽³⁰⁾

5.1 Demência de Diálise

Em 1972, Alan Alfrey e colaboradores relataram detalhes de um síndrome neurológico progressivo e fatal que havia ocorrido em alguns pacientes em tratamento por HD há alguns anos.⁽²⁴⁾

Alfrey constatou que os pacientes em tratamento na sua unidade em Denver, Colorado, EUA, frequentemente morriam depois de 3-7 anos em diálise devido ao desenvolvimento de uma severa encefalopatia caracterizada por sintomas como disartria, disfasia, demência, mioclonia, convulsões, ataxia e perda de memória. Nos doentes com esta patologia era possível detetar um pico “padrão” no eletroencefalograma.^(36, 58, 59)

Alfrey, o primeiro a descrever esta encefalopatia, estava convencido de que a mesma resultava de uma intoxicação. Realizou então uma extensa pesquisa de toxinas, incluindo metais pesados, no sangue destes doentes. Chegou a relatar que os pacientes com encefalopatia possuíam uma ligeira acumulação de estanho ou uma deficiência em rubídio.

Mas finalmente em 1976 Alfrey demonstrou que muitos pacientes em diálise, que acabaram por morrer devido à encefalopatia grave, possuíam elevadas concentrações de Al nos seus tecidos.^(36, 59) Em particular, encontrou um elevado conteúdo de Al no cérebro, músculo e tecido ósseo dos doentes afetados.⁽²⁴⁾

Foi então introduzida uma denominação para esta encefalopatia: “demência de diálise”. Alfrey constatou que a causa da demência de diálise era a acumulação de Al na substância cinzenta do cérebro (córtex cerebral).⁽⁶⁰⁾

Inicialmente este síndrome neurológico foi atribuído ao Al administrado oralmente, mas essa hipótese não explicava porque é que o uso de quelantes do fosfato contendo Al

era uma prática universal e a demência de diálise estava confinada a algumas unidades de diálise. Estudos posteriores mostraram que a toxicidade severa havia sido causada primariamente pela excessiva exposição ao Al através das soluções dialisantes, mais do que ao uso de agentes quelantes contendo Al.^(58, 61)

No final dos anos 70 (1978), acreditava-se já que a contaminação com Al das águas usadas para preparar as soluções dialisantes era a causa provável da demência de diálise. Mais, reconhecia-se já que a intoxicação alumínica não estava confinada apenas ao sistema nervoso, antes seria também causa de doença óssea e de um agravamento da anemia.⁽⁶²⁾

Mais tarde, em 1993, Alfrey identificou dois tipos de neurotoxicidade: aguda e clássica. A neurotoxicidade aguda é causada por elevados níveis de Al na solução dialisante, pela ingestão em conjunto de quelantes de fosfato contendo Al e de citrato, ou pelo aumento rápido da concentração de Al no soro após tratamento com desferroxamina (DFO). Rapidamente são visíveis sintomas como confusão mental, fortes convulsões, coma e morte. Os níveis plasmáticos de Al ultrapassam tipicamente 500 µg/L.

O tipo clássico/crónico de neurotoxicidade resulta da intoxicação crónica através da exposição oral ou parenteral ao Al. Os sintomas vão aparecendo gradualmente, podendo também acabar em morte. Ocorre mais ao fim de 3-7 anos em hemodiálise.⁽²⁶⁾

O mecanismo pelo qual o Al exercia os seus efeitos neurotóxicos não era conhecido, mas havia uma proposta de que o Al atuava inibindo a enzima diidropteridina redutase. A inibição desta enzima faria diminuir o conteúdo de tetrahydrobiopterina (a diidropteridina redutase catalisa a redução da 6,7-diidropteridina a 5,6,7,8-tetrahydropteridina), de tirosina (que resulta da hidroxilação da fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase, na presença de tetrahydrobiopterina, que atua como co-fator) e de neurotransmissores (a tirosina é precursora na biossíntese de L-dopa, dopamina e noradrenalina). A neurotoxicidade do Al também poderia envolver alterações nas principais enzimas pós-sinápticas da neurotransmissão colinérgica.⁽⁶³⁾

Observou-se ainda que o Al inibe o transporte de colina nos eritrócitos e diminui a atividade da colina acetiltransferase no tecido nervoso.^(24, 25)

Mais recentemente verificou-se que a exposição a elevados níveis de Al está associada com alterações no sistema nervoso central (SNC), na forma de emaranhados neurofibrilares e placas de proteínas beta amilóide. Em ratos, observou-se que a exposição crónica ao Al resulta na hiperfosforilação de neurofilamentos e na rutura de microtúbulos, (o que pode ser um possível mecanismo de neurotoxicidade).

De notar que atualmente se considera que a acumulação de Al estará associada a outras neuropatologias para além da encefalopatia de diálise, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson.⁽²⁵⁾

A demência de diálise acaba por desaparecer por completo quando são introduzidos controlos rigorosos da qualidade da água, com a remoção do Al e outros elementos vestigiais, conseguida com a utilização de sistemas de osmose inversa. Este problema desapareceu mesmo em países em que os quelantes de fosfato contendo Al continuam a ser usados.⁽³⁶⁾

5.2 Osteodistrofia renal

A osteodistrofia renal pode ocorrer nos doentes em HD como resultado do hiperparatiroidismo secundário. No entanto, também a acumulação do Al no tecido ósseo pode ser a causa dessa osteodistrofia.

O Al afeta o desenvolvimento do osso através de vários mecanismos: 1) age diretamente no osso por induzir deficiência de fosfato (devido à sua ligação ao mesmo); 2) compromete a absorção de cálcio pelo osso e interfere com a normal proliferação dos osteoblastos; 3) diminui a conversão da 25-hidroxivitamina D, a principal forma de vitamina D circulante, na sua forma ativa, 1,25-diidroxivitamina D₃, ao inibir a enzima 25-hidroxivitamina D-1 alfa-hidroxilase.⁽⁵⁷⁾

Indiretamente, ao depositar-se nas glândulas paratiroideias, o Al inibe a secreção e libertação de PTH^(23, 64), produzindo doenças ósseas de baixo *turn-over* (osteomalacia e doença óssea adinâmica), com depósitos do metal visíveis histologicamente.⁽⁶⁴⁾

Os pacientes com suspeita clínica de doença óssea relacionada com o Al devem realizar o teste da DFO. Este teste funciona como um método de estimativa indireta do conteúdo tecidual e ósseo de Al. É útil principalmente para pacientes que recorrem a tratamento contínuo com quelantes de fosfato contendo Al ou que estejam expostos a outras fontes de Al.⁽²³⁾

Caso o resultado do teste da DFO seja negativo, deve-se realizar uma biopsia óssea. É considerada intoxicação por Al quando pelo menos 20% da superfície óssea trabecular está coberta de Al.⁽³⁰⁾

Deve realizar-se também uma coloração histológica com o corante solocromo-azurina, seguida de uma coloração de Perls, para afastar a possibilidade de presença de depósitos de ferro.⁽³⁰⁾

Em Portugal, para controlo da osteodistrofia renal nos doentes em HD a aluminemia deve ser avaliada pelo menos uma vez por ano, e trimestralmente nos doentes que tomem quelantes de fosfato contendo Al. A avaliação da fosfatemia e da calcemia é efetuada todos os meses. A avaliação da PTH é realizada trimestralmente. O Diretor Clínico deve ainda selecionar um marcador de calcificação vascular para avaliar anualmente.⁽¹³⁾

A osteomalacia que tenha como fator etiológico um excesso de Al não responde ao tratamento com vitamina D ou os seus metabolitos ativos. Este tipo de osteomalacia normalmente ocorre em doentes em diálise, mas excepcionalmente pode ocorrer também em pacientes que não estejam em diálise.⁽²⁴⁾

5.3 Anemia

A anemia é definida como uma diminuição na concentração de hemoglobina no sangue para baixo dos valores de referência para o sexo e idade.⁽⁶⁵⁾ Os valores de hemoglobina mais frequentemente considerados para definir anemia são os da Organização Mundial de Saúde (OMS). De acordo com os mesmos, considera-se anemia, no sexo feminino, quando os valores de hemoglobina são <12,0 g/dL (ou o hematócrito é <37%) e, no sexo masculino, quando os valores de hemoglobina são <13,0g/dL (ou o hematócrito é <39%).⁽⁶⁶⁾

Os pacientes com falência renal grave quase sempre desenvolvem anemia. A mais importante causa deste desenvolvimento é a diminuição da secreção renal de eritropoietina (EPO), a hormona responsável por estimular a medula óssea a produzir eritrócitos. Quando os rins estão gravemente lesados, não estão aptos para produzir a quantidade adequada de eritropoietina, o que leva à diminuição no número de eritrócitos.⁽⁷⁾

Nos doentes em HD, a produção insuficiente de EPO e a resposta reduzida à mesma estão frequentemente combinadas com uma deficiência absoluta ou funcional de ferro.⁽⁶⁷⁾ Nestes doentes, para avaliação a gravidade da anemia, deve ser efetuado um hemograma pelo menos uma vez por mês. E, trimestralmente, devem ser avaliadas as reservas de ferro: taxa de saturação da transferrina e a ferritinemia.⁽¹³⁾

A deficiente capacidade de resposta à eritropoietina é atribuída a má nutrição, inflamação e/ou acumulação de recetores antagonistas, achados comuns nos doentes com IRC em HD. A deficiência de ferro ocorre como resultado de deficiente absorção deste metal no trato gastrointestinal e perdas de sangue durante a hemodiálise.⁽⁶⁷⁾ Por estes motivos as reservas de ferro podem estar significativamente mais baixas nos doentes em HD.^(68, 69)

A anemia que estes doentes desenvolvem é na maioria dos casos normocrômica e normocítica. O tratamento consiste habitualmente na administração de suplementos de ferro e de eritropoietina recombinante humana (rHuEPO). No entanto, a terapia oral com ferro não é suficiente para conseguir manter as reservas deste metal, e torna-se necessário o tratamento intravenoso.⁽⁶⁷⁾

Como já referido, o tratamento hemodialítico pode levar a intoxicação por Al, o que fará desenvolver uma anemia característica nos doentes em HD. A intoxicação por Al foi associada aos sinais de anemia no final dos anos 70.⁽⁷⁰⁾ Nesta altura, Elliot e MacDougall⁽⁷¹⁾ reportaram pela primeira vez uma anemia microcítica severa, hipocrômica ou normocrômica, não ferropénica em pacientes com demência de diálise. Na mesma altura, num estado realizado em Edimburgo, Escócia, verificou-se que os valores de Hb nos doentes com demência de diálise diminuíram durante o ano anterior ao aparecimento dos sintomas neurológicos. Esta queda no valor de Hb também se observava em pacientes com muito elevadas concentrações séricas de Al. Como justificação admitia-se que o Al poderia exercer efeitos inibitórios sobre algumas enzimas implicadas na biossíntese do heme.⁽⁶²⁾

A anemia, caracteristicamente microcítica, ficou pois apontada como um possível sinal de aviso de intoxicação por Al desde que neste estudo precedeu a demência de diálise e a encefalopatia.⁽⁵⁹⁾

Posteriormente foram reportados outros casos com a mesma descrição de anemia induzida pelo Al. Todos os pacientes possuíam elevados níveis séricos de Al e mais de metade possuíam depósitos de Al nos macrófagos da medula óssea.^(72, 73) Verificou-se que a anemia era reversível quando era removido o Al existente na solução dialisante, ou era feita uma quelatoterapia com DFO, pelo que o Al foi apontado como o agente etiológico responsável por esta anemia característica.

No final dos anos 80, não se conhecendo o mecanismo através do qual o Al provocava a anemia, foram colocadas várias hipóteses. Pensava-se que o Al poderia diminuir a síntese do heme, inibindo enzimas como a ferroquelatase ou a uroporfirina descarboxilase. Admitia-se também que o Al pudesse interferir no metabolismo do ferro, e os estudos realizados sobre os níveis da desidratase do ácido delta aminolevulínico (ALA-D) eram ainda inconclusivos. No entanto, de estudos *in vitro*, sabia-se que o Al inibia a eritropoiese através de um mecanismo dependente da disponibilidade da transferrina para se ligar ao Al.⁽⁷¹⁾

Atualmente sabe-se que o potencial do Al como agente etiológico em complicações hematológicas está intimamente relacionado com as reservas de ferro. A transferrina, proteína transportadora do ferro, funciona como primeira proteína a que o Al se liga,

contando com mais de 90% de todo o Al ligado, como anteriormente referido.⁽⁵⁷⁾ Mladenovic demonstrou que era necessária a presença de transferrina para que a toxicidade do Al se manifestasse, já que este isoladamente, mesmo em grandes quantidades, não afeta a maturação da célula eritróide.⁽⁷¹⁾ Assim, a eritropoiese pode ser bloqueada através de mecanismos que envolvem a interferência do Al com a homeostasia do Fe⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾, alterações nas enzimas de biossíntese do heme⁽⁷⁷⁾ e/ou desregulação na expressão do recetor da eritropoietina.⁽⁷⁸⁾ O Al afeta quer os progenitores eritroides quer os eritrócitos.⁽⁷⁰⁾

5.4 Perturbações nos níveis de elementos vestigiais

Para além da sobrecarga de Al, nos doentes em diálise podem ocorrer outros desequilíbrios em termos de elementos vestigiais.^(53, 79) Tais desequilíbrios devem-se à reduzida função renal; à proteinúria (leva à perda de elementos que se encontram ligados a proteínas); alterações na absorção gastrointestinal (devido por exemplo à alteração do metabolismo da vitamina D); e ao próprio processo de diálise (p. ex., contaminação da solução dialisante).⁽⁷⁹⁾ Assim, alguns elementos podem ficar em défice, outros em excesso.

O estudo e correção destes desequilíbrios é importante pois eles podem contribuir significativamente para a morbidade e mortalidade observada nos doentes em HD.

Tonelli e colaboradores⁽⁶¹⁾ demonstraram que, comparando com grupos controlo saudáveis, os pacientes em diálise possuíam níveis mais baixos de zinco (Zn) e selénio (Se), dois elementos essenciais, e níveis aumentados de elementos vestigiais tóxicos, como o chumbo (Pb) e o arsénio (As).

A deficiência de Zn está associada a complicações como retardamento da cicatrização de feridas e deficiência da resposta imune, o que contribui para o aumento do risco de infeção observado nos doentes em HD. Este défice pode também conduzir a anorexia, alterações do paladar e perturbações da função cognitiva.

Níveis baixos de Se estão associados com hipertensão, insuficiência cardíaca e doença coronária na população normal. Deficiências graves estão associadas com cardiomiopatia (doença de Keshan).⁽⁵³⁾ Deficiência moderada de Se aumenta a suscetibilidade ao stress oxidativo, relevante nos doentes em diálise, em que o stress oxidativo é comprovadamente elevado.⁽⁶¹⁾

Estas alterações nos níveis de elementos vestigiais também são influenciadas pelas concentrações plasmáticas de Al. Guo e colaboradores⁽⁸⁰⁾ verificaram uma correlação entre

o aumento das concentrações plasmáticas de Al e a diminuição das concentrações de Fe, Zn e Se.

Uma explicação para esta correlação é o facto de metais como Zn, Al e Se se encontrarem ligados à metalotioneína, que regula a absorção intestinal e renal destes metais. Quando há um excesso de Al, pode haver interferência com a capacidade da metalotioneína se ligar ao Se ou ao Zn.⁽⁸⁰⁾ Assim, a sobrecarga de Al é acompanhada da redução das concentrações de Fe e Zn, e indução de dano oxidativo no tecido cerebral.⁽⁸¹⁾

Estas interações entre o Al e os metais essenciais Fe, Zn e Se podem resultar em alterações na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (uma enzima dependente do Cu e do Zn), catalase (dependente do Fe) e a glutathione peroxidase (GPx) (dependente do Se).⁽⁸⁰⁾

5.5 Stress Oxidativo e Inflamação

O stress oxidativo é um processo bioquímico que tem como resultado a formação de espécies reativas de oxigénio na cadeia transportadora de eletrões. Isto é possível por haver uma rutura entre os sistemas pró oxidante e antioxidante.⁽²⁵⁾

Nos doentes com IRC, a elevada taxa de morbilidade e de mortalidade está associada a complicações que incluem stress oxidativo, inflamação e resposta inflamatória deficiente.^(82, 83) O Al presente no soro, como referido atrás, pode interferir com a distribuição de metais essenciais, provocando consequentemente stress oxidativo e alterações na resposta inflamatória e no funcionamento do sistema imune nos doentes em HD.^{(80) (70)}

Guo e Wang⁽⁸⁰⁾ estudaram a relação entre as concentrações plasmáticas de Al e variáveis como a concentração de antioxidantes, o stress oxidativo e o estado inflamatório em doentes com IRC em HD e em grupos controlo (indivíduos saudáveis).

Em síntese, verificou-se que marcadores de stress oxidativo como o malonaldeído (MDA) (marcador da peroxidação lipídica) e proteínas carboniladas (marcador do dano oxidativo nas proteínas) estavam aumentados nos doentes em HD. Nestes doentes também se verificava um aumento da atividade da enzima SOD e uma significativa diminuição da GPx.

Nos doentes em HD foram ainda encontradas concentrações aumentadas de proteína C reativa (indicador de má nutrição ou inflamação), aumento do fator de necrose tumoral *alfa* (TNF-*alfa*) e dos níveis de interleucina 5 (IL5).

Por fim, neste estudo observaram-se correlações negativas entre os níveis plasmáticos de Al e de Se, Zn, Fe, betacaroteno, vitamina C, vitamina E e GSH.⁽⁸⁰⁾

Importa destacar que esta associação entre a concentração plasmática de Al e o estado do sistema antioxidante apenas foi evidenciada nos últimos anos. É por isso importante continuar a tentar perceber o mecanismo concreto pelo qual o Al pode ser responsável por respostas alteradas nos doentes em HD.

6. Tratamento da intoxicação por Al

Para o tratamento da intoxicação por Al em doentes em diálise as normas da *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) recomendam a DFO.⁽⁵⁰⁾

Até aos anos 60 apenas se conhecia a utilidade da DFO para tratamento da hemocromatose (sobrecarga de Fe). A introdução nos anos 80 da DFO como agente quelante para tratamento da intoxicação por Al foi um passo muito importante, pois até então a demência de diálise era invariavelmente fatal.⁽⁸⁴⁾

A DFO é uma sideroamina natural obtida a partir da bactéria *Streptomyces pilosus*. É geralmente usada sob a forma de sulfonato metano de desferrioxamina. A DFO forma com o Al complexos hidrossolúveis ultrafiltráveis (aluminoxamina) que são removidos na diálise.^(30, 85)

A dose a administrar é de 5 mg/kg/semana. Esta é a dose padrão de acordo com as normas KDOQI.⁽⁵⁰⁾ Se os níveis de Al forem inferiores a 300 ng/ml, efetua-se na última hora da sessão hemodialítica uma infusão intravenosa (IV) lenta. Para níveis de Al superiores a 300 ng/ml faz-se uma perfusão lenta nas 5 horas antecedentes à sessão hemodialítica.⁽⁸⁶⁾

Como atrás já foi referido, a DFO também se usa para diagnóstico da intoxicação por Al. A administração de DFO permite evidenciar uma eventual sobrecarga de Al no osso, comparando os valores do Al sérico antes e 40 horas após a injeção de DFO.⁽⁸⁶⁾

7. Técnicas usadas na determinação de Al

7.1 Considerações gerais

Os métodos espectroscópicos podem ser divididos em dois grandes grupos: espectrometria atômica ótica e espectrometria de massas atômicas.⁽⁸⁸⁾

Para determinação da concentração sérica de Al, atualmente a generalidade dos laboratórios recorre a: 1) Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (EAA-AE); 2) Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).⁽⁸⁷⁾ Por este motivo, estas duas técnicas serão destacadas e detalhadamente descritas.

7.2 EAA-AE

A espectroscopia atômica é usada tanto em determinações quantitativas como qualitativas de mais de 70 elementos e permite detetar quantidades na ordem dos mg/L (ppm) ou na ordem dos µg/L (ppb) consoante o processo de atomização usado.⁽⁸⁸⁾

Na espectroscopia atômica, a determinação das espécies elementares é feita no estado gasoso, no qual os átomos ou iões se encontram bem separados. A primeira etapa de todos os procedimentos de espectroscopia atômica é pois a atomização, que é o processo no qual uma amostra é convertida em átomos ou iões na fase gasosa.⁽⁸⁸⁾ Em EAA, para a atomização das amostras são usados essencialmente dois sistemas: a chama e a câmara de grafite.⁽⁸⁸⁾

Para os átomos e iões na fase gasosa, a absorção ou emissão de radiação eletromagnética (REM) decorre simplesmente de transições eletrónicas. Em EAA, o que interessa medir é a quantidade de energia/radiação que é absorvida. Se a luz, com um comprimento de onda (λ) específico atingir um átomo que esteja no seu estado fundamental, há absorção de luz por esse átomo, o que o promove a um estado excitado (Fig. 9). Após alguns nanossegundos, o átomo volta ao estado fundamental (configuração estável), transferindo o excesso de energia para outros átomos ou moléculas do meio.

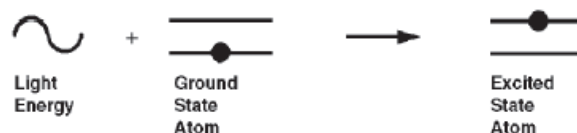


Figura 9. Processo de absorção atômica

Aumentando o número de átomos existentes no trajeto da luz, aumenta também a quantidade de luz absorvida, de acordo com a lei de Beer, que enuncia que a absorvância (A) é diretamente proporcional à concentração (c) do analito responsável pela absorção e ao percurso (b) da luz no meio absorvente ($A = abc$). Nesta equação a constante a é a chamada absortividade do analito e é diferente consoante o comprimento de onda.^(88, 89)

Assim, medindo a quantidade de luz absorvida por uma população de átomos de um dado elemento, é possível determinar quantitativamente esse elemento na amostra.⁽⁸⁸⁾

A história da espectrometria atômica começa com experiências realizadas por Joannes M. Marci em 1648, através de observações do arco-íris.⁽⁹⁰⁾ Seguiram-se inúmeros estudos visando conhecer o processo de emissão e absorção de energia radiante pelos átomos, tendo Kirchoff e Bunsen, em 1860, conseguido descrever este processo usando uma chama.⁽⁹⁰⁾ Após esta descoberta, a atenção recaiu sobre a emissão atômica, tendo passar a ser através desta técnica que eram efetuadas muitas determinações de metais, principalmente na indústria metalúrgica.⁽⁹⁰⁾

Mas a espectrometria de absorção atômica (EAA) sofreu uma grande evolução nos anos 50 e 60 do século XX.⁽⁹¹⁾ Foi no início dos anos 50 que Alan Walsh, um cientista australiano, introduziu a EAA.⁽⁹¹⁾ O primeiro espectrofotómetro de absorção atômica comercial foi introduzido em 1959, o que desencadeou a utilização generalizada desta técnica.⁽⁸⁸⁾ Com o desenvolvimento da mesma foi possível, por exemplo, passar a efetuar de um modo rápido a determinação do cálcio e magnésio no soro sanguíneo humano, determinações até então bastante complexas e demoradas.⁽⁹¹⁾

À medida que a utilização da EAA se tornava uma prática comum e se mostrava tão promissora, o cientista russo Boris L'vov dedicou-se à melhoria e aperfeiçoamento do processo de atomização, até então envolvendo apenas a atomização em chama. L'vov introduziu um novo conceito, a atomização eletrotérmica, em 1959. Ele demonstrou que se depositasse a amostra na superfície de um eléctrodo de grafite e se de seguida o introduzisse num tubo de grafite revestido com folha de tântalo e o aquecesse eletricamente, a atomização da amostra resultava na formação de uma nuvem atômica mais concentrada, o consumo da amostra era menor e conseguia-se uma muito maior sensibilidade.⁽⁹¹⁾ Ou seja, usando um “forno de grafite” aquecido eletricamente como sistema de atomização (sistema para produzir os átomos a partir da amostra) era possível conseguir uma redução muito significativa nos limites de deteção.⁽⁹⁰⁾

Princípio da técnica de EAA-AE

Na sua versão atual, em EAA-AE a amostra é atomizada dentro de um pequeno tubo de grafite colocado no compartimento da amostra do espectrofotómetro de absorção atómica, entre uma fonte de luz e o detetor (Fig. 10). Através de um pequeno orifício existente na parede do tubo é introduzido um pequeno volume de amostra (15-20 µL). Seguidamente o tubo é aquecido por passagem de corrente elétrica (daí dizer-se que se trata de um sistema de atomização eletrotérmica), segundo um programa sequencial de temperaturas, até o analito se dissociar em átomos. Nessa fase é medida a absorção de luz pelos átomos (absorção atómica), obtendo-se um sinal transiente, isto é, com a forma de pico.

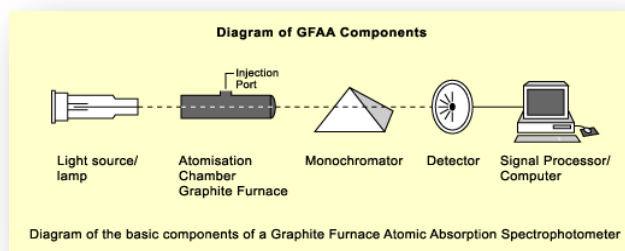


Figura 10. Diagrama básico de um equipamento de EAA-AE

Atualmente estão disponíveis tubos de grafite com aquecimento transversal (THGA – do inglês *transversely heated grafite atomizer*) que, ao contrário dos outros, aquecidos longitudinalmente (Fig.11) permite a atomização da amostra num ambiente termicamente mais homogéneo.



Figura 9. Tubos de grafite com aquecimento longitudinal e com aquecimento transversal (THGA).

*Plataforma de L'vov

Como se referiu, é necessário estabelecer um programa de aquecimento apropriado. O qual tipicamente inclui uma etapa de secagem (evaporação do solvente da amostra), uma etapa de pirólise (destruição da matéria orgânica e eliminação de muitos dos componentes da matriz) e a etapa de atomização (Fig. 12). É importante referir que cada elemento possui um programa de temperaturas específico, e que o comportamento eletrotérmico desse elemento depende ainda da natureza da amostra.

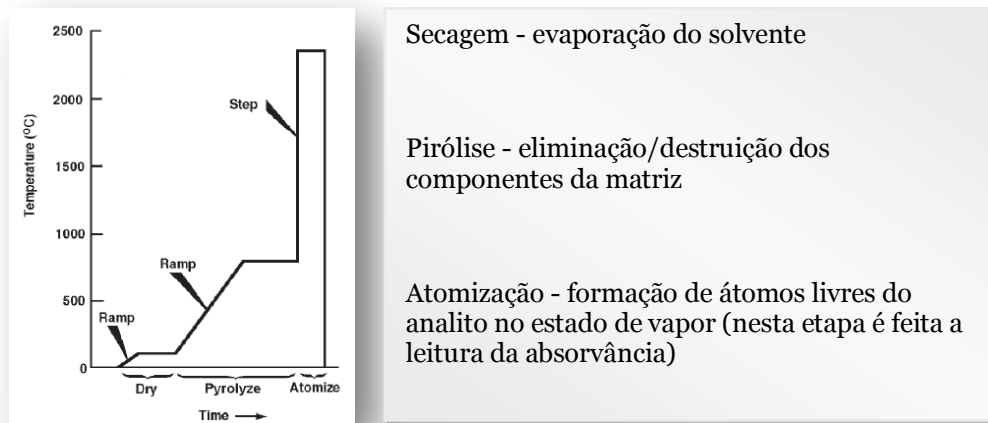


Figura 12. Programa de temperaturas do forno de grafite em EAA-AE: etapas de secagem, pirólise e atomização⁽⁹²⁾

EAA-AE e a determinação do Al no soro

A determinação de Al no soro reveste-se de alguma dificuldade, uma vez que o soro é uma matriz complexa: elevada concentração de aniões (principalmente cloreto), de catiões (sódio, potássio, cálcio) e de proteínas (que pode originar acumulação de resíduos carbonosos dentro do tubo de grafite).

Estas dificuldades puderam ser ultrapassadas através de sucessivos avanços na tecnologia do forno de grafite (atomização eletrotérmica), em particular com a introdução do conceito STPF (do inglês “stabilized temperature platform furnace”). Este conceito agrega um conjunto de condições que devem ser usadas para garantir determinações livres de interferências em atomização eletrotérmica. Entre estas destaca-se o uso de uma plataforma (plataforma de L’vov), na qual a amostra é efetivamente depositada, e que visa atrasar a atomização do analito o máximo possível até se alcançar o equilíbrio térmico no interior do tubo de grafite, bem como a correção de background por efeito de Zeeman e o uso dos chamados “modificadores de matriz”. Estes têm como principal função facilitar a eliminação de interferências provocadas pela matriz (soro) e estabilizar termicamente o analito para que se possam usar temperaturas de pirólise mais elevadas. No caso concreto do Al, promovem a sua conversão a uma forma estável, evitando a sua perda como cloreto volátil, facilitando ao mesmo tempo a eliminação do cloreto durante a pirólise.⁽⁹³⁾

De resto nas determinações por EAA-AE procede-se com é habitual na generalidade das metodologias analíticas. Primeiro são preparadas soluções padrão e obtém-se uma curva de calibração. Depois, em idênticas condições são lidas as amostras. Para a

determinação de Al no soro as amostras não são injetadas diretamente, antes são previamente diluídas com uma solução diluente/modificador químico. Uma solução habitualmente usada para este fim é constituída por 0,1% (v/v) de HNO₃, 0,01% (v/v) de Triton X-100 (tensoativo) e 0,2% (m/v) de Mg(NO₃)₂.⁽⁹⁴⁾

Tal como acontece para a generalidade das determinações em Análises Clínicas, foi necessário estabelecer valores de referência (valores “normais”) para o Al no soro, de modo a se poderem interpretar os casos de acumulação tóxica. Uma vez que a EAA-AE apenas se tornou amplamente disponível a partir anos 70, até lá as determinações de Al no soro eram realizadas usando outras técnicas, como a espectrometria UV/Vis, análise por ativação neutrónica (AAN) ou a espectrometria de emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES, do inglês “*inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry*”). Na tabela 4 indicam-se valores que foram sendo publicados na literatura como valores “normais” de Al no soro, os quais, sabemos hoje, eram na realidade muito incorretos (muito elevados). Tal deve-se certamente a não terem sido tomadas as precauções necessárias para evitar a contaminação das amostras. Aliás, se tal tivesse acontecido, as concentrações de Al naturalmente presentes no soro não seriam quantificáveis pelas técnicas então usadas, por insuficiente sensibilidade.

Tabela 4. Alguns valores "normais" de Al no soro publicados até 1985⁽⁹⁵⁾

Ano	Técnica	 Al mg/L
1960	UV/Vis	172
1962	ICP-AES	800
1964	ICP-AES	400
1970	EAA-AE	240
1970	AAN	1460
1971	ICP-AES	109
1972	EAA-AE	12
1972	AAN	72
1974	EAA-AE	38
1976	EAA-AE	14,2
1977	EAA-AE	6
1978	EAA-AE	28
1978	EAA-AE	3,7
1985	EAA-AE	2

Com o aparecimento da EAA-AE tornou-se possível determinar fiavelmente as concentrações de Al no soro, uma vez que esta técnica, dotada de grande sensibilidade,

permitia a determinação de baixas concentrações deste metal (na ordem dos $\mu\text{g/L}$). Consequentemente, tornou-se possível a monitorização dos doentes em HD e o diagnóstico precoce da sobrecarga de Al, bem como estudar a etiologia, a prevenção e o tratamento da intoxicação alumínica.⁽⁹⁶⁾

A EAA-AE foi e é amplamente utilizada para a determinação de Al no soro. Não tem um custo muito elevado, e permite determinar concentrações de elementos vestigiais usando pequenos volumes de amostra (10-20 μL) e com elevada seletividade e sensibilidade (limites de deteção na ordem dos ng/L em muitos casos).⁽⁹¹⁾ No entanto, é uma técnica de análise monoelementar (permite determinar apenas um elemento de cada vez), é morosa (a análise de uma amostra demora 5-6 minutos) e para além do problema da deterioração do tubo de grafite (que pode causar algum “drift” e obriga à sua substituição periódica), sofre de algumas interferências de matriz e de problemas de contaminação (embora este não seja um problema intrínseco da técnica, antes resultado de se estarem a medir concentrações muito baixas).^(34, 87)

7.3 ICP-MS

Na espectrometria de massas atómicas é usado o movimento dos iões em campos eletromagnéticos para os separar segundo a sua relação massa-carga. Para isso, é necessário que os componentes da amostra sejam previamente convertidos em iões na fase gasosa (em vez de átomos, como acontece em EAA). Nos sistemas de atomização de elevada temperatura, como por exemplo um plasma, uma fração significativa dos átomos produzidos é subsequentemente transformada em iões, normalmente iões positivos monovalentes.

A versão mais corrente desta técnica é a ICP-MS. O plasma consiste num gás (geralmente árgon), a elevada temperatura (6000-10000 K), extensamente ionizado (por ação de um campo magnético), com uma elevada concentração de eletrões e iões. Em ICP-MS combina-se então uma fonte de alta temperatura (o plasma, para produzir os iões) com um espectrómetro de massa (para separar e quantificar esses iões).

Na análise de amostras líquidas, estas passam por um processo de nebulização antes de serem levadas até ao plasma. Aí, ocorre uma sequência de quatro processos que termina na produção dos iões: dessolvatação (evaporação do solvente), vaporização (passagem da matéria da amostra para o estado gasoso), atomização (cisão das moléculas para originar átomos) e ionização (perda de eletrões por parte dos átomos). Os iões formados passam depois o espectrómetro de massa, onde são separados de acordo com a sua razão massa-carga, sendo a concentração do elemento na amostra proporcional ao número de iões que

Assim, na determinação sérica do Al são necessários alguns cuidados especiais. Em primeiro lugar na preparação do doente. É importante que o paciente interrompa, sob a supervisão do seu médico, a toma de alguns produtos, como suplementos nutricionais, uma vez que estes podem causar interferência.

A colheita do sangue deve ser feita para tubos devidamente descontaminados (preparados no laboratório) ou tubos comerciais certificados para o efeito.

Após centrifugação, o soro/plasma deve ser transferido para um tubo de transporte igualmente devidamente descontaminado. Em tubos devidamente fechados, as amostras podem ser conservadas à temperatura ambiente (por curto espaço de tempo). Caso contrário, devem ser ou refrigeradas ou congeladas.

Atualmente é amplamente aceite que valores inferiores a 15 µg/L não têm qualquer significado clínico (são valores “normais”). Depois, é indispensável ter sempre em consideração que valores elevados podem dever-se simplesmente a uma contaminação da amostra, pelo que deve ser repetida a análise, fazendo uma nova colheita. Uma concentração Al de 50 µg/L é já considerada como indicadora de acumulação.⁽⁹⁷⁾

7.5 Determinação da concentração de Al na solução dialisante

A determinação da concentração de Al nas soluções dialisantes é também um desafio, pois é necessário determinar uma pequena concentração do metal no seio de uma solução com elevada concentração de sais inorgânicos.⁽⁹⁵⁾ As soluções dialisantes têm uma matriz complexa com elevados níveis de sódio, cálcio, magnésio e potássio, assim como cloreto, acetato ou bicarbonato, lactato e glucose, o que faz com que sejam difíceis de analisar, devido a interferências de matriz.⁽³⁴⁾

Para a determinação da concentração de Al como contaminante nas soluções dialisantes é recomendada a utilização de ICP-MS, pois não necessita de pré-concentração da amostra (possui bons limites de deteção).⁽⁹⁸⁾

8. Conclusão

Até aos anos 80 do século XX, a intoxicação por Al foi responsável por graves complicações nos doentes em HD, nomeadamente demência de diálise, osteomalacia e anemia, muitas vezes fatais.

A solução dialisante foi praticamente desde sempre reconhecida como a principal fonte de exposição ao Al por parte dos doentes em HD. Os quelantes de fosfato contendo Al e certos antiácidos eram apontados como outras fontes com significado.

Atualmente o problema da intoxicação alumínica nos doentes em HD está grandemente resolvido. O aparecimento de sistemas de purificação de água com grande eficiência na remoção de Al (osmose inversa) deu um forte contributo para este facto.

Um forte contributo para a resolução deste problema foi também dado pela evolução das técnicas analíticas, com grande destaque para o aparecimento nos anos 70 da espectrofotometria de absorção atómica com atomização eletrotérmica (EAA-AE). Até então as técnicas disponíveis não dispunham da sensibilidade e especificidade adequadas para se efetuar a determinação de Al no soro de modo fiável.

No sentido de proteger os doentes, a legislação continua a exigir a monitorização periódica das concentrações séricas de Al nos doentes em HD. A técnica de EAA-AE e a mais recente técnica de ICP-MS são as mais usadas para o efeito.

De um ponto de vista prático, o principal problema associado à determinação de Al no soro é a grande possibilidade de haver contaminação das amostras. Efetivamente, trata-se de determinar concentrações muito baixas, na ordem dos $\mu\text{g/L}$, sendo o Al, pelo contrário, um elemento muito abundante no meio ambiente. A prevenção da contaminação das amostras é atualmente o maior desafio para os analistas envolvidos na tarefa de monitorização dos níveis séricos de Al nos doentes em HD.

9. Referências Bibliográficas

1. Javed F, Savkin AV, Chan GS, Mackie JD, Lovell NH. Recent advances in the monitoring and control of haemodynamic variables during haemodialysis: a review. *Physiol Meas* 2012 Jan; 33 (1): R1-R31.
2. Urine Formation by the kidneys: glomerular filtration, renal blood flow, and their control. In: Hall J, Guyton A, editors. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 307-9.
3. Gaw A, Cowan RA, O' Reilly DST, Stewart MJ, Sheperd J. *Bioquímica Clínica*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
4. The Kidneys and how they work. Disponível em <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/yourkidneys/> [acedido em 06-06-2012]
5. Alebiosu CO, Ayodele OE. The global burden of chronic kidney disease and the way forward. *Ethn Dis* 2005; 15 (3): 418-23.
6. About Chronic Kidney Disease. Disponível em <http://www.kidney.org/kidneydisease/aboutckd.cfm> [acedido em 06/06/2012]
7. Kidney Diseases and Diuretics. In: Hall J, Guyton A, editors. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 402-15.
8. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int* 2004 Oct; 66 (4): 1310-4.
9. Dialysis Concepts: A review for clinical pharmacists. Disponível em http://www.uspharmacist.com/continuing_education/ceviewtest/lessonid/107627/ [acedido em 13/07/2012]
10. Doenças renais. Disponível em <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/informacao-diagnostico/renais/> [acedido em 06/06/2012]
11. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009 Aug; (113): S1-130.
12. Treatment Methods for Kidney Failure: Hemodialysis. Disponível em <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/hemodialysis/> [acedido em 05-05-2012]
13. Manual de Boas Práticas de Diálise Crónica 2011. Colégio de Especialidade de Nefrologia da Ordem dos Médicos; 2011.
14. Diálise Peritoneal. Disponível em <http://www.manualmerck.net/?id=149&cn=2106&ss=> [acedido em 05/05/2012]

15. Diálise peritoneal. Disponível em http://www.merckmanuals.com/home/kidney_and_urinary_tract_disorders/dialysis/dialysis.html [acedido em 06/09/2012]
16. Hemodiálise. Disponível em <http://www.manualmerck.net/?id=149&cn=1183&ss=> [acedido em 05/05/2012]
17. Hemodialysis access. Disponível em <http://www.kidney.org/atoz/content/hemoaccess.cfm> [acedido em 10/06/2012]
18. FAV e PVA Disponível em <http://www.cvtsa.com/ListofConditions/A-444-176.html> [acedido em 06/09/2012]
19. Hemodiálise. Disponível em http://www.merckmanuals.com/home/kidney_and_urinary_tract_disorders/dialysis/dialysis.html [acedido em 06/09/2012]
20. Physiology of the kidneys. In: Fox S, editor. Human Physiology. 8th ed: Mc Graw Hill; 2003. p. 522-52.
21. Hoenich N, Thijssen S, Kitzler T, Levin R, Ronco C. Impact of water quality and dialysis fluid composition on dialysis practice. *Blood Purif* 2008; 26 (1): 6-11.
22. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant* 2003 Aug; 18 Suppl 7: vii21-5; discussion vii56.
23. Lima EM, Rocha OGF, Barros JRC, Gurbuzatik LTC, Silva MLR, Resende CCS, et al. Intoxicação por alumínio na insuficiência renal crônica. *J Bras Nefrol* 2001; 23 (1): 8-17.
24. Wills MR, Savory J. Water content of aluminum, dialysis dementia, and osteomalacia. *Environ Health Perspect* 1985 Nov; 63: 141-7.
25. Kumar V, Gill KD. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Arch Toxicol* 2009 Nov; 83 (11): 965-78.
26. Toxicological Profile for aluminum, Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); 2008.
27. Aluminum. Disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/165315-overview> [acedido em 02/09/2012]
28. Nayak P. Aluminum: impacts and disease. *Environ Res* 2002 Jun; 89 (2): 101-15.
29. Drueke TB. Intestinal absorption of aluminium in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 2: 13-6.
30. Barreto EC, Araújo SMHA. Intoxicação alumínica na DRC. *J Bras Nefrol* 2011; 33 (2): 211-5.
31. Alfrey AC, Hegg A, Craswell P. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Am J Clin Nutr* 1980 Jul; 33 (7): 1509-16.

32. Ohman LO, Martin RB. Citrate as the main small molecule binding Al^{3+} in serum. *Clin Chem* 1994 Apr; 40 (4): 598-601.
33. Bondy SC. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neurotoxicology Sep*; 31 (5): 575-81.
34. Komarek J, Cervenka R, Ruzicka T, Kuban V. ET-AAS determination of aluminium in dialysis concentrates after continuous flow solvent extraction. *J Pharm Biomed Anal* 2007 Nov; 45 (3): 504-9.
35. Fernandez-Martin JL, Canteros A, Serrano M, Gonzalez-Carcedo A, Diaz-Corte C, Cannata Andia JB. Prevention of aluminium exposure through dialysis fluids. Analysis of changes in the last 8 years. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 Suppl 3: 78-81.
36. Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, van Eps CL, et al. Do aluminium-based phosphate binders continue to have a role in contemporary nephrology practice? *BMC Nephrol* 2011; 12: 20.
37. Platts MM, Goode GC, Hislop JS. Composition of the domestic water supply and the incidence of fractures and encephalopathy in patients on home dialysis. *Br Med J* 1977 Sep; 2 (6088): 657-60.
38. Ledebro I. Purification of dialysis fluid: historical background and perspective. *Blood Purif* 2009; 27 Suppl 1: 17-9.
39. Appendix: Water purification methods. European Best Practice Guidelines for Haemodialysis Part 1; 2002.
40. Glossário Ambiental. Disponível em <http://www.aguasdoalgarve.pt/content.php?c=115> [acedido em 30/07/2012]
41. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, JER J. Revisão/ Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol* 1996; 18 (2): 180-8.
42. Soni M. G. W, S. M., Flamm, G. W., Burdock, G.A. Safety Evaluation of Dietary Aluminum. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001 Feb; 33 (1): 66-79.
43. Shigematsu T. Lanthanum carbonate effectively controls serum phosphate without affecting serum calcium levels in patients undergoing hemodialysis. *Ther Apher Dial* 2008 Feb; 12 (1): 55-61.
44. Frazao JM, Adragao T. Non-calcium-containing phosphate binders: comparing efficacy, safety, and other clinical effects. *Nephron Clin Pract* 2012; 120 (2): c108-19.
45. Ferreira A. Diagnóstico Clínico e Laboratorial do Hiperparatioidismo secundário. *J Bras Nefrol* 2008; 30 (1): 11-7.
46. Coladonato JA. Control of hyperphosphatemia among patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2005 Nov; 16 (2): S107-14.

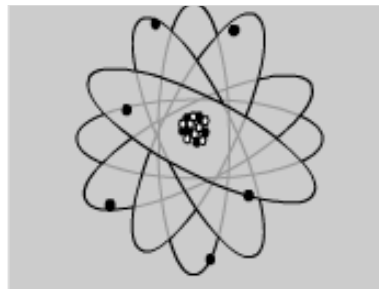
47. Renagel (sevelamer hydrochloride). Disponível em <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=10488#section-2> [acedido em 12/08/2012]
48. Ogata H, Koiwa F, Shishido K, Kinugasa E. Combination therapy with sevelamer hydrochloride and calcium carbonate in Japanese patients with long-term hemodialysis: alternative approach for optimal mineral management. *Ther Apher Dial* 2005 Feb; 9 (1): 11-5.
49. Renvela (sevelamer carbonate). Disponível em <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=46805> [acedido em 06/08/2012]
50. Kan WC, Chien CC, Wu CC, Su SB, Hwang JC, Wang HY. Comparison of low-dose deferoxamine versus standard-dose deferoxamine for treatment of aluminium overload among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2010 May; 25 (5): 1604-8.
51. Braun J. Extraosseous calcification in patients with chronic renal failure-no escape? *Nephrol Dial Transplant* 2005 Oct; 20 (10): 2054-9.
52. Bushinsky DA. Contribution of intestine, bone, kidney, and dialysis to extracellular fluid calcium content. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010 Jan; 5 Suppl 1: S12-22.
53. Kasama RK. Trace minerals in patients with end-stage renal disease. *Semin Dial* 2010 Nov-Dec; 23 (6): 561-70.
54. Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. *Pharm Biotechnol* 1995; 6: 229-48.
55. Bohrer D, Bertagnolli DC, Oliveira SM, Nascimento PC, Carvalho LM, Garcia SC, et al. Role of medication in the level of aluminium in the blood of chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Apr; 24 (4): 1277-81.
56. Sandhu G, Djebali D, Bansal A, Chan G, Smith SD. Serum concentrations of aluminum in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2011 Mar; 57 (3): 523-5.
57. Gura KM. Aluminum contamination in products used in parenteral nutrition: has anything changed? *Nutrition* 2010 Jun; 26 (6): 585-94.
58. Gault PM, Allen KR, Newton KE. Plasma aluminium: a redundant test for patients on dialysis? *Ann Clin Biochem* 2005 Jan; 42 (Pt 1): 51-4.
59. Parkinson IS, Ward MK, Kerr DN. Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: the aluminum intoxication syndrome during regular haemodialysis. *J Clin Pathol* 1981 Nov; 34 (11): 1285-94.
60. Alfrey AC, LeGendre GR, Kaehny WD. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N Engl J Med* 1976 Jan; 294 (4): 184-8.

61. Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2009 May; 7: 25.
62. Elliott HL, Dryburgh F, Fell GS, Sabet S, Macdougall AI. Aluminium toxicity during regular haemodialysis. *Br Med J* 1978 Apr 1; 1101-3.
63. Marquis JK. Aluminum neurotoxicity: an experimental perspective. *Bull Environ Contam Toxicol* 1982 Jul; 29 (1): 43-9.
64. Ponce P. O tratamento da osteodistrofia renal. Finalmente interessante depois de todos estes anos. *Rev Port Nefrol Hipert* 2004; 18 (1): 7-10.
65. Hoffbrand A.V. MPAH. *Essential Haematology*. 6 ed.: Wiley-Blackwell; 2011.
66. Benoist B, McLean E, Egli I, Cosgwell M. Worldwide prevalence of anemia 1993-2005. World Health Organization; 2008.
67. Thakuria M, Ofsthun NJ, Mullon C, Diaz-Buxo JA. Anemia management in patients receiving chronic hemodialysis. *Semin Dial* 2011 Sep-Oct; 24 (5): 597-602.
68. Anaemia evaluation. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 (2): ii2-ii5.
69. Goicoechea M, Martin J, de Sequera P, Quiroga JA, Ortiz A, Carreno V, et al. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1998 Oct; 54 (4): 1337-43.
70. Vota DM, Crisp RL, Nesse AB, Vittori DC. Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *J Cell Biochem* 2012 May; 113 (5): 1581-9.
71. Mladenovic J. Aluminum inhibits erythropoiesis in vitro. *J Clin Invest* 1988 Jun; 81 (6): 1661-5.
72. Kaye M. Bone marrow aluminium storage in renal failure. *J Clin Pathol* 1983 Nov; 36 (11): 1288-91.
73. Drueke TB, Lacour B, Touam M, Jucquel JP, Plachot JJ, Cournot-Witmer G, et al. Effect of aluminum on hematopoiesis. *Kidney Int Suppl* 1986 Feb; 18: S45-8.
74. Perez G, Garbossa G, Di Risio C, Vittori D, Nesse A. Disturbance of cellular iron uptake and utilisation by aluminium. *J Inorg Biochem* 2001 Nov; 87 (1-2): 21-7.
75. Perez G, Garbossa G, Sasseti B, Di Risio C, Nesse A. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells. *J Inorg Biochem* 1999 Aug 30; 76 (2): 105-12.
76. Perez G, Pregi N, Vittori D, Di Risio C, Garbossa G, Nesse A. Aluminum exposure affects transferrin-dependent and -independent iron uptake by K562 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005 Aug; 1745 (1): 124-30.

77. Schroeder TM, Caspers ML. Kinetics of aluminum-induced inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase in vitro. *Biochem Pharmacol* 1996 Sep 27; 52 (6): 927-31.
78. Vittori D, Pregi N, Perez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2005 Mar 22; 1743 (1-2): 29-36.
79. D'Haese PC, Couttenye MM, Lamberts LV, Elseviers MM, Goodman WG, Schrooten I, et al. Aluminum, iron, lead, cadmium, copper, zinc, chromium, magnesium, strontium, and calcium content in bone of end-stage renal failure patients. *Clin Chem* 1999 Sep; 45 (9): 1548-56.
80. Guo CH, Wang CL. Plasma aluminum is a risk factor for oxidative stress and inflammation status in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2011 Nov; 44 (16): 1309-14.
81. Ahmed SS, Santosh W. Metallomic profiling and linkage map analysis of early Parkinson's disease: a new insight to aluminum marker for the possible diagnosis. *PLoS One* 2010 22 Jun; 5 (6): e11252.
82. Al Wakeel JS, Mitwalli AH, Al Mohaya S, Abu-Aisha H, Tarif N, Malik GH, et al. Morbidity and mortality in ESRD patients on dialysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002 October-December; 13 (4): 473-7.
83. Rambod M, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Combined high serum ferritin and low iron saturation in hemodialysis patients: the role of inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008 Nov; 3 (6): 1691-701.
84. Barata JD, D'Haese PC, Pires C, Lamberts LV, Simoes J, De Broe ME. Low-dose (5 mg/kg) desferrioxamine treatment in acutely aluminium-intoxicated haemodialysis patients using two drug administration schedules. *Nephrol Dial Transplant* 1996 Jan; 11 (1): 125-32.
85. RCM Desferal. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2459&tipo_doc=rcm [acedido em 06/09/2012]
86. Desferroxamina. Disponível em <http://www.infarmed.pt/prontuario/navegavalores.php?id=1480&edcipt=1&flag=1> [acedido em 03/08/12]
87. Kruger PC, Parsons PJ. Determination of serum aluminum by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison between Zeeman and continuous background correction systems. *Spectrochim Acta Part B* 2006: 288-96.
88. Skoog DA, West DM, Holler FJ, SR C. Fundamentos de Química Analítica. Espectroscopia Atómica. São Paulo: Thomson Learning Lda; 2006. p. 797-827.

89. Mostra CJGO. Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atómica na análise de metais e metalóides em amostras biológicas. Preparação de amostras por digestão com a tecnologia microondas [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa; 2009.
90. Amorim FAC, Lobo IP, Santos VLCS, Ferreira SLC. Espectrometria de absorção atómica: o caminho para determinações multi-elementares. *Quim Nova* 2008; 31 (7): 1784-90.
91. Ribeiro AS, Arruda MAZ, Cadore S. Espectrometria de absorção atómica com atomização eletrotérmica em filamento de tungsténio. Uma revisão crítica. *Quim Nova* 2002; 25 (3): 396-405.
92. Beaty RD, Kerber JD. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. 2th ed. Norwalk: The Perkin-Elmer Corporation; 1993.
93. Almeida AA, JLFC L. Elimination of the carbon build-up effect in the ETAAS analysis of low diluted serum samples using an in situ wet digestion with tetramethylammonium hydroxide. Application to aluminium determination. *J Anal At Spectrom* 2000; 15: 1019-24.
94. Davidowski L. Determination of aluminum in serum in customer-validated applications using THGA and longitudinal Zeeman atomic absorption. Perkin Elmer; 2011.
95. Chromatographic separations coupled to atomic detectors: trace element speciation in biological systems. In: Sanz-Medel A, editor. *Flow Analysis with atomic spectrometric detectors*: Elsevier; 1992. p. 409-11.
96. Taylor A. Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements. *J Anal At Spectrom* 2006; 21: 381-3.
97. Aluminum, Serum. Disponível em <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/0099266.jsp> [acedido em 15/07/2012]
98. Trentini PL, Ascanelli PL, Zanforlini B, Venturini F, Bucci G, Fagioli F. Determination of Aluminium by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Serum of Patients Treated by Haemodialysis, Dialysis Solutions and Tap Water, and a Comparison with Atomic Absorption Spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1993; 8: 905-9.
99. Thomas RJ. Clinical atomic spectroscopy. Determining the link between trace metals and human disease. *Today's Chemist at work* 2002; 11 (1): 37-8, 41-2.

Relatório de Estágio



Laboratório de Análises Clínicas
Dra. Susana Pinto

Ana Isabel Magalhães Rodrigues

Estágio orientado por: Doutora Susana Pinto

Janeiro-Abril 2012

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Franklim Marques e à Professora Doutora São José por terem tornado este estágio possível.

À Dra. Susana Pinto, por ter aceite prontamente a orientação deste estágio.

À Dra. Inês Ribeiro, pela disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos, pelo apoio e ajuda constantes.

À Mariana e ao Miguel, pelo apoio, paciência e pelos sorrisos.

À Rita, pela companhia e amizade.

A todos os outros elementos do laboratório, e a todos aqueles que direta ou indiretamente, me apoiaram e contribuíram para que este trabalho fosse avante.

Aos meus pais e irmão pelo carinho, pela confiança, e força...

Índice Geral

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vii
Introdução	1
Fase Pré Analítica, Analítica e Pós Analítica	2
Capítulo 1. Microbiologia.....	4
Condições de Assépsia	4
Meios de Cultura.....	4
1.1. Urina.....	5
1.1.1 Exame bacteriológico de urina.....	5
1.1.2 Pesquisa de Antígeno Clamídia em Urina Masculina	11
1.1.3 Pesquisa de BK direto na urina.....	12
1.2. Fezes.....	13
1.2.1 Exame bacteriológico de fezes	13
1.2.2 Exame parasitológico de fezes.....	15
1.3 Outros Produtos Biológicos	15
1.3.1 Exsudado Auricular	17
1.3.2 Exsudado Uretral	17
1.3.3 Exsudado vaginal	19
1.3.4 Expetoração.....	22
Controlo de qualidade no setor da Microbiologia.....	23
Capítulo 2. Hematologia.....	25
2.1 Colheita de sangue venoso	25
2.2 Hemograma.....	25
2.3 Esfregaço sanguíneo	26
2.4 Contagem de reticulócitos.....	27
2.5 Velocidade de sedimentação	27
2.6 Estudo da coagulação	28
2.6.1. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada ou Tempo de Cefalina-Caolino	28

2.6.2. Tempo de Protrombina ou Tempo de Quick e INR.....	29
2.7 Determinação de grupos sanguíneos	32
2.8 Prova de Coombs indireta	33
2.9 Controlo de Qualidade no setor da Hematologia.....	34
Capítulo 3. Serologia	35
3.1 Proteína C reativa.....	35
3.2 Teste VDRL e TPHA	36
3.3 Fator reumatoide	37
3.4 Reação de Widal.....	37
3.5 Reação de Wrigth.....	38
3.6 Reação de Weil Felix.....	38
3.7 Controlo de Qualidade no setor da Serologia.....	39
Capítulo 4. Bioquímica.....	40
4.1 Autoanalisador Olympus AU 600	41
Avaliação da função hepática	41
Avaliação da função renal.....	43
Outros Analitos	46
4.2 Análise de Urina tipo II	49
4.3 Sedimento urinário	51
4.4 Teste de gravidez na urina.....	51
4.5 Pesquisa de sangue oculto	52
4.6 Eletroforese de Proteínas Séricas.....	52
4.7 Controlo de Qualidade no setor da Bioquímica.....	54
Conclusão.....	55
Referências Bibliográficas.....	56

Índice de Figuras

Figura 1. Processo desde a chegada dos produtos até à separação pelos setores	3
Figura 2. Procedimento do Exame Bacteriológico de Urina.....	6
Figura 3. miniAPI.....	10
Figura 4. Produtos biológicos estudados	15
Figura 5. Parâmetros obtidos de um hemograma	25
Figura 6. Autoanalisador Coulter Hmx Hematology	26
Figura 7. Test 1 THL.....	28
Figura 8. Option 4 Plus	31
Figura 9. Procedimento da pesquisa de proteína C reativa	35
Figura 10. Procedimento do teste VDRL.	36
Figura 11. Placa de microtitulação - TPHA	37
Figura 12. Procedimento do teste FR.....	37
Figura 13. Procedimento da Reação de Widal, Reação de Wrigth e Reação de Weil Felix.....	39
Figura 14. Olympus AU 600	40
Figura 15. Elecsys (à esquerda) e cobas e 411 (à direita).....	40
Figura 16. Urisys 2400.....	49
Figura 17. Resultado positivo e Resultado negativo.....	52
Figura 18. Perfil electroforético normal.....	53
Figura 19. Microgel.....	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Meios de cultura utilizados neste laboratório.....	4
Tabela 2. Bactérias responsáveis por infeção urinária.....	5
Tabela 3. Características dos meios de cultura utilizados no exame bacteriológico de urina	7
Tabela 4. Características da Coloração de Zhiel Neelsen.....	12
Tabela 5. Meios de cultura usados no exame bacteriológico de fezes	14
Tabela 6. Características dos meios de cultura.....	16
Tabela 7. Bactérias da flora saprófita e patogénicas no ouvido externo	17
Tabela 8. Exame bacteriológico do exsudado uretral	17
Tabela 9. Bactérias da flora saprófita e patogénicas da uretra	17
Tabela 10. Exame bacteriológico do exsudado vaginal	19
Tabela 11. Bactérias da flora saprófita e patogénicas no exsudado vaginal	19
Tabela 12. Meios de cultura utilizados na pesquisa de Streptococcus do grupo B	21
Tabela 13. Exame bacteriológico da expetoração	22
Tabela 14. Bactérias patogénicas na expetoração.....	22
Tabela 15. Meio de Lowenstein-jensen (LJ-T).....	23
Tabela 16. Controlo de Qualidade realizado no setor da Microbiologia	24
Tabela 17. Zonas e funções do Option 4 Plus.....	31
Tabela 18. Marcadores da função hepática.....	41
Tabela 19. Marcadores da função renal.....	43
Tabela 20. Tipos de Diabetes.....	47
Tabela 21. Tiras de teste – Urina tipo II	50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A – Superfície corporal

ADP – Adenosina difosfato

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATB – Antibiograma

ATP – Adenosina trifosfato

ATCC – American Type Culture Collection

BAAR – Bacilos álcool ácido resistentes

BK – Bacilo Koch

CE – Corpos elementares

CHE – Colesterol esterase

CR – Corpos reticulares

DHPN – Doença hemolítica perinatal

DPD – 5-diclorofenil-diazônio-tetrafluorborato

DPI – Doença pélvica inflamatória

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

FR – Fator reumatoide

GB – Glóbulos brancos

GGT – Gama glutamiltransferase

GK – Glicerol quinase

GLDH – Glutamato desidrogenase

GOD – Glucose oxidase

GV – Glóbulos Vermelhos

G6P-DH – glucose-6-fosfato desidrogenase

h – horas

Hb – Hemoglobina

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

hcG – Gonadotrofina coriônica humana

HDL –High density lipoprotein

HK – Hexoquinase

HMMPS – N-(3-sulfopropil)-3-metoxi-5-metilanilina

Ht – Hematócrito

ID – Identificação

ITU – Infecção trato urinário

INR – International normalized ratio

ISI – International sensivity index

LDL – Low density lipoprotein

min – minuto

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C reativa

pNPP – p-Nitrofenilfosfato

pNP – p-Nitrofenol

POD – Peroxidase

PSO – Pesquisa sangue oculto

rpm – rotações por minuto

sd – desvio padrão

STAPH – Staphylococcus

TFG – Taxa de filtração glomerular

TP – Tempo de protrombina

TT – Tempo de trombina

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada

UFC – Unidade Formadora Colónia

UNG – Uretrites não-gonocócicas

UPG – Uretrites pós-gonocócicas

UV – Ultravioleta

VDRL – Venereal Diseases Reference Laboratory

VS – Velocidade de sedimentação

TPHA – Treponema pallidum haemagglutination assay

°C- grau Celsius

Introdução

O presente relatório descreve o estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas Dra. Susana Pinto, em Gaia, entre Janeiro e Abril de 2012.

O Laboratório foi fundado em 1986, e é certificado pela NP EN ISO 9001, pelo Manual das Boas Práticas Laboratoriais e pela Ordem dos Farmacêuticos.

Funciona como o laboratório central, uma vez que existem mais postos de colheita (Espinho, Vila Meã, Vila do Conde (Posto de colheita e Santa Casa da Misericórdia), IC - São Mamede Infesta e Alvites).

O laboratório possui também um protocolo com um centro de reprodução medicamente assistida, portanto, efetua análises de alguns dadores de esperma e dadoras de óvulos.

O laboratório executa análises nas áreas da Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia, Serologia, Endocrinologia, Alergologia, Monitorização de Fármacos e Toxicologia Clínica.

Na realização deste estágio foram contempladas as áreas da Bioquímica, Hematologia, Microbiologia e Serologia.

Fase Pré Analítica, Analítica e Pós Analítica

Fase Pré analítica:

Esta fase inclui o Atendimento, Colheita, Manuseamento Distribuição e Conservação das amostras, Conferência e Separação.

➤ **Manuseamento Distribuição e Conservação:**

- 1- Transporte: O transporte das amostras das unidades de colheita para o laboratório Central e deste para os laboratórios externos é efetuado em malas térmicas com ambiente refrigerado, por pessoal e transporte afetos ao Laboratório Central.
- 2- Distribuição e Conservação: Todos os produtos entregues na receção ou colhidos nas salas de colheitas, são enviados (devidamente codificados) para o setor de “Conferência e separação”.

➤ **Conferência e separação**

Objetivo: Definir o processo de conferência e separação do serviço desde a receção até ao início da execução das técnicas.

- Depois de terem sido introduzidos os dados dos utentes e respetivos ensaios a realizar é emitido o diário de doentes.
- É necessário verificar se todos os produtos colhidos na sala de colheitas, entregues na receção ou enviados pelas unidades de colheitas, se encontram na bancada, assim como as credenciais/pedidos.
- Os produtos são colocados por ordem crescente de número da amostra.
- Verificar, pelas credenciais se foram colhidos e entregues os produtos referentes a cada um dos pedidos, assim como se o foram nos recipientes apropriados.
- Se sobrar ou faltar algum produto ou se foi colhido em condições ou recipientes inadequados, regista-se num caderno as faltas (colocando o número da amostra em falta ou sobra).
- A receção é avisada caso se considere que houve erro de colheita. Devolver as credenciais à receção e tratar os produtos conforme o exigido para cada análise.

No seguinte fluxograma (Fig. 1) estão representadas as etapas desde a chegada dos produtos dos postos de colheita, até ao momento da separação das amostras pelos diferentes setores.

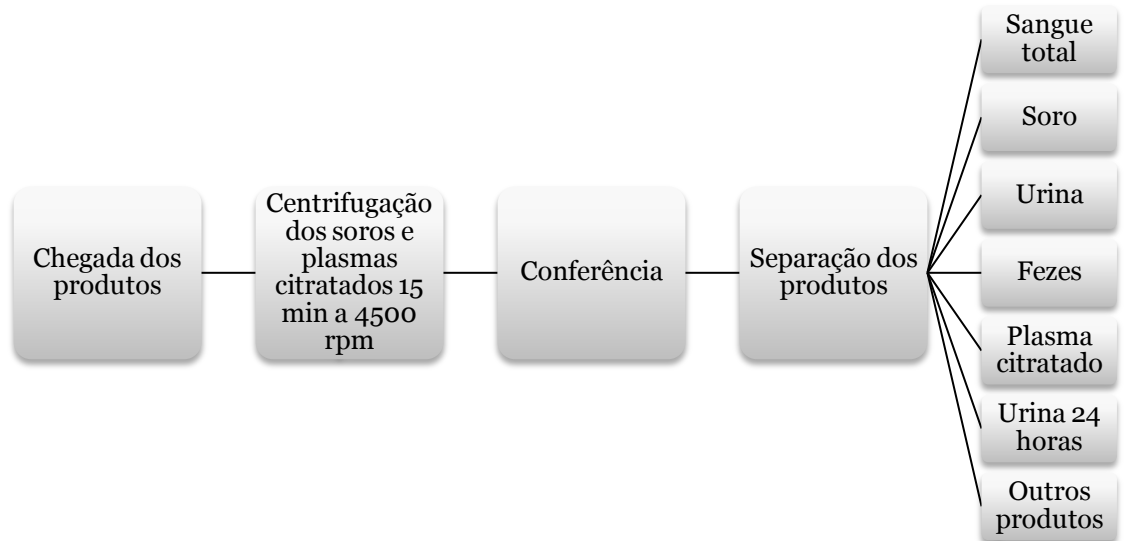


Figura 1. Processo desde a chegada dos produtos até à separação pelos setores

Após separação dos produtos, estes são então distribuídos pelos diferentes setores.

É necessário ter em conta:

- Refrigerar os plasmas citratados até ao momento da análise;
- Separar para tubos pequenos as amostras para o setor de Imunologia e para os laboratórios externos. Se estes não forem processados no dia têm de ser congelados;
- Levar os tubos primários com os soros e as alíquotas para o setor da bioquímica;
- Os pedidos de hemograma têm de ser processados no dia.

Fase Analítica:

Realização das técnicas analíticas: Com base nas listas de trabalho e nas amostras/alíquotas (identificadas e separadas) as técnicas são efetuadas conforme descrito nos respetivos procedimentos técnicos, tendo em consideração o controlo de qualidade interno e externo.

Fase Pós analítica:

Esta fase inclui a emissão, validação biopatológica e entrega dos boletins analíticos.

Capítulo 1. Microbiologia

No setor da Microbiologia, são estudados diferentes produtos biológicos. Sejam eles urina, fezes, expetoração, exsudados vaginais e outros.

Neste setor são realizados essencialmente exames bacteriológicos, sendo que o produto que é recebido mais frequentemente para este tipo de análise, neste laboratório, é a urina.

O exame bacteriológico, tem como objetivo o isolamento e identificação do agente etiológico responsável pela infeção. Por isso, todas as culturas que são consideradas positivas saem com a identificação da bactéria e respetivo antibiograma.

Condições de Assépsia

Na preparação dos meios de cultura e na manipulação das culturas de microrganismos é importante ter em conta as necessárias condições de assepsia, de modo a que sejam evitadas contaminações com outros microrganismos.

Neste setor, isso é conseguido através da utilização de um bico de Bunsen.

Meios de Cultura

Tabela 1. Meios de cultura utilizados neste laboratório

Meios de cultura preparados no Laboratório	Meios de cultura adquiridos
Gelose CLED (Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos), Gelose bÍlis-esculina-azida, Gelose Manitol Salt Agar (MSA), Gelose MacConkey, Gelose Sabouraud Cloranfenicol, Gelose Salmonella Shigella (SS), Gelose desoxicolato-lisina-xilose (XLD), Muller Hinton, e caldo de enriquecimento de tetrionato	Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS), Gelose Chocolate Polivitex (PVX), Gelose Gardenerlla (GAR), Meio de Lowenstein Jensen (LJ-T), Meio de Todd-Hewitt e Gelose Strepto B

De seguida, são referidas as diferentes amostras que processei durante o período de permanência nesta valência.

1.1. Urina

1.1.1 Exame bacteriológico de urina

As infeções do aparelho urinário são uma das infeções mais frequentes no Homem. A infeção urinária aguda é normalmente causada pela invasão do aparelho urinário por bactérias da flora intestinal saprófita. As infeções agudas do aparelho urinário são geralmente subdivididas em duas categorias: infeção do trato urinário (ITU) inferior, onde a presença de bactérias se limita à bexiga (cistite), e do trato superior (pielonefrite), em que é afetada a pélvis e o parênquima renal.^(1, 2)

Na prática clínica é valorizada a presença de colónias em número superior a 10^5 , na urina do jato médio, conhecida como bacteriúria significativa.

Na tabela seguinte estão representadas as bactérias que são mais vezes causadoras de infeção urinária.⁽³⁾

Tabela 2. Bactérias responsáveis por infeção urinária

Bactérias
<i>Escherichia coli</i>
<i>Proteus spp</i>
<i>Klebsiella spp</i>
<i>Enterococcus spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
Staphylococcus coagulase negativa

Durante a realização do estágio foi confirmada esta tendência, no entanto, foi possível também isolar outras bactérias menos vezes causadoras de infeção urinária como por exemplo, *Citrobacter* e *Streptococcus* do grupo D.

O procedimento do exame bacteriológico de urina realizado neste laboratório, está descrito de uma forma sistematizada no seguinte fluxograma (Fig. 2).

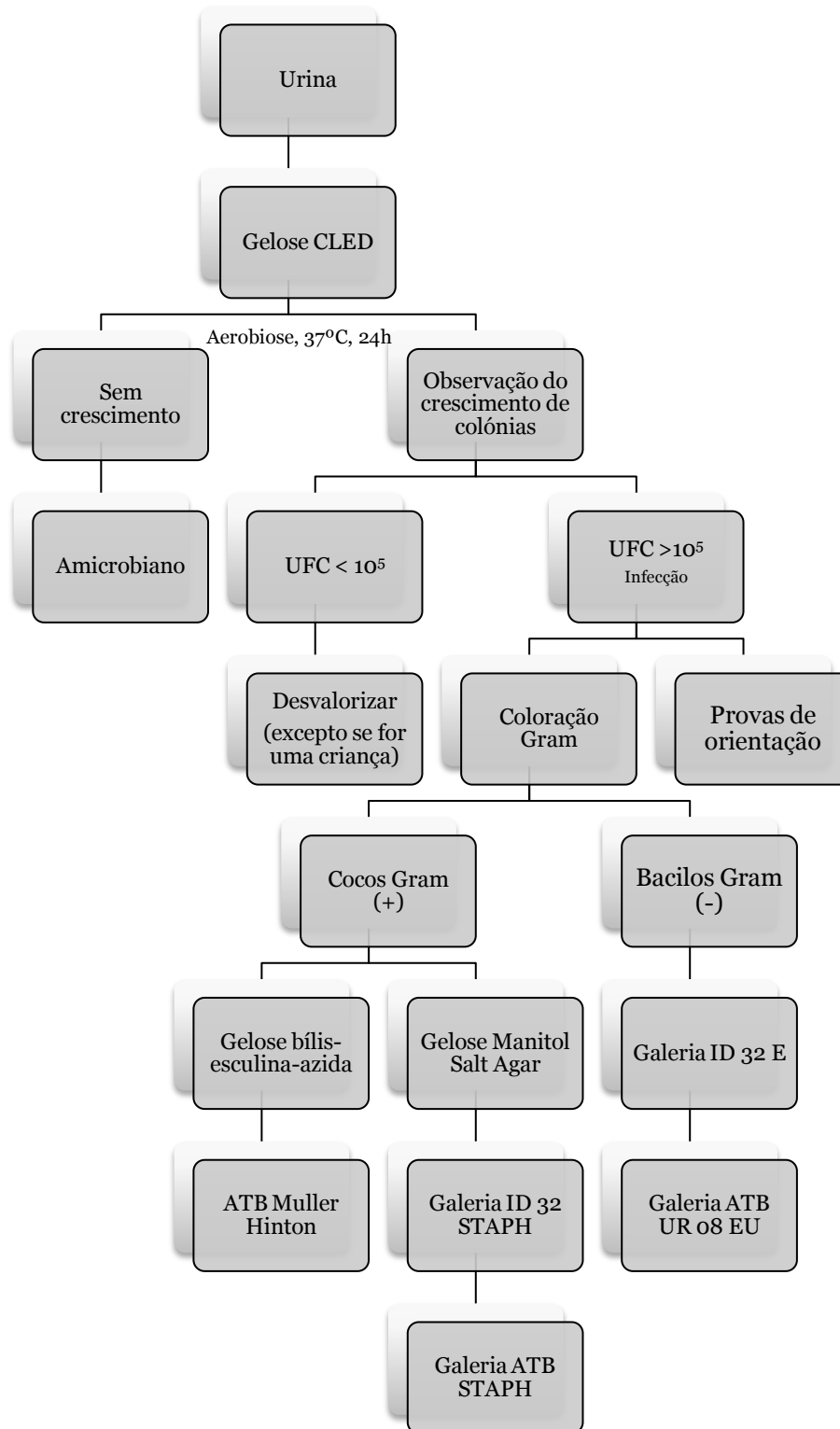


Figura 2. Procedimento do Exame Bacteriológico de Urina

Na tabela seguinte, são referidas as características dos diferentes meios utilizados habitualmente no exame bacteriológico de urina, e suas principais características.

Tabela 3. Características dos meios de cultura utilizados no exame bacteriológico de urina

Meio de cultura	Caraterísticas
Gelose CLED-D (Cistina-Lactose- Deficiente em Eletrólitos)	Meio diferencial, não seletivo. A deficiência de eletrólitos inibe o “swarming” dos <i>Proteus</i> e a lactose permite diferenciar os fermentadores dos não fermentadores. As bactérias fermentadoras da lactose originam colónias amarelas-pálidas e amarelas por acidificação do meio. As não fermentadoras originam colónias verdes, azuis ou incolores. Meio utilizado no isolamento de microrganismos urinários. ⁽⁴⁾
Gelose bÍlis- esculina-azida	Isolamento seletivo. Útil para a diferenciação dos enterococos e estreptococos do grupo D. A hidrólise da esculina dos enterococos provoca o aparecimento de um halo negro à volta das colónias. A seletividade do meio em relação às bactérias Gram (-) é assegurada pela azida sódica. A bÍlis inibe algumas bactérias Gram (+), excetuando os enterococos. ⁽⁵⁾
Gelose Manitol Salt Agar	Isolamento dos estafilococos. Os microrganismos que fermentam o manitol originam colónias amarelas. Esta característica é um critério de orientação para a identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> . O teor elevado em cloreto de sódio limita o desenvolvimento de outras bactérias. ⁽⁶⁾
Gelose Mueller Hinton 2	Para o estudo da sensibilidade aos antibióticos e sulfamidas. Permite o crescimento de bactérias não exigentes (enterobactérias, bacilos Gram (-) não fermentadores, estafilococos e enterococos) garantindo o mínimo de interferência dos componentes da fórmula no resultado do antibiograma. A sua concentração em íões bivalentes é ajustada com o fim de assegurar uma melhor precisão para determinar a sensibilidade das pseudomonas aos aminoglicosídios, colistina e tetraciclina. O seu baixo teor em timina-timidina (elementos inibidores da atividade das sulfamidas) diminui os fenómenos de crescimento à volta destes discos e permite uma determinação precisa dos diâmetros de inibição. ⁽⁷⁾

Provas de Orientação

- Coloração de Gram

É uma coloração diferencial pois permite fazer a distinção entre bactérias Gram (+) e Gram (-). A diferença entre os 2 tipos de células deve-se à estrutura da parede celular das bactérias. A parede celular das bactérias Gram (+) é formada por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular das bactérias Gram (-) é formada por uma

camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeos e proteínas.

Na técnica de Gram utiliza-se primeiro um corante básico, cristal violeta, seguido de um mordente, o lugol que aumenta a afinidade da célula para o corante, um agente descolorante, o álcool a 96% que remove o corante, e finalmente um segundo corante básico, a safranina.

As bactérias Gram (+) aparecem coradas com o corante primário (roxo) pois devido à sua parede espessa de peptidoglicano resistem à descoloração, enquanto as bactérias Gram (-) coram com a safranina (rosa), uma vez que o álcool solubiliza a camada externa de lipopolissacarídeo e proteínas.

- Teste da catalase:

A enzima catalase, produzida por algumas bactérias catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água⁽³⁾ e protege o microrganismo dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio formado no seu metabolismo ou produzido pelas células fagocitárias.

Este teste tem como intuito a diferenciação entre *Staphylococcus* e *Enterococcus*.

O procedimento do teste consiste em, com uma ansa, transferir a colónia em estudo para uma lâmina de vidro. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio e observar imediatamente se existe ou não efervescência (Reação positiva).

- Teste da oxidase:

Permite a deteção da enzima citocromo oxidase das bactérias. Esta enzima é característica do género *Neisseria* e da maioria das espécies de *Pseudomonas*.

Este teste baseia-se na produção bacteriana de uma enzima oxidase intracelular. Na presença de oxigénio e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina, para formar um composto colorido, o indofenol. O ácido ascórbico, incorporado no reagente, age enquanto agente redutor para limitar a auto oxidação e melhorar a estabilidade do reagente.⁽⁸⁾

- Teste da coagulase:

A coagulase é uma das enzimas produzidas por estafilococos mais importantes. Entre as espécies patogénicas para o Homem, só uma, o *Staphylococcus aureus*, a produz. Todas as restantes são designadas coagulase-negativas ou não produtoras de coagulase.⁽³⁾

O procedimento do teste consiste em, num tubo com 0,5 ml de plasma humano inocular uma colónia isolada da cultura em estudo e incubar a 37° C. Ao fim de 4h de incubação e sem agitar o tubo, verificar se existe formação de coágulo (Reação positiva). A ausência de coágulo às 4h implica a reincubação do tubo com leitura às 24h.

- Prova da filamentação:

Permite fazer o diagnóstico presuntivo de *Candida albicans*.

O procedimento consiste em num tubo de vidro esterilizado colocar uma pequena quantidade de soro humano. Fazer uma suspensão da levedura a analisar e colocar a 37°C.

Observar ao microscópio até às 4h de incubação.

A formação de um tubo de filamentação indica que a prova é positiva.

Galerias de Identificação e Antibiogramas

Neste laboratório há disponíveis três tipos de galerias de identificação: ID 32 E, rapid ID 32 E, ID STAPH. E três galerias de antibiograma: ATB UR EU (o8), ATB PSEU EU (o8), ATB STAPH EU (o8). Para a leitura e identificação destas galerias, é necessário um densitómetro, e o miniAPI.

O miniAPI (Fig. 3) satisfaz 2 tipos de leitura: turbidimetria e colorimetria. A turbidimetria, é num sentido amplo, uma técnica em que se mede a turvação. Baseia-se no facto de a turvação provocar a dispersão da luz. Mede-se a intensidade do feixe que consegue atravessar a amostra e alcançar o detetor que está a 180° com o feixe de luz. Neste caso esta medida é inversamente proporcional ao crescimento bacteriano. A nefelometria é a medida da intensidade da luz que é dispersa numa determinada direção, neste caso a luz que é dispersa a 30° e que é diretamente proporcional ao crescimento bacteriano. Estas duas medidas permitem avaliar a densidade bacteriana no meio de cada cúpula. Este tipo de leitura é efetuado em galerias de antibiograma.

Para as galerias de identificação, a leitura é colorimétrica. O miniAPI efetua para cada cúpula uma medida de transmissão da luz em 4 regiões do espectro visível.⁽⁹⁾



Figura 3. miniAPI

Galerias de identificação:

A galeria ID 32-E é um sistema padronizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram (-) não fastidiosos, utilizando 32 testes bioquímicos miniaturizados e uma base de dados específica. Esta galeria compreende 32 cúpulas de testes que contêm um meio reacional desidratado.⁽¹⁰⁾

Para a preparação do inóculo utiliza-se uma ampola de API NaCl 0,85% Medium, 2 ml. Deve-se colher uma ou várias colónias idênticas, e utilizar de preferência culturas recentes (18-24h). Efetua-se então uma suspensão de opacidade equivalente a 0,5 MCFarland, medida no Densitômetro DENSIMAT.

Após 24 horas de incubação, as reações são lidas no miniAPI.

A preparação e o princípio a efetuar no caso da galeria Rapid ID 32 E é o mesmo, no entanto, este sistema padronizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* dá o resultado em apenas 4 horas.

A galeria ID 32 STAPH é um sistema padronizado para a identificação dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e géneros semelhantes, *Rothia* e *Aerococcus* compreendendo 26 testes bioquímicos miniaturizados.⁽¹¹⁾

Galerias de antibiogramas:

A galeria ATB UR EU (08) permite determinar a sensibilidade das *Enterobacteriaceae* de origem urinária aos antibióticos em meio semissólido em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de micro-diluição.

Esta galeria ATB UR (08) contém 16 pares de cúpulas. O primeiro par, sem antibiótico, serve de padrão de crescimento. Os 15 seguintes contêm antibióticos com uma única ou duas concentrações. A bactéria a testar é colocada em suspensão e depois transferida para

o meio de cultura e inoculada na galeria. O resultado obtido permite classificar a estirpe como Sensível, Intermédia ou Resistente.⁽¹²⁾

As galerias ATB PSEU EU (o8) e ATB STAPH EU (o8), permitem determinar a sensibilidade aos antibióticos, das *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, respetivamente.

Para a realização destes antibiogramas é necessário preparar uma suspensão bacteriana de 0,5 McFarland no Api Nacl 0,85 Medium, e transferir 10 µL desta suspensão para o ATB Medium, para posterior inoculação da galeria.

1.1.2 Pesquisa de Antígeno Clamídia em Urina Masculina

Neste laboratório, as pesquisas de antígeno Clamídia que foram requisitadas aquando da realização deste estágio, eram de dadores de esperma, uma vez que o laboratório tem um protocolo com o CETI.

A *Chlamydia tracomatis* é o principal agente de uretrites não gonocócicas (UNG) e de uretrites pós-gonocócicas (UPG), podendo complicar-se no homem, com epididimite, prostatite que têm, como contrapartida na mulher, cervicite, salpingite aguda, doença pélvica inflamatória (DPI), entre outros.

No ciclo de crescimento, as clamídias alternam dois tipos de formações, estrutural e funcionalmente diferentes: corpos elementares (CE) e corpos reticulares (CR), sendo estes a forma de multiplicação e os primeiros a forma de resistência e de propagação.

São incapazes de se cultivar em meios de cultura bacteriológicos, multiplicam-se em culturas celulares, dando origem a uma inclusão citoplasmática justa-nuclear, de acordo com o ciclo complexo que possuem em exclusividade.⁽¹³⁾

Para a deteção de Antígeno Chlamydia na urina masculina usa-se o dispositivo para teste rápido de Clamídia que é um teste para detetar qualitativamente o Antígeno de Clamídia, utilizando um anticorpo específico.

Princípio do teste: Imunocromatografia em membrana. Neste teste, um anticorpo específico do antígeno de Clamídia é coberto na região da linha de teste. Durante o teste, a solução do antígeno extraído reage com o anticorpo de Clamídia que é coberto sobre as partículas. A mistura migra para reagir com o anticorpo de Clamídia na membrana, dando origem a uma linha colorida na região da linha de teste.⁽¹⁴⁾

1.1.3 Pesquisa de BK direto na urina

Trata-se de uma análise pouco requisitada. É pedida quando há suspeita de tuberculose renal.

O agente etiológico da Tuberculose renal é o mesmo da Tuberculose pulmonar, o *Mycobacterium tuberculosis* ou *Bacilo de Koch* (BK). A Tuberculose Renal é uma das formas da doença extrapulmonar, e entre os diversos tipos de tuberculose, é a que apresenta o maior tempo de latência. O tempo entre a primoinfecção e as manifestações clínicas podem chegar até aos 20 anos.

O BK, ao invadir o rim, provoca lesões semelhantes às encontradas nos pulmões e outros pontos do organismo. A lesão mais grave é a caverna tuberculosa, que determina a destruição de importantes porções dos rins.

Exame direto – Coloração de Zhiel-Neelsen

O exame direto é de fácil execução, e rápido. No entanto, é de baixa sensibilidade uma vez que são necessários cerca de 10^4 bacilos por mL de amostra para que sejam detetados. Para além disso, não é específico para *M. tuberculosis*, porque deteta todos os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Estas bactérias são resistentes à coloração por variados corantes utilizados comumente em bacteriologia, como o método de Gram. Por outro lado, uma vez coradas resistem à coloração por soluções álcool ácidas sendo-lhes por isso atribuída a designação de BAAR. Significa isto, que a coloração com um primeiro corante (fucsina), se mantém após descoloração com solução álcool ácida não adquirindo as bactérias a coloração com um segundo corante (azul de metileno). Embora, não seja patognomónica das micobactérias a álcool ácido-resistência é uma característica muito importante em termos de identificação laboratorial.⁽¹³⁾

Tabela 4. Características da Coloração de Zhiel Neelsen

Coloração de Zhiel Neelsen	Utilizada principalmente para o diagnóstico de tuberculose, e outras micobacterioses (ocasionadas por BAAR). Permite identificar os microrganismos que possuem paredes celulares ricas em ácidos micólicos (ceras) capazes de resistir à descoloração pela mistura álcool-ácido, depois de coradas a quente pela fucsina.
-----------------------------------	---

Após coloração, a observação microscópica permite ver bacilos de 3 a 4 µm de comprimento aparecendo frequentemente “em paliçada”, no caso de resultado positivo.

1.2. Fezes

1.2.1 Exame bacteriológico de fezes

Neste laboratório, este exame tem como objetivo o despiste das bactérias patogénicas: *Salmonella* e *Shigella*.

A salmonelose é adquirida normalmente, pela ingestão de alimentos e de água contaminados ou por contacto fecal-oral. O reservatório de *Salmonella typhi* é o homem, que é também o principal disseminador da febre tifoide na fase aguda da doença ou no estado de portador assintomático.

A *Shigella* é um dos patogénicos entéricos responsável pela denominada desenteria bacilar, ocasionando diarreias abundantes com sangue e muco. A shigelose é geralmente transmitida ao homem por ingestão de água e alimentos contaminados pelo próprio homem, sobretudo nos países desenvolvidos. A transmissão é feita, primariamente, pela via fecal-oral direta, já que o homem é o principal reservatório da Natureza. É altamente infecciosa e cerca de 10² células bacterianas podem causar doença.⁽¹³⁾

Para o isolamento fecal destas duas bactérias, neste laboratório, são utilizados os seguintes 4 meios de cultura:

Tabela 5. Meios de cultura usados no exame bacteriológico de fezes

Meio de cultura	Caraterísticas
Gelose XLD-D agar	Meio de isolamento seletivo e diferenciação destinado à pesquisa de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> . As bactérias que possuem descarboxilase originam colónias vermelhas por descarboxilação da lisina. As bactérias que produzem H ₂ S originam colónias com centro negro. As espécies que fermentam um dos três açúcares contidos no meio originam colónias amarelas ou laranjas. A presença de colónias rosas ou vermelhas com ou sem centro negro (colónias características) representa uma forte presunção de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i> . A inibição das bactérias Gram (+) é obtida pela presença do desoxicolato de sódio.
Gelose SS agar	Meio de isolamento seletivo e de diferenciação destinado à pesquisa das espécies de <i>Samonella</i> e <i>Shigella</i> . O meio permite evidenciar colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H ₂ S). Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas, os outros colónias incolores. Os microrganismos que produzem H ₂ S originam colónias com centro negro. A presença de colónias incolores ou ligeiramente coloridas com ou sem centro negro representa uma forte presunção de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i> . A inibição das bactérias Gram (+) obtém-se pela mistura de sais biliares e de corantes. ⁽¹⁵⁾
Caldo de enriquecimento de tetratonato	Meio de enriquecimento que tem como objetivo inibir o crescimento das bactérias da flora saprófita.
Gelose Sabouraud Cloranfenicol 2	Meio seletivo recomendado para a cultura e isolamento das leveduras e dos fungos filamentosos a partir de colheitas polimicrobianas. A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento de fungos. O pH, ligeiramente ácido, favorece o crescimento de fungos em relação ao desenvolvimento bacteriano. A seletividade do meio em relação à maioria das bactérias é assegurada pelo cloranfenicol. ⁽¹⁶⁾

Procedimento: Semear as fezes nos 4 meios atrás referidos. Após 24h ler no meio de XLD e SS o crescimento de bactérias da flora normal (*Escherichia coli*, *Enterococcus*,...). E do meio de enriquecimento de tetratonato de sódio retira-se uma amostra para semear nos meios XLD e SS. Verificar se nas primeiras 24h houve crescimento de bactérias suspeitas, em caso negativo, incubar mais 24h.

1.2.2 Exame parasitológico de fezes

O exame parasitológico de fezes inicia-se com o exame macroscópico. É necessário avaliar o aspeto da amostra, isto é, se tem aspeto normal ou se apresenta sangue ou muco. Posteriormente, suspende-se uma pequena quantidade de fezes em soro fisiológico e no microscópio ótico faz-se a pesquisa e identificação de ovos ou quistos de parasitas.

Durante a realização do estágio, os exames parasitológicos de fezes realizados obtiveram todos resultados negativos.

1.3 Outros Produtos Biológicos

No seguinte fluxograma estão referidos os outros produtos biológicos estudados no âmbito deste estágio:

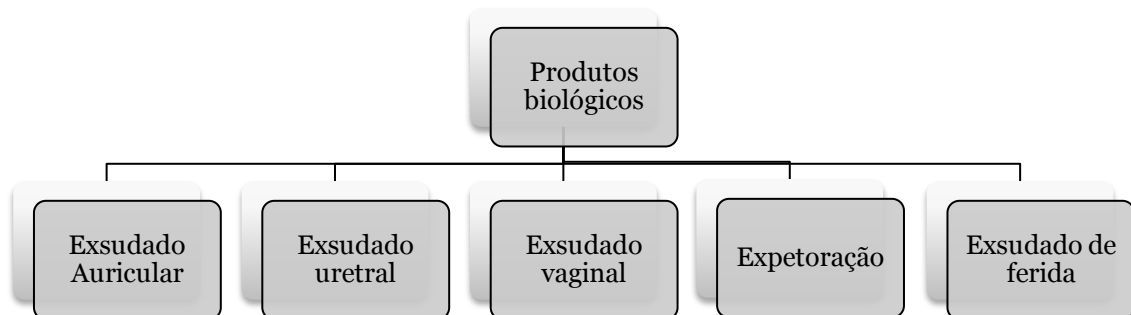


Figura 4. Produtos biológicos estudados

- Para o exame bacteriológico, os diferentes produtos são semeados nos seguintes meios:
 - Gelose Columbia + 5% sangue de carneiro (COS)
 - Gelose Chocolate Polyvitex (PVX)
 - Gelose Manitol Salt Agar
 - Gelose MacKonkey
 - Gelose Saboraud Cloranfenicol 2
 - Gelose Gardnerella (se exsudado vaginal)
- Para todos os produtos, faz-se uma lâmina para coloração de Gram
- Se expetoração faz-se também uma lâmina para coloração de Zhiel Neelsen
- Quando aplicável (exsudado vaginal, uretral) realiza-se um exame a fresco.

Todos os meios são incubados em estufa a 37°C, durante 24h (os meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS), Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) e Gelose Gardnerella devem incubar em ambiente rico em CO₂, colocando os meios dentro de uma campânula com uma vela acesa). Na tabela seguinte, estão referidos os meios utilizados e suas características¹:

Tabela 6. Características dos meios de cultura

Meio de cultura:	Características:
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Isolamento das bactérias exigentes. Detecção das hemólises. Esta gelose contém uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura de microrganismos exigentes (<i>Streptococcus</i> , <i>Listeria</i> ,...). A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base da orientação da identificação bacteriana. ⁽¹⁷⁾
Gelose Chocolate Polyvitex (PVX)	Isolamento de bactérias exigentes como <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> . É composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PoliVitex. ⁽¹⁸⁾
Gelose MacConkey	Isolamento seletivo de Enterobactérias. A gelose MacConkey com cristal de violeta permite evidenciar a fermentação da lactose pela viragem do vermelho neutro. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Os microrganismos que não fermentam a lactose, originam colónias incolores ou ligeiramente bege. A seletividade em relação às bactérias Gram (+) é proporcionada pelos sais biliares e pelo cristal violeta. ⁽¹⁹⁾
Gelose Gardnerella (GAR) (para exsudado vaginal)	Meio de isolamento seletivo destinado à deteção de <i>Gardenerella vaginalis</i> a partir de colheitas genitais. A presença de sangue humano facilita o crescimento da espécie procurada e permite a obtenção de uma beta hemólise à volta das colónias. Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria das bactérias Gram (-) bem como das leveduras. ⁽²⁰⁾

¹ As características da Gelose Manitol Salt Agar e da Gelose Saboraud Cloranfenicol 2 foram anteriormente referidas.

1.3.1 Exsudado Auricular

A otite externa caracteriza-se por um processo inflamatório da pele do canal auditivo externo⁽²¹⁾, sendo que, a otite externa aguda é maioritariamente causada por infeções bacterianas. O canal auditivo externo tem um pH de cerca de 6,9 que possibilita a presença de uma flora saprófita, que protege o canal auditivo externo contra outros microrganismos patogénicos. Na seguinte tabela estão representadas, não só as bactérias da flora saprófita, como também as bactérias patogénicas, sendo que, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se como a mais comum na infeção do ouvido externo.⁽²²⁾

Tabela 7. Bactérias da flora saprófita e patogénicas no ouvido externo

Bactérias flora saprófita	Bactérias patogénicas
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia coli</i> entre outras

1.3.2 Exsudado Uretral

Tabela 8. Exame bacteriológico do exsudado uretral

Exame Bacteriológico	Exame a fresco (Pesquisa de <i>Trichomonas vaginalis</i>)
	Semear nos meios indicados
	Coloração de Gram

Tabela 9. Bactérias da flora saprófita e patogénicas da uretra

Flora uretral saprófita	Bactérias patogénicas
<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus coagulase negativos</i> , <i>corynebacterium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia tracomatis</i> entre outras

Infeção por *Neisseria gonorrhoea* no homem

A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, na forma de diplococos “riniformes” ou “grãos de café”. Esses diplococos apresentam-se aos pares, com faces côncavas adjacentes, ou seja, voltadas entre si.

No homem, a infeção inicial por *Neisseria gonorrhoea* provoca uretrite aguda purulenta, que se caracteriza por corrimento purulento, disúria e pode estender-se à próstata, vesículas seminais, epidídimo e testículos.

Identificação: A coloração de Gram revela diplococos Gram negativo típicos, sendo obrigatório alguns estarem dentro de polimorfonucleares. O teste da oxidase é positivo. Em relação à fermentação dos carboidratos, a *Neisseria gonorrhoea* metaboliza apenas a glucose oxidativamente.⁽¹³⁾

A coloração de Gram é um método muito sensível e específico em homens com uretrite purulenta. No entanto, a sua sensibilidade é menor nos homens assintomáticos e nas mulheres (sintomáticas ou assintomáticas).

Infeção por *Trichomonas vaginalis* no homem

O homem pode ter infeção por *Trichomonas vaginalis* pelo contato com parceira sexual infetada.

A tricomoníase em homens pode ser classificada em três grupos: estado assintomático; estado agudo, caracterizado por uretrite purulenta abundante; e doença assintomática leve, clinicamente indistinguível de outras causas de uretrite.

1.3.3 Exsudado vaginal

1.3.3.1 Exame Bacteriológico

Tabela 10. Exame bacteriológico do exsudado vaginal

Exame Bacteriológico	Exame a fresco (Pesquisa de <i>Trichomonas vaginalis</i>)
	Semear nos meios indicados
	Coloração de Gram

Tabela 11. Bactérias da flora saprófita e patogénicas no exsudado vaginal

Flora vaginal normal	Bactérias patogénicas
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus coagulase negativos</i> , <i>Corynebacterium</i> , Leveduras	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoea</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> entre outras

Vaginose bacteriana por *Gardnerella Vaginalis*

A *Gardnerella vaginalis* é um bacilo Gram negativo. Pode ser detetado em colorações de Gram, pois aderem às células epiteliais, dando origem às características “clue cells”. Esta vaginose bacteriana ocorre quando há um desequilíbrio, que leva à diminuição de *Lactobacillus*, e ao aumento de *Gardnerella vaginalis*.⁽³⁾

Infeção por *Trichomonas vaginalis* na mulher

A *T. vaginalis* infeta principalmente o epitélio escamoso do trato genital. A tricomoníase apresenta grande variabilidade de manifestações patológicas, desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (vaginite). Das mulheres infetadas, entre 25% e 50% são assintomáticas.

Infeção por *Neisseria gonorrhoea* na mulher

A infeção por *Neisseria gonorrhoea* envolve o colo do útero, originando uma cervicite, que se pode manifestar por corrimento vaginal, dor abdominal baixa e/ou hemorragias e mais raramente uretrite. Pode disseminar para as glândulas de Bartolini, trompas de Falópio e ovários, assim como para a cavidade peritoneal (doença inflamatória pélvica) o que ocorre em 10-20 % das mulheres com gonorreia.

A contaminação do feto aquando do parto pode conduzir a oftalmia neonatal.⁽¹³⁾

1.3.3.2 Pesquisa de Streptococcus do grupo B em exsudados reto-vaginais de grávidas

Os Streptococcus do grupo B são colonizadores do trato gastrointestinal superior e do trato genitourinário.

Nos adultos, a colonização é frequentemente assintomática, sendo que cerca de 40% das mulheres estão colonizadas com Streptococcus do grupo B. Contudo esta bactéria pode ser responsável por septicémias e meningites em recém nascidos.⁽³⁾

No recém-nascido, a contaminação pode ocorrer “in útero” ou, mais frequentemente, por inalação do líquido amniótico ou secreções vaginais durante o parto.

Por isto, a maior relevância, da infeção por *S. agalactiae*, são estes quadros graves de septicemia e meningite das crianças durante os períodos neonatal e perinatal, além da ocorrência de partos prematuros ou nascimentos de crianças de termo com baixo peso corporal. Muitos recém-nascidos, principalmente prematuros, nascidos de mães colonizadas por *S. agalactiae*, e provavelmente infetadas ainda, no útero podem estar criticamente doentes ao nascer, tendo um prognóstico reservado e uma mortalidade de 15 a 20%. Os prematuros estão em risco porque possuem um nível baixo de anticorpos do tipo IgG maternos e as suas reservas de neutrófilos são baixas.⁽¹³⁾

O rastreio realiza-se às 35-37 semanas, para evitar que a criança seja contaminada. Caso depois do rastreio não haja tempo para tratar, devido a um parto pré-termo, prefere-se fazer cesariana em vez de via baixa porque é na altura do parto que a criança é contaminada.

Procedimento: Mergulhar a zaragatoa com o produto no meio de Tood-Hewitt e colocar na estufa a 37°C, durante 24 horas. Após 24h, retirar do meio um pouco de

amostra e semear numa placa de Gelose STRB. Colocar na estufa a 37°C, durante 24h. Se ocorrer crescimento de colónias suspeitas faz-se uma identificação com Slidex Strepto B. Na seguinte tabela, estão referidas as características dos dois meios utilizados nesta pesquisa:

Tabela 12. Meios de cultura utilizados na pesquisa de Streptococcus do grupo B

Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo para os estreptococos do grupo B, destinado à deteção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora polimicrobiana. Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram (-) da flora saprófita. ⁽²³⁾
Gelose Strepto B ID (STRB)	Constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, três substratos cromogénicos e antibióticos. Estes componentes permitem detetar o <i>S. agalactiae</i> através do aparecimento espontâneo de colónias rosa pálido a vermelho. A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colónias características. ⁽²⁴⁾

Identificação de Streptococcus a partir do Slidex

Os estreptococos beta-hemolíticos possuem antígenos específicos do grupo que podem ser extraídos e identificados com antissoros.

O SLIDEX Strepto Plus é um teste de aglutinação de partículas de látex para a identificação dos estreptococos A, B, C, D, F e G segundo a classificação de Lancefield. O agrupamento das estirpes de estreptococos permitirá a orientação do tratamento antibiótico.

Após cultura, as colónias isoladas de estreptococos são colocadas num tubo que contém a enzima de extração.

O antígeno específico do grupo que se encontra na parede é extraído por uma enzima, e de seguida é identificado por partículas de látex sensibilizadas por um anticorpo antiantígeno de grupo dos estreptococos. Se o antígeno estiver presente, o reagente de látex correspondente é aglutinado. Se o antígeno estiver ausente, o reagente de látex permanece em suspensão homogénea.⁽²⁵⁾

1.3.4 Expetoração

1.3.4.1 Exame bacteriológico:

Tabela 13. Exame bacteriológico da expetoração

Exame Bacteriológico	Semear nos meios indicados
	Coloração de Gram
	Coloração de Zhiel Neelsen

Tabela 14. Bactérias patogénicas na expetoração

Algumas Bactérias patogénicas
<i>Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis</i>
<i>Haemophilus influenza, Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Staphylococcus aureus, MRSA</i>

1.3.4.2 Pesquisa de BK (Bacilo de Koch) direto e cultural

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada por um grupo de bactérias estritamente relacionadas que constituem o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Pode afetar qualquer órgão ou sistema do corpo humano, sendo que a forma pulmonar é a mais frequente (75%).

O reservatório natural do *M. tuberculosis* é o Homem, as portas de entrada são em 90% o aparelho respiratório.

O *M. tuberculosis* possui uma parede celular que é extremamente rica em ácidos micólicos com cadeias longas e ramificadas, o que, torna a superfície hidrofóbica, e confere a estas bactérias propriedades importantes, não só em termos taxonómicos, como também, na patogenia das respetivas infeções.

O tratamento laboratorial da expetoração inclui homogeneização, liquefação, descontaminação e concentração. A descontaminação com hidróxido de sódio serve para eliminar outras bactérias que possam estar presentes e que, por crescerem mais rapidamente, impedem o crescimento daquelas. A concentração, feita por centrifugação, tem como finalidade aumentar a sensibilidade do exame direto e do exame cultural.

Exame direto: Coloração de Zhiel Neelsen

Exame cultural: Semear em meio de Lowenstein-jensen (LJ-T) e incubar numa posição horizontal durante uma noite a 37°C e 4 semanas na vertical

Tabela 15. Meio de Lowenstein-jensen (LJ-T)

Meio de Lowenstein-Jensen (LJ-T)	Meio enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, que favorece o crescimento das micobactérias. ⁽²⁶⁾
---	--

Neste meio, as micobactérias desenvolvem-se, em geral, lentamente, sendo necessária uma incubação prolongada, de 3 a 4 semanas para que se formem as colónias características. As colónias de *M. tuberculosis* em meio de L-J aparecem rugosas e não pigmentadas (colónias em “couve flor”).

As micobactérias têm exigências nutritivas particulares, pelo que não se desenvolvem (ou fazem-no deficientemente) nos meios de cultura tradicionais utilizados habitualmente para a maioria das outras bactérias.⁽¹³⁾

Controlo de qualidade no setor da Microbiologia

- Meios de cultura (cada lote de novos meios)

Colocar uma placa de cada meio preparado devidamente identificada a 37°C por 48 horas (a de meio adequado ao isolamento de fungos, durante 5 dias à T ambiente).

Exame macroscópico: observar se há crescimento bacteriano; observar eventual desidratação (meios com ranhuras ou descolados da parede da placa devem ser inutilizados), cor (comparar com lote anterior e se diferente tornar a determinar pH), e transparência do meio (observar presença de turvação ou precipitado).

- pH- verificar pH (pode variar +/- 2 do especificado pelo fabricante)
- Reagentes e corantes

Utilização de microrganismos para visualizar reações positivas e negativas, de acordo com a tabela 16.

Tabela 16. Controle de Qualidade realizado no setor da Microbiologia

Teste	Controlo positivo	Resultado previsto	Controlo negativo	Resultado previsto	Frequência das provas
Gram (lâminas)	<i>Staph. aureus</i>	Microrganismos púrpura	<i>E.coli</i>	Microrganismos avermelhados	Novos lotes e depois de 15 em 15 dias
Água oxigenada	<i>Staph. aureus</i>	Revela efervescência	-	-	Uma vez por semana

Controlo de qualidade interno – Todos os meses a Biomérieux envia estirpes ATCC (American Type Culture Collection) (Gram (+) e Gram (-)) para avaliar as galerias de identificação e galerias de antibiograma.

Capítulo 2. Hematologia

2.1 Colheita de sangue venoso

A colheita de sangue venoso é realizada através de punção venosa. O sangue é colhido diretamente para tubos de vácuo (*Vacutainer*) que contêm já a concentração correta de anticoagulante. Os anticoagulantes mais utilizados são o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e o citrato trissódico. Ambos atuam por remoção do cálcio.

O EDTA é um anticoagulante sólido e é o mais indicado para contagens de células sanguíneas. O *citrato trissódico* é líquido e é o anticoagulante mais utilizado nos estudos da coagulação e das plaquetas.

Para a obtenção de um hemograma válido, é essencial que a colheita e o processamento da amostra de sangue sejam feitos corretamente.

2.2 Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico de rotina. Inclui determinações quantitativas e qualitativas das células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A amostra utilizada é o sangue total.

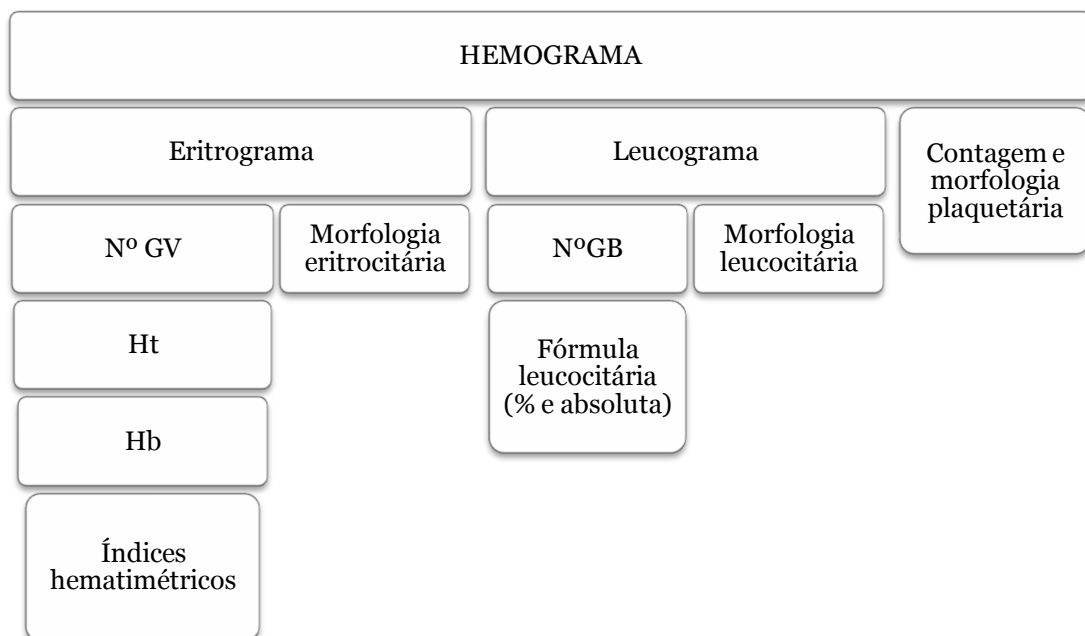


Figura 5. Parâmetros obtidos de um hemograma

Neste laboratório, o hemograma é obtido pelo autoanalisador Coulter Hmx hematology (Fig. 6) da BECKMAN COULTER.



Figura 6. Autoanalisador Coulter Hmx Hematology

Este autoanalisador tem como princípio de funcionamento, a Impedância elétrica, que foi desenvolvida por Wallace Coulter e baseia-se na quantificação dos impulsos gerados pelas células ao passar por um orifício onde flui uma corrente contínua. Pelo facto de as células sanguíneas não conduzirem bem a eletricidade, ao passar por esta pequena abertura ocorre um aumento mensurável da impedância elétrica. Deste modo são contadas e medidas as células, uma vez que o impulso é proporcional ao tamanho da célula analisada.

Com este método são contados eritrócitos, e em diferente diluição após lise dos eritrócitos contam-se os leucócitos e as plaquetas. É fundamental regular a intensidade da corrente e o "limiar" de deteção para o tamanho da partícula a ser contada.⁽²⁷⁾

2.3 Esfregaço sanguíneo

Neste laboratório, são realizados esfregaços sanguíneos quando:

- Os resultados do hemograma estão alterados
- Quando esse exame é requisitado
- Se pretende estudar a morfologia do eritrócito ou dos diferentes leucócitos.

A análise citológica é uma parte importante na avaliação da doença hematológica. Embora um diagnóstico específico possa ser sugerido com base em resultados obtidos por métodos automáticos, algumas patologias têm uma contagem celular normal com

morfologia celular anormal. A coloração do esfregaço sanguíneo é feita com o kit de coloração.

Esse Kit, tem como princípio a coloração de Wright. São corantes do tipo Romanovsky, que possuem, a eosina, e o azul e azur de metileno. Sendo a eosina (laranja/róseo) um componente ácido, cora os componentes básicos da célula (componentes acidófilos). O azul de metileno (azul/roxo) e o azur de metileno (púrpura) coram os componentes ácidos da célula (componentes basófilos).

2.4 Contagem de reticulócitos

Consiste na contagem de eritrócitos imaturos no sangue periférico. O seu número encontra-se aumentado quando a produção medular de eritrócitos aumenta. A sua contagem é útil para distinguir situações hipoproliferativas (p. ex. anemia ferropénica) e hiperproliferativas (p. ex. anemia hemorrágica e hemolítica).

A coloração é feita recorrendo a um kit de coloração.

Os corantes azul de metileno e o azul brilhante de cresilo precipitam com o RNA. Desde que o RNA dos reticulócitos desaparece, alguns dias depois eles entram na corrente sanguínea. O número de reticulócitos é provavelmente o melhor e mais fácil indicador da eritropoiese.⁽²⁸⁾

2.5 Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é um teste de rotina no estudo hematológico, apesar de não ser um teste específico.

A amostra utilizada nesta determinação, é o sangue total.

É uma análise de rotina por se encontrar alterada em diversas situações, tais como processos infecciosos e inflamatórios em atividade. É por isto um teste com valor diagnóstico. Permite tanto estudar a evolução dos processos em que há alteração da VS como estudar a resposta terapêutica.

Um aumento da VS, não é um fenómeno específico, mas é clinicamente útil em doenças em que há aumento da produção de proteínas de fase aguda.

Neste laboratório, a VS é determinada pelo aparelho TEST 1 THL (Fig. 7) da ALI FAX, um microfotómetro capilar, que tem como princípio da análise a fotometria capilar de fluxo (análise cinética).



Figura 7. Test 1 THL

2.6 Estudo da coagulação

As provas de screening da coagulação têm interesse no estudo de alterações do processo de coagulação. Para este estudo, a amostra a usar é o plasma citratado. O sangue é então colhido para um tubo com o anticoagulante citrato trissódico, pois este preserva os fatores de coagulação lábeis (fator V e fator VIII). A amostra tem de estar refrigerada.

Neste laboratório, são determinados, o tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de protrombina e I.N.R..

TTPa	•Estuda a via intrínseca e a via comum
TP	•Estuda a via extrínseca e a via comum
TT	•Estuda a fase final da via comum

2.6.1. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada ou Tempo de Cefalina-Caolino

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) é um teste de rastreio da coagulação e estuda a via intrínseca (fatores XII, XI, IX, VIII,) e a via comum (fator X, V, protrombina e fibrinogénio). As principais aplicações do TTPa são a deteção de deficiências congénitas e adquiridas desses fatores, assim como a monitorização da terapêutica da heparina com heparina não fracionada.

Observa-se o prolongamento do TTPa nos seguintes estados clínicos:

Deficiências congénitas	Deficiências adquiridas e estados patológicos
<ul style="list-style-type: none"> Deficiência dos fatores: VIII, IX, XI e XII Deficiência do quininogénio de alto peso molecular (fator Fitzgerald) 	<ul style="list-style-type: none"> Doença hepática Coagulação vascular disseminada Presença de inibidores da coagulação Tratamento com heparina ou anticoagulantes orais

Princípio do teste: É adicionada às amostras de plasma uma mistura de cefalina (substituto plaquetário) e de suspensão de caolino (ativador), que é incubada durante exatamente 3 min a 37°C. Isto dá início à ativação de contacto dos fatores XII e XI.

A adição subsequente de solução de cloreto de cálcio ativa o sistema de coagulação endógena (intrínseco) originando a formação de fibrina. É medido o tempo decorrido entre a adição de cloreto de cálcio e a formação de um coágulo de fibrina.⁽²⁹⁾

2.6.2. Tempo de Protrombina ou Tempo de Quick e INR

A determinação do tempo de protrombina (TP) permite fazer o estudo da via extrínseca e da via comum, ou seja, os fatores VII, X, V, II e o fibrinogénio.

Um aumento do TP é observado nos seguintes estados clínicos:

Deficiências congénitas	Deficiências adquiridas e estados patológicos
<ul style="list-style-type: none"> deficiências dos fatores II, V, VII, X 	<ul style="list-style-type: none"> Insuficiência hepática (cirrose, hepatite) Tratamento com antagonistas de vitamina K Hipovitaminose K: deficiência nutricional, perturbações da adsorção ou do metabolismo da vitamina K (doença hemorrágica do recém nascido, colestase ou tratamento com antibióticos) Fibrinólise Coagulação intravascular disseminada

O tempo de protrombina é particularmente indicado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais (varfarina) devido à sua sensibilidade relativamente às variações de concentração dos fatores II, VII e X dependentes da vitamina K.

Princípio do teste: A adição de tromboplastina com cálcio ao plasma citratado inicia a cascata de reações, da qual resulta a formação de um coágulo de fibrina. O tempo decorrido até ao início da coagulação é comparado com o tempo determinado utilizando o padrão normal. As atividades dos seguintes fatores de coagulação são medidas:

- Fator II (protrombina), V (proacelerina), VII (proconvertina), X (fator Stuart-Prower).

International Normalized Ratio (INR)

A utilização do *International Normalized Ratio* (INR) é recomendada para a avaliação do TP na terapêutica com antagonistas da vitamina K em doentes hipocoagulados.

Vários estudos internacionais demonstraram que, na fase estável da terapêutica anticoagulante oral, os resultados podem variar significativamente conforme a origem do reagente de tromboplastina e o analisador utilizado na medição.

Para resolver este problema, a Organização Mundial de Saúde (OMS) introduziu um procedimento de padronização válido para as tromboplastinas. Este procedimento produz resultados que são independentes do reagente durante a fase estável da terapêutica anticoagulante oral. Neste sistema, o rácio do TP é convertido no INR utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP doente}}{\text{TP normal do dia}} \right)^{\text{ISI}}$$

O valor ISI (International Sensivity Index) de uma tromboplastina específica é determinado efetuando análises comparativas entre o reagente de tromboplastina a padronizar e uma tromboplastina de referência internacional.

Os plasmas normais, assim como os plasmas procedentes de doentes submetidos a terapêutica anticoagulante oral estável, são utilizados para determinar o valor ISI de acordo com um esquema concreto e predefinido.⁽³⁰⁾

O estudo da coagulação é efetuado no aparelho Option 4 Plus da Biomérieux (Fig. 8), este possui uma zona com termóstato, dividida em 3 zonas (I,M,R).



Figura 8. Option 4 Plus

Tabela 17. Zonas e funções do Option 4 Plus

Zona	Função
Zona I	Incubação de amostras
Zona M	Medição
Zona R	Incubação dos reagentes

Princípio de funcionamento: A formação do coágulo é revelada através de um fotodíodo que mede as variações de densidade ótica do meio reacional. A luz é emitida por um fotodíodo que, emitindo uma luz intermitente, elimina a interferência com a luz exterior. A rotação da esfera assegura a homogeneização do meio reacional e a ausência de sedimentação no caso de usar reagentes específicos.

A modificação da densidade ótica causada pela adição de reagente desencadeia o início das medições. Aliás, esta é precedida por um ajuste automático da luz incidente que torna assim a medição independente das características óticas do meio reacional (reagente mais plasma).

Em função da concentração em fibrinogénio do meio, a reação traduz-se pelo aumento da densidade ótica (concentração forte em fibrinogénio) ou por uma diminuição da densidade ótica, no caso contrário. Neste último caso, o papel da esfera para além da sua ação de homogeneização, é revelar a fibrina formada, o que torna a solução mais clara.

Este sistema permite, portanto, detetar os coágulos mais finos (hipofibrinogenemias-plasmas com uma grande concentração de heparina).⁽³¹⁾

2.7 Determinação de grupos sanguíneos

Os dois grupos mais importantes são o sistema ABO e o sistema Rhesus. Relativamente ao sistema ABO, a determinação do grupo sanguíneo consiste na identificação dos antígenos existentes nos eritrócitos e que são geneticamente determinados por 3 genes, respetivamente, os genes A, B e O.

Conforme a existência dos antígenos A e B, os eritrócitos são classificados (fenotipicamente) como sendo do grupo A, B, AB ou O.

No soro de indivíduos de cada um dos grupos, existem anticorpos chamados naturais: anti-A (em indivíduos do grupo B); anti-B (em indivíduos do grupo A); anti-A e anti-B (em indivíduos do grupo O), sendo que os indivíduos do grupo AB não possuem os anticorpos anti-A e anti-B no soro.

Grupo sanguíneo	Aglutinogénios	Aglutininas
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
O	ausente	Anti-A e anti-B
AB	A e B	ausente

O sistema Rhesus caracteriza-se pela existência de diferentes antígenos: C, D, E, c, d, e e na membrana dos eritrócitos.

Neste laboratório, por ser um laboratório de rotina, faz-se apenas a identificação de Rh⁺ ou Rh⁻, isto é, se tem ou não antígeno D na membrana do eritrócito. Este sistema caracteriza-se pela ausência de anticorpos naturais.⁽³²⁾

Neste laboratório, a determinação de grupos sanguíneos é efetuada pela técnica em tubo.

Assim, inicialmente, é preparada uma suspensão de eritrócitos, e posteriormente adiciona-se uma gota da suspensão de eritrócitos a cada um dos tubos que possuem os anticorpos: anti-A, anti-B e anti-D. Após centrifugação, observa-se a presença ou ausência de aglutinação.

Na ausência de aglutinação no tubo com anti-D, faz-se sempre a pesquisa do fator D fraco (variante Du) e do fator D parcial. Após incubação, adiciona-se soro de Coombs. A confirmação da presença de aglutinação efetua-se por observação no microscópio ótico de aglutinados de eritrócitos.

2.8 Prova de Coombs indireta

A prova de Coombs indireta consiste na pesquisa de anticorpos irregulares presentes no SORO.

Prova de Coombs indireta
Provas de compatibilidade transfusional
Pesquisa de anticorpos irregulares (grávida)
Pesquisa do fator D fraco e D parcial

Esta é uma prova que se realiza sempre em grávidas Rh⁻. Isto porque, durante a gravidez, o tecido que separa os vasos placentares (onde circula sangue do feto) do espaço interviloso (onde circula sangue materno) vai diminuindo de espessura, permitindo que as trocas de sangue entre mãe e feto vão aumentando até ao termo da gestação. A partir da 6^a semana de gravidez, quando o feto Rh⁺ começa a ter antigénio Rh em circulação, é induzida a produção de anticorpos anti-D nas grávidas Rh⁻, ficando estas sensibilizadas.

Numa futura gestação, a consequência desta sensibilização será a doença hemolítica perinatal (DHPN), situação responsável por uma morbilidade e mortalidade perinatal significativa.

O procedimento consiste em adicionar 200 µL de soro do doente e 100 µL da solução O⁺. Deixar a incubar em banho maria durante 60 min. De seguida efetuam-se 3 lavagens dos eritrócitos e adiciona-se soro de Coombs (soro antiglobulina humana, de largo espectro ou específico, aglutina eritrócitos sensibilizados por anticorpos).

A confirmação da presença de aglutinação efetua-se por observação no microscópio ótico de aglutinados de eritrócitos.

2.9 Controlo de Qualidade no setor da Hematologia

➤ Autoanalisador Coulter HMX

Diariamente, antes do início dos trabalhos, são utilizados os controlos Latron 1 e 2. Estes permitem verificar se os parâmetros: volume, condutância e complexidade da célula estão a ser medidos corretamente. O autoanalisador é novamente controlado, caso se obtenha valores fora dos valores de referência.

São usados controlos de sangue 5C (níveis I, II, III): uma vez por dia, no início dos trabalhos, alternando os níveis. Possui um nível normal e dois patológicos. É utilizado dois meses por ano.

O Controlo de sangue 4 C: uma vez por dia, no início dos trabalhos – 1 nível normal.

Controlos de sangue – 4C e 5C

➤ Fórmulas leucocitárias

Uma lâmina de um esfregaço sanguíneo é vista uma vez por semana por 2 observadores diferentes.

➤ Coagulação

Efetua-se um “pool” de plasmas normais para controlo das amostras. E para cada novo lote de reagente faz-se uma curva de calibração, com plasmas de referência.

Capítulo 3. Serologia

Os testes de serologia mais vezes requisitados neste laboratório, são a pesquisa de Proteína C reativa, pesquisa de fator reumatoide e o teste V.D.R.L. (*Venereal Diseases Reference Laboratory*). No entanto, estão descritas de seguida também a Reação de Widal, Reação de Wright e Reação de Weil Felix, que são requisitadas esporadicamente.

Para os seguintes testes serológicos, é utilizado o soro como amostra.

3.1 Proteína C reativa

A pesquisa de Proteína C Reativa (PCR) é efetuada através de um teste rápido de aglutinação. A PCR está associada a infeções agudas, e a uma variedade de estados inflamatórios. Existe uma correlação significativa entre os níveis séricos de PCR e o início do processo inflamatório. A monitorização dos níveis desta proteína permite avaliar a eficácia do tratamento e a recuperação do doente.

Princípio do teste: As partículas de látex são revestidas com anticorpos humanos anti-PCR (anti-Proteína C Reativa). Quando se mistura a suspensão de látex com soro que contenha níveis elevados de PCR, irá produzir-se uma aglutinação nítida num período máximo de 2 min.⁽³³⁾

O procedimento efetuado, está representado na Figura 9.

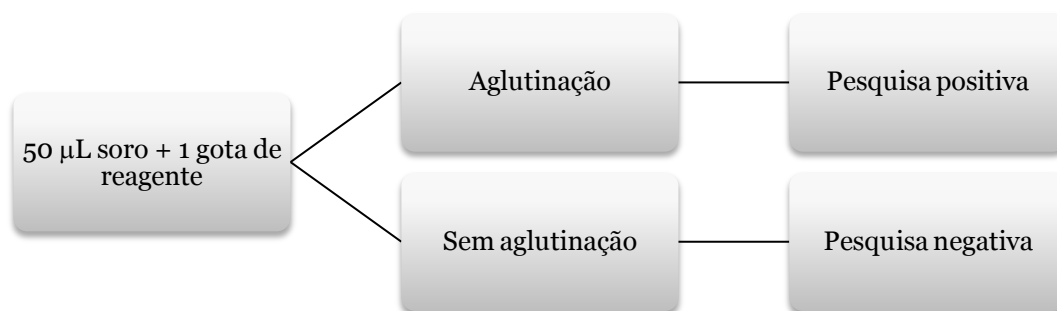


Figura 9. Procedimento da pesquisa de proteína C reativa

3.2 Teste VDRL e TPHA

O teste VDRL é um teste de flocculação não específico para o diagnóstico de Sífilis através da pesquisa de anticorpos (reaginas) no soro.

Princípio do teste: Quando existe ligação entre colesterol/cardiolipina/lectina no reagente e os anticorpos reagina na amostra, ao fim de oito min, a aglutinação pode ser observada sob a forma de manchas pretas.⁽³⁴⁾

O procedimento do teste está representado na Figura 10:



Figura 10. Procedimento do teste VDRL

As amostras que apresentarem aglutinação no teste qualitativo devem ser seguidas do teste semiquantitativo.

Para isso, são preparadas diluições sucessivas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) em soro fisiológico. O resultado é o correspondente à última diluição com aglutinação.

Podem ocorrer reações falsas positivas quando os doentes são portadores de outras patologias que não a Sífilis (p. ex., Lúpus Eritematoso Sistémico, Artrite Reumatoide). Sempre que um teste apresente um resultado positivo deve realizar-se um teste específico para a confirmação da infeção por *Treponema pallidum*.

Neste laboratório, a confirmação é feita com um teste específico e sensível de hemaglutinação passiva para a deteção dos anticorpos antitreponema pallidum no soro, o TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination assay*).

Princípio do teste: É constituído por eritrócitos de aves sensibilizados com antígenos tratados com formol, o controlo com eritrócitos de aves (não sensibilizados), diluente e um soro controlo. Quando as amostras positivas diluídas são misturadas com os eritrócitos sensibilizados, os anticorpos reagem com os antígenos do eritrócito sensibilizado provocando a aglutinação das células. As células formam um padrão característico no fundo do poço da placa de microtitulação. Na ausência de anticorpos, forma-se um botão compacto no fundo do poço (Fig. 11).⁽³⁵⁾

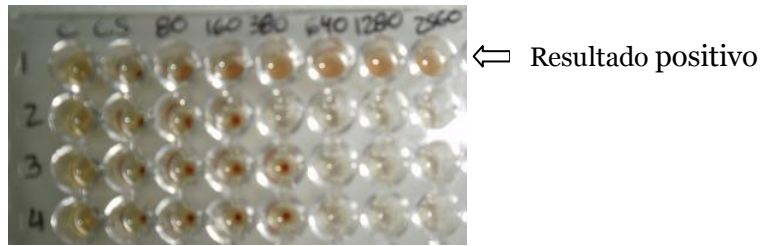


Figura 11. Placa de microtitulação - TPHA

3.3 Fator reumatoide

O fator reumatoide (FR) encontra-se no soro de doentes com artrite reumatoide e acredita-se que seja constituído por anticorpos IgM dirigidos contra as imunoglobulinas do doente.

É usado um teste rápido de aglutinação de látex em placa para pesquisa do FR no soro.

Princípio do teste: As partículas de látex são revestidas com gama globulina humana altamente purificada. Quando a suspensão de látex é misturada com soro contendo níveis elevados de FR, observa-se uma aglutinação nítida num período máximo de 2 min.⁽³⁶⁾

O procedimento deste teste, está de seguida representado:



Figura 12. Procedimento do teste FR

3.4 Reação de Widal

Esta reação permite o diagnóstico laboratorial da febre tifoide (*S. typhi*) e paratifoide (*S. paratyphi* A, B, C, D). Esta quantifica os anticorpos anti-O e anti-H, presentes no soro do doente, por reação de aglutinação com suspensões antigénicas de Salmonella (AO, AH, BO, BH, CO, CH e TO, TH).

A reação de Widal auxilia o diagnóstico da febre tifoide e paratifoide. Através de suspensões homogéneas de bacilos típicos e paratípicos “A” ou “B” colocadas em contacto com o soro, diagnostica-se o agente específico causador da infeção.

Empregam-se na reação de Widal, também os antígenos “O” somático e “H” flagelar que lhe aumentam o valor diagnóstico. O soro dos doentes com febre tifoide contém anticorpos dirigidos contra os antígenos “O” e “H” de *S. typhi* ou de outras salmonelas envolvidas no processo infeccioso.

Neste laboratório, pesquisam-se anticorpos contra o Antígeno O e H de *Salmonella Typhi*. E os Antígenos H da *Salmonella paratyphi* do grupo A e B.

Princípio do teste: As partículas de látex são revestidas com os diferentes antígenos acima especificados. Quando o reagente é adicionado ao soro, e quando neste existem anticorpos contra os antígenos é visível uma aglutinação ao fim de 2 min.

3.5 Reação de Wright

Nesta reação é efetuada a pesquisa de anticorpos específicos no soro contra *Brucella abortus*.

O Homem contamina-se por contacto direto com o animal infetado ou por contacto indireto, através do consumo de produtos lácteos, como o leite não pasteurizado, queijo fresco feito com leite cru.⁽¹³⁾

Princípio do teste: As partículas de látex são revestidas com antígenos de *Brucella abortus*. Quando o reagente é adicionado ao soro, e caso nele estejam presentes anticorpos específicos para esses antígenos, uma aglutinação é visível ao fim de 2 min.

3.6 Reação de Weil Felix

A Reação de Weil Felix é um teste de aglutinação para o diagnóstico de infeções provocadas por rickettsias. Não se usam antígenos de *Rickettsiae* pela dificuldade na sua obtenção, mas as estirpes OX 2, OX 19 e OX K de *Proteus vulgaris*, uma vez que se verificou que estas dão reação cruzada com os anticorpos anti-Rickettsiae.

Princípio do teste: As partículas de látex são revestidas com antígenos OXK, OX2 e OX19 do *Proteus*. Quando o reagente é adicionado ao soro do doente, e quando nele estão presentes anticorpos específicos contra estes antígenos, é visível uma aglutinação ao fim de 2 min.⁽³⁷⁾

O procedimento dos últimos três testes referidos está de seguida representado:



Figura 13. Procedimento da Reação de Widal, Reação de Wright e Reação de Weil Felix

Em caso positivo, utilizam-se menores volumes de soro, adicionando uma gota de reagente. O resultado é o correspondente à última diluição com aglutinação.

3.7 Controlo de Qualidade no setor da Serologia

É efetuado um controlo positivo e um negativo em cada teste serológico.

Capítulo 4. Bioquímica

A maioria das análises do foro bioquímico, neste laboratório são efetuadas em autoanalisadores, como o Olympus AU 600 (Fig. 14), Elecsys e cobas e 411 (Fig. 15).

Em todos, é utilizado um sistema de identificação dos tubos com código de barras, sendo que, não é necessária programação manual.



Figura 14. Olympus AU 600



Figura 15. Elecsys (à esquerda) e cobas e 411 (à direita)

O soro é a principal amostra utilizada neste setor. Para ser obtido, a colheita de sangue é feita para um tubo sem anticoagulante. Assim a cascata de coagulação é ativada. O soro constitui a fração não celular do sangue do qual foram também removidos o fibrinogénio e outras proteínas intervenientes na coagulação.

Os tubos utilizados na bioquímica possuem um gel, que após centrifugação separa o coágulo (em baixo) do soro (em cima). Também é utilizada a urina como amostra, para a determinação por exemplo, da microalbuminúria e clearance da creatinina.

A maioria das determinações bioquímicas são realizadas no autoanalisador Olympus AU 600. Este utiliza métodos enzimáticos, cinéticos e colorimétricos nas medições.

São referidos, de seguida alguns analitos, a sua importância e princípio de medição.

4.1 Autoanalisador Olympus AU 600

Avaliação da função hepática

Para a avaliação da função hepática, são determinados quantitativamente no soro, alguns analitos:

Tabela 18. Marcadores da função hepática

Aspartato aminotransferase (AST)
Alanina aminotransferase (ALT)
Fosfatase Alcalina (ALP)
γ -Glutamilttransferase (GGT)
Bilirrubina sérica total e direta
Albumina

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) encontra-se em quase todos os tecidos do organismo, mais concretamente em/ou nas membranas celulares.⁽³⁸⁾ Aumentos da atividade desta enzima na doença hepática, ocorrem geralmente em resposta à colestase, que pode ser intra ou extra hepática.⁽³⁹⁾

Também podem ser encontrados níveis elevados de ALP em doenças primárias dos ossos, nomeadamente osteomalacia, intoxicação por vitamina D e tumores ósseos primários.

Esta enzima é determinada no autoanalisador Olympus através de um ensaio de cor cinético.

Princípio do teste: A atividade da fosfatase alcalina é determinada através da medição da taxa de conversão de p-Nitrofenilfosfato (pNPP) em p-Nitrofenol (pNP) na presença de iões de magnésio e etilenodiamina como aceitador de fosfato a pH 9,8. A taxa de aumento na absorvância decorrente da formação de pNP é medida bicromaticamente a 410/480 nm e é diretamente proporcional à atividade de ALP na amostra.⁽³⁸⁾

γ-Glutamiltransferase

A γ-Glutamiltransferase (GGT) existe em todas as células do organismo, exceto nas dos músculos; contudo, a enzima existente no soro parece originar essencialmente do sistema hepatobiliar.

A GGT aumenta acentuadamente nos casos de obstrução biliar intrahepática ou pós-hepática, em doentes com hepatite infecciosa, fígado gorduroso, pancreatite aguda e crónica e doentes medicados com drogas anticonvulsivas, nomeadamente fenitoína e fenobarbital. Como os níveis elevados de GGT são registados em doentes com cirrose alcoólica e na maioria dos soros de indivíduos que consumam grandes quantidades de álcool, a GGT desempenha um papel na deteção do alcoolismo, lesões do fígado provocadas pelo álcool e na monitorização de abstinência do álcool.

Esta enzima é determinada no autoanalisador Olympus através de um ensaio de cor cinético.

Princípio do ensaio: A GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido, para glicilglicina, produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. A alteração na absorvância a 410/480 nm deve-se à formação de 5-amino-2-benzoato e é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra.⁽⁴⁰⁾

Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total

A bilirrubina é um produto resultante da quebra da hemoglobina. A porção do heme da hemoglobina e de outras proteínas que contêm heme é removida e metabolizada em bilirrubina.

A bilirrubina formada liga-se à albumina e é transportada para o fígado onde é conjugada com ácido glucurónico (bilirrubina conjugada ou direta) para se tornar solúvel e ser eliminada pelos canais biliares através do aparelho digestivo.⁽⁴¹⁾ A bilirrubina é um pigmento de cor amarela e o seu aumento faz com que a pele e mucosas tomem uma coloração amarela por vezes intensa denominada icterícia.⁽³⁹⁾

A icterícia pode ter origem:

- Hemolítica: Aumento da destruição dos eritrócitos com conseqüente aumento da produção de bilirrubina que ultrapassa a capacidade de conjugação e metabolização do fígado fazendo elevar os níveis de bilirrubina não conjugada (indireta) no sangue.

- Hepatocelular: Imaturidade ou um déficit congénito do sistema enzimático de conjugação (doença de Gilbert), ou ainda secundário a infeções da célula hepática.
- Colestática: Os canalículos biliares ficam bloqueados (cálculos, tumores...). A obstrução do canal biliar ou as lesões da estrutura hepatocelular causam aumentos dos níveis tanto da bilirrubina conjugada (direta) como da não conjugada (indireta).

O autoanalisador Olympus, utiliza um método colorimétrico tanto para a determinação quantitativa da bilirrubina direta, como para a determinação de bilirrubina total no soro.

➤ Bilirrubina Direta

Princípio do teste: Um sal de diazónio estabilizado, 3,5-Diclorofenil-diazónio-tetrafluorborato (DPD), liga-se diretamente à bilirrubina (conjugada) direta num meio ácido para formar azobilirrubina. A absorvância a 570nm é proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra.⁽⁴²⁾

➤ Bilirrubina Total

Princípio do teste: O sal DPD reage com a bilirrubina conjugada e com a bilirrubina não conjugada na presença de um catalisador para formar a azobilirrubina. A absorvância a 540 nm é proporcional à concentração de bilirrubina total. É efetuado um branco da amostra separadamente para reduzir a própria interferência do soro.⁽⁴¹⁾

Avaliação da função renal

Para esta avaliação são determinados quantitativamente:

Tabela 19. Marcadores da função renal

Ureia
Creatinina
Clearance da creatinina
Microalbuminúria

Creatinina

A creatinina é um produto metabólico da creatina e fosfocreatina, que se encontram ambos quase exclusivamente nos músculos. Por isto, a produção de creatinina é proporcional à massa muscular e varia pouco de dia para dia.

As medições de creatinina são usadas no diagnóstico e tratamento de doenças renais e revelam-se úteis na avaliação da função glomerular dos rins e na monitorização da diálise renal.

A creatinina do soro varia em função da idade, peso corporal, raça e sexo do indivíduo. Por vezes, é baixa em indivíduos com massa muscular relativamente reduzida, doentes caquéticos, amputados e em pessoas de idade avançada. Um nível de creatinina no soro que seria habitualmente considerado normal não exclui a presença de um quadro de insuficiência renal.

A creatinina no soro, ou na urina, é determinada quantitativamente através de um ensaio enzimático.

Princípio do ensaio: A creatinina é hidrolisada pela creatininase para formar creatina. A creatina formada é hidrolisada pela creatinase para formar sarcosina e ureia. A sarcosina oxidase catalisa a desmetilação oxidativa da sarcosina para formar glicina, formaldeído e peróxido de hidrogénio. Na presença de peroxidase (POD), o peróxido de hidrogénio formado reage por condensação de oxidação quantitativa com N-(3-sulfopropil)-3-metoxi-5-metilnilina (HMMPS) e 4-aminoantipirina para formar um pigmento azul. A concentração de creatinina é proporcional à alteração da absorvância a 600/700 nm.⁽⁴³⁾

Clearance da creatinina

A clearance da creatinina permite avaliar a taxa de filtração glomerular (TFG). A estimativa da taxa de filtração glomerular é calculada através da medição da concentração de creatinina em urina de 24 horas e da sua concentração no soro.

$$\text{TFG} = \frac{\text{Concentração na urina} \times \text{Volume de urina 24h}}{\text{Concentração no soro}} \times 1.73 \text{ A}$$

A- Superfície corporal

Microalbuminúria

O termo microalbuminúria indica uma taxa de excreção urinária de albumina de 30 a 300mg/dia.

O aparecimento de níveis baixos mas anormais de albumina na urina, não é detetado em testes qualitativos convencionais (tiras de teste) para proteinúria. A microalbuminúria é um marcador de risco estabelecido para a progressão da nefropatia na Diabetes Mellitus e associa-se a mortalidade cardiovascular aumentada, não só em diabéticos, mas também em indivíduos não diabéticos, acompanhando-se de um perfil de risco mais desfavorável.

A determinação quantitativa de albumina na urina é efetuada através de um teste imunoturbidimétrico, em amostra de urina de 24h.

Princípio do ensaio: Quando uma amostra é misturada com tampão e solução antissoro, a albumina humana reage especificamente com anticorpos de albumina anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de albumina na amostra.⁽⁴⁴⁾

Ureia

A ureia é sintetizada no fígado como o produto final do metabolismo das proteínas e dos aminoácidos. Por conseguinte, a síntese da ureia depende da ingestão diária de proteínas e do metabolismo endógeno das proteínas. A maior parte da ureia produzida durante estes processos metabólicos é eliminada por filtração glomerular, sendo que 40-60 % volta a difundir-se no sangue, independentemente do caudal no túbulo proximal. A redisseminação no túbulo distal depende do fluxo urinário e é controlada pela hormona antidiurética.

Os níveis de ureia podem estar elevados devido a causas renais, nomeadamente glomerulonefrite aguda, nefrite crónica, rim poliquístico, e necrose tubular.

As determinações de ureia e creatinina no soro são frequentemente realizadas em conjunto no diagnóstico diferencial da função renal.

A ureia é determinada quantitativamente através de um ensaio UV cinético.

Princípio do teste: A ureia é hidrolizada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. O amoníaco produzido na primeira reação combina com 2-oxoglutarato e NADH na presença de glutamato-desidrogenase (GLDH) para produzir glutamato e NAD⁺. A redução de absorvância de NADH por unidade de tempo é proporcional à concentração de ureia.⁽⁴⁵⁾

Outros Analitos

Glucose

Em jejum, os níveis de açúcar no sangue são controlados pelo fígado, que garante a sua manutenção dentro dos limites exatos. A forma rápida e precisa em que os níveis de açúcar no sangue no estado de jejum são controlados contrasta assinaladamente com o aumento rápido do açúcar no sangue, que ocorre durante a ingestão de hidratos de carbono.

A queda de glucose no sangue para um nível crítico conduz a disfunção do sistema nervoso central. Tal se manifesta num estado de hipoglicémia, caracterizado por fraqueza muscular, problemas de coordenação e confusão mental. As concentrações de glucose no sangue revelam flutuações intraindividuais dependentes da atividade muscular e do intervalo de tempo desde a ingestão de alimentos. Estas flutuações são ainda maiores quando há descontrolo, tal como ocorre em vários estados patológicos nos quais a glucose no sangue pode ser elevada (hiperglicémia) ou reduzida (hipoglicémia).

A medição de glucose no sangue é utilizada como ensaio de rastreio da diabetes mellitus, quando existe suspeita de hiperglicémia, monitorização na terapia da diabetes mellitus, avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono, por exemplo na diabetes gestacional, hepatite aguda, pancreatita aguda e doença de Addison.

A glucose é determinada quantitativamente no soro através de um ensaio UV enzimático (método de hexoquinase).

Princípio do ensaio: A glucose é fosforilada pela hexoquinase (HK) na presença de adenosina trifosfato (ATP) e de iões de magnésio para produzir glucose-6-fosfato e adenosina difosfato (ADP). A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH) oxida em específico a glucose-6-fosfato para gluconato-6-fosfato com a redução concomitante de NAD^+ para NADH. O aumento na absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de glucose na amostra.⁽⁴⁶⁾

Diabetes Mellitus

Na diabetes mellitus, a hiperglicémia ocorre com mais frequência como resultado de uma insuficiência na quantidade ou eficácia da insulina. A diabetes mellitus pode ser:

Tabela 20. Tipos de Diabetes

Tipo 1	Destrução das células Beta do pâncreas, levando a insulinopenia absoluta (autoimune ou idiopática).
Tipo 2	Ocorre predominantemente por insulinoresistência, com insulinopenia relativa, ou por um defeito secretor predominante, coexistindo, frequentemente ambas as alterações.
Diabetes Gestacional	Caracterizada por qualquer grau de intolerância que aparece pela primeira vez durante a gravidez.
Outros tipos específicos de Diabetes	Defeitos genéticos da célula B pancreática, Endocrinopatias, Defeitos genéticos na ação da insulina, etc.

Hemoglobina glicada (HbA1c)

A hemoglobina glicada (HbA1c) resulta da glicação não enzimática de grupos amínicos livres no terminal N da cadeia beta de hemoglobina A_o. O nível de HbA1c é proporcional ao nível de glucose no sangue. Uma vez que a glucose permanece ligada ao eritrócito durante o seu ciclo de vida, a medição de HbA1c fornece uma indicação da concentração média diária de glucose no sangue durante os 2 meses anteriores.

Por conseguinte, a medição de HbA1c é considerada uma importante ferramenta de diagnóstico na monitorização do controlo dietético e dos regimes terapêuticos durante o tratamento da diabetes.

A HbA1c é determinada quantitativamente em sangue total, no autoanalisador Olympus através de um ensaio de imunoinibição.

São determinadas as concentrações de HbA1c e hemoglobina total. A relação HbA1c/hemoglobina total é expressa como uma percentagem de HbA1c (%HbA1c). O ensaio para percentagem de HbA1c, implica a utilização de 4 reagentes: Hemoglobina total R1, reagente anticorpo HbA1c R1, reagente aglutinador HbA1c R2, e Desnaturante de hemoglobina (comercializado separadamente).

Princípio do ensaio: Numa fase de pré tratamento, o sangue total é misturado com desnaturante de Hb numa solução diluída de 1:41 (500 µL desnaturante + 5µL sangue total) e incubado durante um mínimo de 5 min à temperatura ambiente. Os eritrócitos são fragmentados e a cadeia de Hb é hidrolisada através da protease presente no reagente.

A Hb total é medida através da conversão de todos os derivados de Hb em hematina alcalina na solução alcalina de um detergente não iónico. A adição de amostra de sangue pré-tratada ao reagente de Hb total resulta numa solução verde, a qual é medida a 600nm. A HbA1c é medida num ensaio de inibição de aglutinação de látex. Um aglutinador, consistindo num polímero sintético contendo múltiplas cópias da porção imunorreativa de HbA1c, provoca a aglutinação do látex revestido com anticorpos no HbA1c R1 e o aglutinador no HbA1c R2 serão aglutinadas.

A aglutinação leva a um aumento na absorvância da suspensão. A presença de HbA1c na amostra resulta numa diminuição da taxa de aglutinação da HbA1c R1 e do aglutinador no reagente HbA1c R2. Por conseguinte, o aumento da absorvância é inversamente proporcional à concentração de HbA1c na amostra. O aumento da absorvância devido a aglutinação é medido a 700 nm.⁽⁴⁷⁾

Colesterol

O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um constituinte essencial das membranas celulares e das lipoproteínas e é igualmente um precursor de importantes compostos biologicamente ativos como as hormonas esteroides, sais biliares e vitamina D.

O colesterol é sobretudo transportado em 2 classes de lipoproteínas (LDL e HDL), as quais desempenham um papel contraditório na patogénese das perturbações lipídicas. Assim, a concentração de colesterol total proporciona apenas um valor de base que indica se devem ser levadas a cabo mais investigações laboratoriais do metabolismo de lipoproteínas (HDL, LDL e triglicerídeos).

O colesterol é quantificado no autoanalisador Olympus através de um ensaio enzimático colorimétrico.

Princípio da reação: Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (CHE). A colesterol oxidase converte o colesterol em colesteno-3-ona produzindo-se simultaneamente peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o qual acopla oxidativamente com a 4-aminoantipirina e fenol na presença de peroxidase (POD), produzindo um cromóforo (cor vermelha). O corante vermelho de quinoneimina pode ser medido espectrofotometricamente a 540/600 nm, sendo proporcional à concentração de colesterol na amostra.⁽⁴⁸⁾

Para além do colesterol total, são também quantificados o HDL e o LDL colesterol.

Triglicerídeos

Na alimentação humana, os triglicerídeos são os ésteres de glicerol com maior prevalência. A determinação dos triglicerídeos pode ser utilizada para o diagnóstico e tratamento de doentes com pancreatite aguda e crónica, diabetes mellitus, obstrução biliar extra-hepática e outras patologias que envolvam o metabolismo lipídico.

A determinação de triglicerídeos é efetuada através de um ensaio enzimático colorimétrico.

Princípio do teste: Este ensaio baseia-se numa série de reações enzimáticas conjuntas. Os triglicerídeos da amostra são hidrolisados através da combinação de lipases microbianas, produzindo glicerol e ácidos gordos. Na presença da glicerol quinase (GK), o glicerol é fosforilado através do ATP, originando glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é oxidado pela glicerol fosfato oxidase (GPO) produzindo peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e dihidroxiacetona fosfato. O H_2O_2 formado reage com a 4-aminofenona e N,N-bis (4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina, sal dissódico (MADB) na presença de peroxidase (POD) originando o cromóforo, que é lido espectrofotometricamente a 660/800nm. O aumento da absorvância é proporcional ao conteúdo de triglicerídeos na amostra.⁽⁴⁹⁾

4.2 Análise de Urina tipo II

A análise de urinas tipo II é efetuada no aparelho Urisys (Fig. 16), usando tiras de teste. Estas são utilizadas para a determinação de certos constituintes na urina indicativos de alterações renais, urinárias, hepáticas e metabólicas.



Figura 16. Urisys 2400

O URISYS 2400 é um fotómetro de refletância totalmente automatizado para medições semi quantitativas de tiras de teste de urina.⁽⁵⁰⁾

Nas tiras de teste são analisados parâmetros como o pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, sangue.

Na tabela seguinte são referidos os testes efetuados em cada tira e o seu princípio:

Tabela 21. Tiras de teste – Urina tipo II

Teste	Princípio do Teste
pH	A zona de teste contém os indicadores de pH vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol e reage especificamente com os iões de H ⁺ . O valor mais comum é um pH entre 5,5 e 6.
Leucócitos	O teste revela a presença de esterases granulocitárias. Estas esterases decompõem um éster indoxílico em indoxil, que reage com um sal de diazónio produzindo um corante violeta. Em geral, a presença de leucócitos na urina é sugestiva de infeção urinária.
Nitritos	A reação revela a presença de nitritos e, indiretamente, de bactérias produtoras de nitritos na urina, através de uma coloração rosa-vermelhada na zona de teste. Uma ligeira coloração rosa já indica bacteriúria significativa.
Proteínas	O teste baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. A reação é particularmente sensível à albumina.
Glucose	A determinação é baseada na reação específica da glucose-oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste é independente do pH e da gravidade específica da urina e não é afetado pela presença de corpos cetónicos. A presença de glucose na urina é um forte indício de que os níveis sanguíneos estão altos. Valores elevados de glucose na urina, sem elevados valores de glucose no sangue indicam doença dos túbulos renais.
Corpos cetónicos	O teste baseia-se no princípio da prova de Legal. A sensibilidade para o ácido acetoacético é superior à da acetona. Corpos cetónicos na urina: ácido acetoacético, acetona e Beta-hidroxi-butírico, aparecem em determinados estados fisiológicos e patológicos. São derivados principalmente do metabolismo dos ácido gordos tendo origem hepática.
Urobilinogénio	Um sal de diazónio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogénio, originando um corante azoico vermelho. A presença de urobilinogénio na urina, é indicativa de alterações hepáticas.
Bilirrubina	O teste baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazónio. Uma coloração ligeiramente cor-de-rosa já constitui um resultado positivo, ou seja, patológico.

Sangue/ Eritrócitos	A ação, semelhante á peroxidase, da hemoglobina e da mioglobina catalisa especificamente a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona de teste, originando uma coloração azul- esverdeada.
Zona de compensação	Esta zona branca, que não contém reagentes, permite uma compensação, por parte do analisador, para a cor intrínseca da urina quando está a avaliar os parâmetros relativos aos leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubina.

No Urisys 2400, os resultados são automaticamente calculados e posteriormente impressos no relatório em termos de “normal”, “negativo”, “positivo” ou valores de concentração. Tal como os resultados obtidos por comparação visual de cor, cada valor impresso corresponde a um intervalo de concentrações definido.

4.3 Sedimento urinário

O exame a fresco do sedimento urinário permite verificar a existência de cristais ou cilindros na urina, e fazer contagem de células presentes no sedimento. Permite também, a observação de *Trichomonas vaginalis* (parasita) e de bactérias.

4.4 Teste de gravidez na urina

Para realizar o teste de gravidez em urina, neste laboratório recorre-se a um teste rápido, qualitativo, de elevada especificidade e sensibilidade, para a determinação da hormona hcG (gonadotrofina coriónica humana), um marcador para a gravidez em amostras de urina.

A hcG é secretada através dos tecidos da placenta durante a gravidez, sendo depois excretada na urina, aproximadamente, 20 dias após o último período menstrual.

Princípio do teste: Imunocromatografia em membrana. À medida que a amostra de teste flui através da membrana, o conjugado coloidal dourado anti-hcG complexa com o hcG da amostra. Este complexo move-se para o interior da membrana (região de teste) onde é imobilizado pelo anti-hcG monoclonal que reveste a membrana, provocando assim a formação de uma linha rosada que confirma um resultado positivo do teste. A ausência desta linha rosada na região de teste indica um resultado negativo (Fig. 17).⁽⁵¹⁾

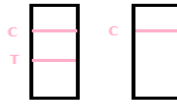


Figura 17. Resultado positivo e Resultado negativo

O conjugado que não reagiu e o complexo não ligado, se existirem, continuam a mover-se ao longo da membrana e são finalmente imobilizados pelos anticorpos anti camundongo que estão embebidos na região de controlo “C” formando uma linha rosada. Esta linha de controlo serve para validar os resultados do teste.

4.5 Pesquisa de sangue oculto

É efetuada recorrendo a um teste rápido e específico para a deteção qualitativa de hemoglobina humana em amostras de fezes.

A pesquisa de sangue oculto (PSO) nas fezes permite detetar indícios de distúrbios gastrointestinais como o cancro do intestino ou hemorroidas graves.

O cancro intestinal é um dos tipos de cancro diagnosticado mais frequentemente e uma das causas mais comuns de mortes relacionadas com cancro. A PSO permite detetar esta patologia numa fase inicial do seu desenvolvimento.

Princípio do teste: Imunocromatografia em membrana. Ocorre uma reação de anticorpos específicos que detetam a hemoglobina. A amostra de fezes que contém hemoglobina reage com anticorpos monoclonais específicos que estão vinculados a partículas de ouro. Este complexo espalha-se pela membrana e alcança a linha de teste (T), que está pré-revestida por anticorpos anti-hemoglobina.⁽⁵²⁾

O aparecimento de uma linha rosada na zona de teste indica que o teste é positivo, pelo contrário, a ausência desta mesma linha indica que o teste é negativo.

4.6 Eletroforese de Proteínas Séricas

As proteínas do soro podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais sendo uma a fração de albumina e a outra constituída pelas globulinas, as quais se diferenciam da albumina por apresentarem maior tamanho e peso molecular.

A separação é possível porque as proteínas possuem mobilidade específica quando sujeitas a um campo elétrico.

As moléculas carregadas deslocam-se mais ou menos rapidamente dependendo da carga, tamanho, forma, etc. Na Figura 18 está representado um perfil normal das proteínas do soro.

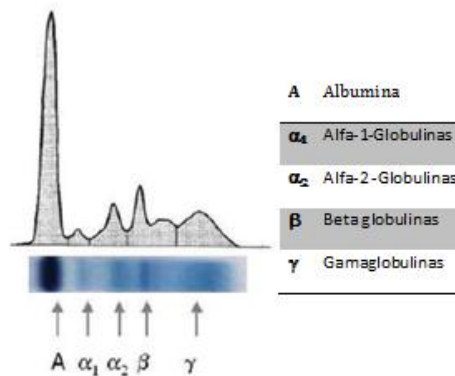


Figura 18. Perfil electroforético normal

Neste laboratório a eletroforese de proteínas é realizada no aparelho Microgel (Fig. 19) da INTERLAB.



Figura 19. Microgel

Princípio do teste: As proteínas são separadas a um pH alcalino (8.9) por eletroforese de zona em placas de gel de agarose. Permite a obtenção de cinco bandas: a albumina, e 4 globulinas (alfa1, alfa 2, beta e gama). Cada fração de globulina contém diferentes proteínas. Quando a separação eletroforética das bandas está completa a placa de gel de agarose é desnaturada, corada com amido *black*, descorada e seca. É feita uma leitura por densitometria e os resultados são apresentados graficamente.⁽⁵³⁾

A eletroforese de proteínas séricas é bastante útil na monitorização de pacientes por longos períodos de tempo, quando existem alterações específicas nos níveis de determinadas proteínas, como no mieloma múltiplo, síndrome nefrótica e cirrose por exemplo.⁽⁵⁴⁾

Neste laboratório, a eletroforese de proteínas é realizada entre uma a duas vezes por semana, em conjuntos de 13 ou 26 pacientes. Os resultados obtidos são essencialmente, perfis normais. Poderá no entanto dizer-se, que um dos perfis anormais mais encontrados

no âmbito deste estágio foi o perfil eletroforético do processo inflamatório, em que se verifica um aumento das proteínas alfa-1 e alfa-2.

4.7 Controlo de Qualidade no setor da Bioquímica

Autoanalisador Olympus AU 600:

Precinorm e Precipath: são aceites valores compreendidos entre +1sd e -1sd das cartas controlo do mês anterior (ou mudança de lote do controlo).

Entre +/- 1 sd e +/- 2 sd, aceitar apenas se aprovado pela Diretora Técnica.

Diariamente, são calibrados os ionogramas e antes do início dos trabalhos são passados os controlos. Se os valores do controlo, se encontrarem fora dos limites +1sd e -1sd, recorre-se à calibração.

Existe um calibrador universal, e calibradores para a hemoglobina glicada, para a microalbuminúria, para a 5-NU, e para os ionogramas.

Amostra aleatória: repetir as análises de uma amostra (qualquer) da primeira série, na última posição da última série.

Microgel:

As urgências são feitas normalmente em duplicado, e as repetições, servem de termo de comparação

Conclusão

A realização deste estágio permitiu-me conhecer o funcionamento diário de um Laboratório de Análises Clínicas.

Foi-me possível entender a importância e dinâmica das diferentes fases analíticas que estão envolvidas no processo analítico. Também a passagem por diferentes valências me permitiu entender a interligação que existe entre elas, e a sua importância ao relacionar diferentes variáveis num boletim clínico.

Considero por isto, que a realização deste estágio foi uma mais valia na minha formação quer académica quer pessoal.

Referências Bibliográficas

1. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiologia das infeções do trato urinário e sua Susceptibilidade aos Antimicrobianos. *Acta Med Port* 2007; 20: 543-9.
2. López FC, Alvarez F, Gordillo RM, González A, Román M. Microorganismos aislados de muestras de orina procedentes de la comunidad y padrón de sensibilidad en un periodo de 12 años. *Rev Esp Quimioter* 2005 Jun; 18 (2): 159-67.
3. Struthers JK, Westran RP. *Clinical Bacteriology*. London: Manson Publishing; 2003.
4. Bula da Gelose CLED-D. biomérieux® SA; 2006.
5. Bula da Gelose Cocosel (DCO). biomérieux® SA; 2002.
6. Bula da Gelose Chapman (MSA-D). biomérieux® SA; 2002.
7. Bula da Gelose Muller Hinton. biomérieux® SA; 2002.
8. Bula do reagente oxidase- Deteção da enzima citocromo oxidase biomérieux® SA; 2005.
9. Manual Instrumento mini API biomérieux® SA.
10. ID 32 E – Sistema de identificações das Enterobacteriaceae e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos. biomérieux® SA; 2006.
11. ID 32 Staph- Sistema de identificação de Staphylococcus. biomérieux® SA; 2006.
12. ATB™ UR EU (o8). biomérieux® SA; 2010.
13. Ferreira WFC, Sousa JCF. *Microbiologia*. Lidel; 2000.
14. Bula do Dispositivo para teste rápido de Clamídia. SureScreen Diagnostics Ltd; 2007.
15. Bula da Gelose SS agar. biomérieux® SA; 2009.
16. Bula da Gelose Sabouraud Cloranfenicol 2. biomérieux® SA; 2005.
17. Bula da Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS). biomérieux® SA; 2002.
18. Bula da Gelose Chocolate Polyvitex (PVX). biomérieux® SA; 2002.
19. Bula da Gelose MacConkey. biomérieux® SA; 2009.
20. Bula da Gelose Gardenerella (GAR). biomérieux® SA; 2002.
21. Sander R. Otitis externa: a practical guide to treatment and prevention. *Am Fam Physician* 2001 Mar; 63 (5): 927-36, 41-2.
22. Osguthorpe JD, Nielsen DR. Otitis externa: Review and clinical update. *Am Fam Physician* 2006 Nov; 74 (9): 1510-6.
23. Bula do Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) Caldo de enriquecimento seletivo para os estreptococos do grupo B. biomérieux® SA; 2008.

24. Bula da Gelose Strepto B ID (STRB)- Meio cromogénico seletivo para a deteção dos estreptococcus do grupo B (*S. agalactiae*). biomérieux® SA; 2006.
25. Bula do SLIDEX® Strepto Plus. biomérieux® SA; 2008.
26. Bula do Meio Lowenstein-Jensen (LJ-T). biomérieux® SA; 2002.
27. Bacall N. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. Rev Bras Hematol Hemoter 2009; 31 (4): 218-20.
28. Bula do kit EUROTUBO® Coloração de reticulócitos. DELTALAB,S.L.
29. C. K. PREST® para determinação do tempo de tromboplastina parcial activada. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S; 2011.
30. Bula NEOPLASTIN® CI Plus para determinação do tempo de protrombina. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S; 2009.
31. Bula do OPTION 4 PLUS biomérieux® SA.
32. Hoffbrand AV, Moss PAH. Essential Haematology. 6th ed.: Wiley-Blackwell; 2011.
33. Bula do AVITEX® CRP Teste serológico em látex para a deteção de proteína C reativa. OMEGA DIAGNOSTICS; 2005.
34. Bula do IMMUTREP® RPR Teste rápido de floculação para o sero-diagnóstico da sífilis. OMEGA DIAGNOSTICS; 2008.
35. Bula do IMMUTREP® TPHA. OMEGA DIAGNOSTICS; 2004.
36. Bula do AVITEX® RF Teste serológico em latex para a deteção de factor reumatoide. OMEGA DIAGNOSTICS; 2003.
37. Bula do MICROPATH® ANTIGENS/FEBRILE ANTIGENS. OMEGA DIAGNOSTICS; 2003.
38. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, ALP. Olympus Diagnostics; 2006.
39. Gaw A, Cowan AR, O' Reilly D St. J, Stewart MJ, Sheperd J. Bioquímica Clínica. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001.
40. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, GGT. Olympus Diagnostics; 2006.
41. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Bilirrubina Total. Olympus Diagnostics; 2006.
42. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Bilirrubina Directa. Olympus Diagnostics; 2006.
43. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Creatinina. Olympus Diagnostics; 2008.
44. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Microalbuminúria. Olympus Diagnostics; 2006.

45. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Ureia. Olympus Diagnostics; 2004.
46. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Glucose. Olympus Diagnostics; 2006.
47. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Hemoglobina glicosilada. Olympus Diagnostics; 2004.
48. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Colesterol. Olympus Diagnostics; 2006.
49. Guia de Utilização de Reagentes - Química Clínica, Triglicerídeos. Olympus Diagnostics; 2005.
50. Manual do Operador URISYS 2400 - Versão 2.0. Roche Diagnostics; 2001.
51. Teste para deteção da hormona hcG VISTECT® PREGNANCY. OMEGA DIAGNOSTICS; 2010.
52. Teste para deteção de sangue oculto nas fezes NADAL® FOB. Nal Von Minden; 2010.
53. Bula do equipamento Microgel referente à eletroforese de proteínas séricas INTERLAB.
54. Silva RPO, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Rev Med Minas Gerais 2008; 18 (2): 116-22.