



Ana Paula Martins Gomes Augusto

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Carlos Cortes e pela Professora Doutora Sara Domingues, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Paula Martins Gomes Augusto

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Médio Tejo E.P.E.
– Unidade Hospitalar de Tomar

Orientadores:

Doutor Carlos Cortes

Professora Doutora Sara Domingues

Setembro, 2015

Universidade de Coimbra

Tomei a decisão de me candidatar a este Mestrado num dos momentos mais difíceis da minha vida. De repente os objetivos a longo prazo que me faziam caminhar deixavam de fazer sentido...porque simplesmente não sabia se podia ganhar a luta pela minha vida. Este Mestrado surgiu como um objetivo alcançável, que só dependia da minha vontade de aprender. O desejo de aprofundar os conhecimentos sobre a área que me acolheu profissionalmente e todos os que apoiaram a minha decisão, tornaram esta caminhada mais fácil.

Gostaria de deixar o meu agradecimento sincero

À Professora Doutora Leonor Almeida, pelo apoio e dedicação a este Mestrado e aos alunos que o frequentam.

Ao Doutor Carlos Cortes e à Professora Doutora Sara Domingues que permitiram a realização deste estágio.

Aos meus colegas de Mestrado, pelo companheirismo e apoio que sempre me deram. Encontrei aqui novas amizades que não esquecerei.

À minha família, pelo apoio e palavras amigas.

Aos meus pais, pela força e incentivo que sempre me dão.

À minha sogra, que sempre me ajudou quando precisei.

Ao meu marido, por estar sempre do meu lado nos bons e maus momentos, pelo seu amor e apoio incondicional.

Índice

<i>Abreviaturas</i>	V
<i>Resumo / Abstract</i>	IX
I. Introdução	1
II. Caracterização do Laboratório do Estágio	2
III. Atividades Desenvolvidas	5
3.1 Receção de amostras / Circuito de amostras entre Unidades do CHMT	5
3.2 Controlo de Qualidade	7
3.2.1 Controlo de Qualidade Interno	7
3.2.2 Avaliação Externa da Qualidade.....	8
3.3 Atividades desenvolvidas no setor de Hematologia	8
3.4 Atividades desenvolvidas no setor de Microbiologia	9
3.5 Atividades desenvolvidas no setor de Imunoquímica	10
3.5.1 Metodologia e seus fundamentos.....	13
3.5.1.1 Potenciometria.....	13
3.5.1.2 Espectrofotometria de refletância.....	13
3.5.1.3 Turbidimetria e Nefelometria.....	14
3.5.1.4 Imunoensaios.....	15
3.5.2 Equipamentos utilizados.....	19
3.5.3 Determinações Analíticas.....	21
3.5.3.1 Avaliação do Equilíbrio Hidro Eletrolítico.....	21
3.5.3.2 Avaliação do Metabolismo Ósseo.....	23
3.5.3.3 Avaliação da Função Renal.....	24
3.5.3.4 Avaliação da Função Hepática.....	26
3.5.3.5 Avaliação da Função Pancreática.....	28

3.5.3.6 Avaliação de Doença Muscular e Cardíaca.....	29
3.5.3.7 Diabetes Mellitus.....	30
3.5.3.8 Avaliação do Metabolismo dos Lípidos.....	32
3.5.3.9 Avaliação do Metabolismo do Ferro.....	34
3.5.3.10 Avaliação de Marcadores de Inflamação.....	35
3.5.3.11 Monitorização de Drogas Terapêuticas.....	36
3.5.3.12 Outros parâmetros determinados.....	37
3.5.3.13 Avaliação da Função Tiroideia.....	37
3.5.3.14 Avaliação da Função Gonadal.....	39
3.5.3.15 Avaliação da Função Adrenal.....	41
3.5.3.16 Marcadores Tumorais.....	42
3.5.3.17 Autoimunidade.....	44
IV. Conclusões.....	49
V. Bibliografia.....	50

Abreviaturas

Ac	Anticorpo
ACTH	Hormona Adrenocorticotrófica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
AEQ	Programa de Avaliação Externa da Qualidade
AFP	Alfa Fetoproteína
Ag	Antigénio
Alb	Albumina
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMA-M2	Anticorpo Anti Mitocôndria, fração M2
AMY	Amilase
ANA	Anticorpos Anti Nucleares
ANCAS	Anticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos
Anti-GBM	Anticorpo Anti Membrana Basal Glomerular
ARN	Ácido Ribonucleico
ASMA	Anticorpo Anti Musculo Liso
ASO	Antiestreptolisina O
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Anticorpos Antitiroglobulina
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPO	Anticorpos Antiperoxidase
C3	Complemento, fator 3
C4	Complemento , fator 4
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CH50	Atividade Total do Complemento
CHMT	Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E.
CK	Creatinacinase
CK-MB	Creatinacinase, fração MB
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRH	Hormona libertadora de hormona adrenocorticotrófica
cTnI	Troponina I
DBIL	Bilirrubina Direta
DIT	Diiodotirosina
DMTC	Doença Mista Tecido Conectivo
DP	Desvio Padrão
dsADN	Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla
EBNA	Antigénio Nuclear do Vírus Epstein Barr
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELFA	Imunoensaio Enzimático Fluorescente (<i>Enzyme Linked Fluorescent Immunoassay</i>)
ELISA	Imunoensaio Enzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>)
ENAs	Anticorpos Extraíveis do Núcleo
Fator VW	Fator de Von Willebrand
FEIA	Imunoensaio Fluoroenzimático (<i>Fluorescent Enzyme Immunoassay</i>)
FR	Fator Reumatóide
FSH	Hormona Folículoestimulante

G-6-P	Glicose 6 Fosfato
GGT	Gama Glutamyltransferase
GnRH	Hormona libertadora de Gonadotrofinas
HbA1C	Hemoglobina Glicada
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HEp-2	Células derivadas do carcinoma laríngeo humano, tipo 2
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Protein</i>)
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LH	Hormona Luteinizante
Lp(a)	Lipoproteína A
MI	Miopatia Inflamatória
MIT	Monoiodotirosina
MPO	Anticorpo Anti Mieloperoxidase
MTP	Proteínas Totais na urina
NAD ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (forma reduzida)
NSE	Enolase Neuro Específica
PCR	Proteína C-Reativa
PNAEQ- INSA	Programa Nacional Avaliação Externa Qualidade – Instituto Nacional Saúde Dr. Ricardo Jorge
PR3	Anticorpo Anti Proteinase 3
PRG	Progesterona
PRL	Prolactina
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PTGO	Prova Tolerância à Glicose Oral
PTH	Hormona da paratiróide
RIQAS	Avaliação Qualidade Internacional da Randox (<i>Randox International Quality Assessment</i>)
Rpm	Rotações por minuto
RT – PCR	Transcriptase Reversa - Polymerase Chain Reaction
SLS	Surfatante Laurilsulfato de Sódio
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SS	Síndrome Sjögren
SSc	Esclerose Sistêmica
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBG	Globulina ligante da Tiroxina (<i>Tyroxine Binding Globulin</i>)
TBIL	Bilirrubina Total
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG	Triglicerídeos
Tg	Tiroglobulina
TIBC	Capacidade Total Ligação Ferro (<i>Total Iron Binding Capacity</i>)

TP	Tempo de Protrombina
TPm	Proteínas Totais no soro
TRH	Hormona libertadora de Tirotrófina
TSH	Hormona Estimulante da Tiróide
TT	Tempo de Trombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
UKNEQAS	Controlo Qualidade Externo do Reino Unido (<i>United Kingdom National External Assessment Service</i>)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very Low Density Protein</i>)
VS	Velocidade de Sedimentação
α IAT	Alfa I Antitripsina

Resumo

O presente relatório de estágio do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem por objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E. – Unidade Hospitalar de Tomar. O Estágio englobou as diferentes áreas laboratoriais, nomeadamente a Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. Será caracterizada a organização e funcionamento do Serviço, bem como as metodologias e equipamentos utilizados. Serão descritas com maior pormenor as atividades desenvolvidas e parâmetros analíticos executados nas áreas da Bioquímica e Imunologia. São ainda referidas as atividades desenvolvidas na área da gestão da qualidade necessárias para a verificação da conformidade e efetiva implementação de processos, particularmente na importante e crucial fase pré analítica.

Abstract

This Master internship report in Clinical Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, aims to describe the activities developed during the internship performed at the Clinical Pathology Service of the Middle Tejo Hospital Center – Tomar Hospital. The internship encompassed the different laboratory areas, such as Hematology, Microbiology, Biochemistry and Immunology. This report includes an introduction about the Laboratory characteristics and organization, as well as the methodologies and main equipment used. Focus is made on developed activities and analytical parameters executed in the areas of Biochemistry and Immunology. It is also highlighted the quality management activities, needed to verify the conformance and effective implementation of processes, particularly at the important and crucial pre analytical phase.

I. Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra disponibiliza uma formação especializada nas várias valências da área do diagnóstico laboratorial. Este Mestrado compreende no seu plano de estudos um estágio anual que permite, para além da consolidação dos conhecimentos adquiridos, a aquisição de competências que nos preparam para integrar a rotina de um Laboratório de Análises Clínicas, processando, validando e interpretando as várias metodologias e seus resultados.

O relatório apresentado refere-se ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar Médio Tejo, E.P.E. (CHMT) – Unidade Hospitalar de Tomar, que teve a duração de 600 horas. O estágio envolveu o conhecimento das condições de higiene e segurança no local de trabalho, do Sistema de Gestão da Qualidade adotado no SPC no âmbito da Acreditação pela Norma NP EN ISO 9001:2008, nomeadamente da Política da Qualidade e Manual da Qualidade, bem como, das normas aprovadas para a receção de amostras para análise nos vários setores analíticos. Esta aprendizagem fundamental foi sendo aprofundada e posta em prática ao longo de todo o estágio com o conhecimento de documentos necessários à atividade do SPC, tais como procedimentos, protocolos, instruções de trabalho, legislação aplicável e outros.

Durante o estágio foram abrangidas todas as áreas analíticas do laboratório, nomeadamente Microbiologia, Hematologia, Bioquímica Clínica e Imunologia.

Neste relatório estão descritas as atividades executadas nas áreas da receção de produtos, no grupo de gestão da qualidade e são descritas genericamente as atividades desenvolvidas nos vários setores, centrando-se a descrição detalhada nas áreas da Bioquímica e Imunologia, incluindo ainda nesta última a área da Autoimunidade.

II. Caracterização do Laboratório do Estágio

O estágio foi realizado no SPC do CHMT, Unidade Hospitalar de Tomar, situado na Av. Maria de Lourdes de Mello Castro, 2304-909 Tomar. A Direção do Serviço está a cargo do Dr. Carlos Cortes, Médico Assistente Hospitalar de Patologia Clínica

O CHMT integra três Unidades Hospitalares localizadas em Abrantes, Tomar e Torres Novas e a sua área de influência engloba 15 Concelhos do Distrito de Santarém.

O SPC encontra-se centralizado na Unidade de Tomar. Este processo teve início com a centralização da realização de alguns parâmetros analíticos em cada Unidade, seguidamente e com uma nova Direção de Serviço, ocorreu a centralização dos vários setores analíticos distribuídos pelas Unidades que compõem o CHMT, nomeadamente da Microbiologia na Unidade de Torres Novas, da Hematologia na Unidade de Abrantes e da Bioquímica e Imunologia na Unidade de Tomar. Após estudo da dinâmica do Centro Hospitalar e adaptação dos vários Serviços de Apoio e Logística, o SPC aceitou o desafio de centralizar todos os setores analíticos na Unidade de Tomar, permanecendo dois Laboratórios de Urgência e apoio à rotina dos internamentos nas Unidades de Abrantes e Torres Novas. Em cada uma das Unidades, para além da realização de análises urgentes (para o Serviço de Urgência e Internamento) é disponibilizado, todos os dias úteis, aos utentes internos das consultas externas do Hospital e a qualquer utente externo, um horário de colheitas de amostras cuja receção e envio ao Laboratório Central é da responsabilidade do Laboratório de cada Unidade.

O SPC assegura as análises do CHMT, as análises menos frequentes ou mais diferenciadas são enviadas para Laboratórios Externos. É assegurada a integrabilidade das amostras, que são acondicionadas em sistemas de transporte à prova de fuga, devidamente identificadas com nome, número de processo do utente e tipo de amostra.

No sentido de uma melhor prestação de cuidados de saúde à população da área abrangida pelo CHMT, o SPC identificou a necessidade de uma Consulta de Hipocoagulação Oral. Em cada uma das Unidades Hospitalares, o SPC é responsável pelo atendimento dos utentes desta consulta semanal.

Para prestar um serviço de qualidade que garanta as necessidades de todos os clientes, o Serviço possui uma equipa de profissionais competentes constituída por 4 Médicos Patologistas Clínicos, 7 Técnicos Superiores de Saúde, 2 Técnicos Superiores, 29 Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública, 6 Assistentes Técnicos e 10 Assistentes Operacionais.

O Laboratório Central do SPC encontra-se organizado em diferentes áreas de trabalho, tais como sala de espera, sala de colheitas, área administrativa, sala de lavagens, receção de produtos, Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. As análises efetuadas em cada setor analítico são validadas no próprio setor. Visto que a Responsável pelas áreas de Bioquímica e Imunologia é a mesma pessoa, no SPC estes dois setores deram origem ao setor Imunoquímica. Existe ainda um gabinete de consulta, uma sala de microscopia de fluorescência, gabinetes de trabalho, armazéns e sala de arquivo.

O SPC está informatizado com um sistema de gestão laboratorial – ModLab da Izasa, que permite gerir todos os pedidos de análises que chegam ao laboratório, informação e histórico analítico do utente, identificação das amostras através de leitura ótica de códigos de barra, elaboração de listas de trabalho com as diversas técnicas a efetuar, gerir todos os resultados gerados pelos equipamentos dos diferentes setores e ainda emitir o boletim final das análises pedidas para cada utente. Este sistema é acedido por cada utilizador através da sua palavra-chave e possui níveis de acesso diferentes e estabelecidos para cada grupo profissional. Este sistema de gestão laboratorial permite garantir a rastreabilidade das amostras, desde o pedido de análises efetuado pelo médico até à validação final de todos os parâmetros analíticos e saída do relatório individual do utente.

O Serviço encontra-se certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008 e a Política da Qualidade estabelece como princípios fundamentais a satisfação dos utentes e colaboradores, a qualidade e segurança dos cuidados prestados, a melhoria contínua do Sistema de Gestão da Qualidade e a formação contínua dos colaboradores.

Em 2014, o SPC apresentou uma média diária de cerca de 300 utentes.

Na Tabela I encontram-se listados os equipamentos utilizados nas diferentes áreas laboratoriais.

Tabela I – Equipamentos utilizados no Laboratório Central do SPC, nos vários setores.

Setor	Equipamento	Fornecedor
Hematologia	Sysmex XE-2100	Emílio Azevedo Campos
	Sysmex XT-1800i	Emílio Azevedo Campos
	ACL Top 500	Werfen
	ACL Advance	Werfen
	Test ITHL	Emílio Azevedo Campos
	HA-8160	Menarini
Microbiologia	Microscan Walkaway 96	Beckman Coulter
	Vitek 2	Biomérieux
	Bactec 9120	Quilaban
	Bactec 9000	Quilaban
	GeneXpert	Werfen
Bioquímica	UniCel DxC 800	Beckman Coulter
	Access 2	Beckman Coulter
	GEM Premier 3000	Werfen
	Aution Max	Menarini
Imunologia	UniCel Dxl-800	Beckman Coulter
	Image 800	Beckman Coulter
	VIDAS	Biomérieux
	Mago Plus	Isoder
	Unicap 250	ThermoFisher
	Hydrasys Sebia	ThermoFisher

III. Atividades Desenvolvidas

Durante o Estágio tive oportunidade de aprofundar e aplicar os conhecimentos adquiridos durante o Mestrado, nas áreas essenciais de um Laboratório de Análises Clínicas. Adquiri conhecimentos sobre os procedimentos operativos dos vários equipamentos e executei as diversas calibrações, controlos e manutenção essenciais ao seu correto funcionamento. Com o decorrer do Estágio e com o desempenho de funções nas áreas analíticas fui adquirindo a autonomia necessária para a realização dessas tarefas. Participei, também, nas ações do Grupo da Qualidade, que teve a responsabilidade de implementar a Norma NP EN ISO 9001:2008 e coordenar a Gestão da Qualidade no SPC. Fui responsável pela elaboração de dossiers de equipamentos, atualização de fichas de segurança de produtos químicos e reagentes, verificação da aplicação de procedimentos, protocolos e instruções de trabalho, e pesquisa de informação sobre sistemas de registo de temperaturas dos vários equipamentos monitorizados. Participei ainda na execução de instruções de trabalho e impressos considerados necessários para controlar e evidenciar as ações tomadas para garantir a qualidade do trabalho desempenhado no SPC.

3.1 Receção de amostras / circuito de amostras entre Unidades do CHMT:

O SPC, como Serviço certificado, possui um sistema de gestão da qualidade que abrange todas as fases do processo, desde o utente e sua preparação, até à saída do relatório de resultados. A Fase Pré-analítica é de particular importância, uma vez que, influencia todo o processo de obtenção de um resultado analítico e consequentemente a decisão clínica a ele associada. Nesta fase estão incluídos os procedimentos de análise da requisição e registo informático do pedido, informação ao doente da preparação necessária (jejum, dieta específica, hora apropriada para a colheita, influência de medicamentos, entre outros), colheita e condições de transporte e conservação de amostras.

A participação nas tarefas executadas na área de receção de produtos foi fundamental para compreender o complexo circuito de amostras existente entre as três Unidades Hospitalares do CHMT. Estas tarefas incluíram a verificação da integridade das amostras (se não foi comprometida durante o transporte), se a temperatura de transporte foi adequada,

receção no sistema informático e separação pelos setores analíticos. Apliquei também os critérios de rejeição de amostras.

Para obter resultados válidos, são necessárias amostras corretamente identificadas e de qualidade.(1) Todas as amostras cuja integridade não está garantida ou mal identificadas são rejeitadas segundo os critérios de rejeição de amostras definidos em protocolo aprovado no SPC e é solicitada a repetição da colheita (anexo I). As amostras de rotina colhidas e/ou rececionadas no Laboratório das Unidades de Abrantes e Torres Novas, são registadas no sistema informático e identificadas com etiqueta que permite a leitura de código de barras. As amostras de soro devem ser separadas das células uma vez que as células sanguíneas continuam a realizar as suas funções metabólicas, alterando a composição da amostra.(2) Os tubos de colheita com gel de separação são centrifugados. Todos os contentores são depois devidamente acondicionados em malas térmicas numeradas, com a identificação do SPC e etiqueta indicadora de material biológico, de acordo com os vários protocolos aprovados para colheita e conservação de amostras. O transporte para o Laboratório Central é efetuado pelo Serviço de Transportes do CHMT, sendo a rastreabilidade das amostras assegurada com o preenchimento de impresso aprovado para o efeito. Nele estão identificadas todas as amostras enviadas em cada mala, a Unidade de origem e de destino, a temperatura de transporte, a identificação do colaborador que preparou o envio, data e hora do mesmo e identificação do motorista responsável pelo transporte. Este impresso acompanha a mala térmica em trânsito e na Unidade de destino. O colaborador responsável pela abertura da mala preenche a data e hora de chegada e a sua identificação. As amostras são então rececionadas no sistema informático, para que fique registada a localização, data e hora de chegada de cada contentor e a identificação do colaborador. São separadas pelos diferentes setores analíticos que efetuam as alíquotas necessárias para os testes que não são realizados no dia. Estas alíquotas possuem a mesma identificação que o tubo primário. Todos estes procedimentos são realizados respeitando as regras de segurança, com a utilização do equipamento de proteção individual (ex. luvas) considerado necessário e de forma segura, minimizando salpicos e formação de aerossóis.

3.2 Controlo de Qualidade

Para atingir a Qualidade no Laboratório é necessário controlar todas as etapas do processo, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica. São necessárias várias ferramentas, tais como manuais de procedimentos, o Controlo de Qualidade Interno (CQI), o Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), formação contínua do pessoal e cooperação interlaboratorial.

3.2.1 Controlo Qualidade Interno

Na fase analítica, o CQI é um processo estatístico utilizado para monitorizar e avaliar o processo analítico que produz os resultados dos pacientes. Os resultados do CQI são usados para validar a operacionalidade do equipamento dentro das especificações pré-definidas, evidenciando que os resultados das amostras dos pacientes são fiáveis.(3) Através do CQI controlamos a precisão e reprodutibilidade dos métodos, vigiando a incidência de erros aleatórios.

O erro sistemático é evidenciado pela alteração na média dos valores do controlo. A alteração na média pode ser gradual e demonstrada como uma tendência nos valores do controlo ou pode ser abrupta e demonstrada como um desvio nos valores do controlo.(4)

Nos setores de Hematologia, e Imunoquímica o CQI é efetuado diariamente como amostra de rotina, segundo o plano instituído nas instruções de trabalho aprovadas para cada área analítica. Para a maioria dos parâmetros analíticos destes setores, são realizados dois níveis de controlo diários. Nos casos de análises efetuadas semanalmente, os três níveis de controlo disponíveis são efetuados. Os critérios de aceitação dos controlos são baseados no intervalo de valores aceitável presente nas respetivas bulas e na interpretação das cartas de controlo (cartas de Levey-Jennings) de acordo com as Regras de Westgard (4). Periodicamente, por análise das cartas de controlo e sempre que é necessário, os responsáveis dos setores revêm o intervalo de referência aceitável para cada parâmetro. Os limites aceitáveis são $\pm 2DP$ (Desvio Padrão) da média. O CQI é efetuado também sempre que um novo lote de reagente é utilizado, depois de nova calibração, após manutenção do equipamento ou qualquer alteração nas suas condições de funcionamento.

No setor de Microbiologia, o CQI é assegurado com a cultura, identificação e antibiograma de várias estirpes padrão ATCC®, com uma periodicidade mensal (uma estirpe padrão

ATCC semanalmente). Quinzenalmente, é efetuado o CQI dos vários tipos de coloração utilizadas neste setor.

3.2.2 Avaliação Externa da Qualidade

O Programa de AEQ baseia-se na avaliação retrospectiva do desempenho dos Laboratórios. Permite melhorar a comparabilidade dos resultados, rastreabilidade das medições e desempenho dos métodos. Permite, nalguns casos, comparar os resultados com outros laboratórios, com vários métodos analíticos e com vários modelos de equipamentos.

Todos os setores analíticos do SPC participam em programas de AEQ, tais como UKNEQAS (*United Kingdom National External Assessment Service*), PNAEQ-INSA (Programa Nacional Avaliação Externa Qualidade-Instituto Nacional Saúde), EUROIMMUN e RIQAS (*Randox International Quality Assessment*). A periodicidade dos ensaios de controlo externo da qualidade (CQE) variam entre mensais, para os parâmetros de Bioquímica e Hematologia e trimestrais ou semestrais, para os parâmetros mais específicos das áreas de Imunologia e Microbiologia. Se o resultado da participação no ensaio não for aceitável, é procurada a causa possível e aplicada, se for caso disso, as ações corretivas e preventivas.

3.3 Atividades desenvolvidas no setor de Hematologia

As atividades desenvolvidas neste setor encontram-se resumidas na tabela II. A amostra utilizada para a determinação da maioria dos parâmetros, neste setor, é sangue total em com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético tripotássio(EDTA). Para as provas de coagulação, a amostra utilizada é plasma com citrato de sódio. No estágio realizado neste setor fiquei responsável pelo processamento de hemogramas, determinação da Velocidade de Sedimentação (VS), das provas de coagulação e doseamento de frações de Hemoglobina.

Tabela II: Determinações analíticas executadas no setor de Hematologia e metodologia aplicada.

Equipamento	Metodologia	Determinações analíticas
Systemex XE-2100 Systemex XT-1800i	Citometria de Fluxo, impedância, SLS-hemoglobina	Hemograma, Plaquetas, Reticulócitos (XE2100)
ACL Top 500 ACL Advance	Absorvância, Imunoturbidimetria	TP, TTPA, D-Dímeros, fibrinogênio, TT, Antitrombina III, Fator VW, Fator VIII, Proteína S, Anticoagulante lúpico
Test ITHL	Fotometria cinética capilar	VS
Adams HA-8160	Cromatografia de Alta Pressão (HPLC)	Doseamento das frações de Hemoglobina (F, A1c, A2)

TP, Tempo de Protrombina; TTPA, Tempo de Tromboplastina Ativado; TT, Tempo de Trombina; Fator VW, Fator de Von Willebrand; VS, Velocidade de Sedimentação

3.4 Atividades desenvolvidas no setor de Microbiologia

As atividades desenvolvidas no setor de Microbiologia estão resumidas na tabela III. Neste setor efetuei análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas de diversos produtos biológicos, nomeadamente urinas, secreções respiratórias, exsudados vaginais, uretrais, de lesões purulentas, nasais, auriculares e oculares, sangue, fezes e outros líquidos biológicos (cefaloraquidiano, peritoneal, pleural, sinovial). Executei a receção das amostras, seu processamento, isolamento em meios de cultura, identificação dos agentes patogénicos e antibiogramas. Efetuei ainda o processamento de amostras para pesquisa de micobactérias (bacilos álcool-ácido resistentes). Este procedimento envolve a descontaminação e concentração das amostras e sua inoculação em meio líquido 7H9. Os métodos de coloração utilizados no setor são a coloração de Gram, de Kinyoun (Ziehl Neelsen modificado) e coloração fluorescente com auramina.

Tabela III: Determinações analíticas e equipamentos utilizados no setor de Microbiologia.

Equipamento	Metodologia	Determinações analíticas
VITEK 2	Colorimetria, Turbidimetria	Identificação de bactérias e leveduras, antibiogramas
MicroScan WalkAway 96	Colorimetria, Turbidimetria	Identificação de bactérias e leveduras, antibiogramas
Bactec 9120	Fluorescência	Deteção de crescimento de microrganismos
Bactec 9000	Fluorescência	Deteção de crescimento de micobactérias
GeneXpert	RT - PCR PCR em tempo real	Deteção de ARN dos vírus da gripe A, gripe B e gripe H1N1 2009; Deteção de ADN do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; Deteção de resistência à rifampicina (associada a mutações do gene <i>rpoB</i>);

ARN, Acido Ribonucleico; RT-PCR, Transcriptase Reversa – Polimerase Chain Reaction; ADN, Acido Desoxirribonucleico

3.5 Atividades desenvolvidas no setor de Imunoquímica

Durante o estágio realizado nestas áreas analíticas, comecei por receber formação nos vários equipamentos utilizados. Adquiri autonomia de forma a ficar responsável pela sua preparação, isto é, verificação de reagentes e consumíveis, calibração, controlos e manutenção. Executei também as amostras diárias nestes equipamentos. Os conhecimentos adquiridos durante o Mestrado permitiram-me melhor compreender e interpretar os resultados dos parâmetros determinados. Durante o Estágio, as atividades desenvolvidas centraram-se maioritariamente na Imunologia, particularmente no tema da Autoimunidade. Efetuei ainda determinações de rotina na área de Bioquímica em amostras de soro, urina e outros líquidos biológicos.

No Laboratório Central do SPC, a área da Bioquímica Clínica efetua as análises urgentes e os pedidos de rotina no mesmo equipamento, em simultâneo. As amostras urgentes têm sempre prioridade relativamente às de rotina. Nas tabelas IV e V estão discriminadas as análises da área da Bioquímica e Imunologia realizadas, por método e equipamento.

Descritas com maior pormenor, estão as técnicas e os equipamentos aos quais mais tempo foi dedicado durante o Estágio, assim como os parâmetros analíticos cuja determinação está normalmente a meu cargo, diariamente.

Tabela IV: Equipamentos utilizados na determinação de análises de Bioquímica no Laboratório Central do SPC.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos
Unicel DxC 800	Potenciometria indireta, Turbidimetria, colorimetria	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Cálcio, Fósforo, Mg ²⁺ , Ureia, Creatinina, Glucose, Alb, TPm, MTP, ALP, ALT, AST, DBIL, TBIL, GGT, AMY, PCR, CH50, Colesterol Total, HDL, TG, LDH, Fe, Ácido Úrico, CK, CK-MB, Colinesterase, Lipase, Digoxina, Carbamazepina, Fenitoína, Teofilina, Etanol, Valproato, Lítio, ASO
Access 2	Quimioluminescência	Troponina I, Cortisol urinário, Tiroglobulina
Aution Max AX-4280	Refletância, índice de refração, dispersão de luz	Urina Tipo II (densidade, cor, turvação, glicose, pigmentos biliares, proteínas, pH, hemoglobina, cetonas, urobilinogénio, nitritos e esterase leucocitária)

Alb, Albumina; TPm, Proteínas Totais no soro; MTP, Proteínas Totais na urina; ALP, Fosfatase Alcalina; ALT, Alanina Aminotransferase; AST, Aspartato Aminotransferase; DBIL, Bilirrubina Direta; TBIL, Bilirrubina Total; GGT, Gama Glutamil Transferase; AMY, Amilase; PCR, Proteína C Reativa; CH50, Atividade Total do Complemento; HDL, Lipoproteína de alta densidade; TG, Triglicerídeos; LDH, Lactato Desidrogenase; CK, Creatinacina; CK-MB, Creatinacina fração MB; ASO, Antiestreptolisina O

Tabela V: Equipamentos utilizados na determinação de parâmetros analíticos de Imunologia.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos
Unicel Dxl 800	Quimioluminescência	T ₃ Total, T ₄ Total, T ₃ Livre, T ₄ Livre, TSH, ATPO, ATG, Antígenos CA 19-9, CA 15-3, CA 125, AFP, CEA, PSA, Ferritina, Vitamina B ₁₂ , Ácido Fólico, PTH, LH, PRL, PRG, Testosterona
Immulite 2000	Quimioluminescência	PSA Livre, FSH, Estradiol, ACTH, Insulina, Cortisol sérico
Image 800	Turbidimetria Nefelometria	Doseamento de IgG, IgA, IgM, IgE, Cadeias leves K e λ, C3, C4, α1AT, FR, Transferrina, Microalbuminúria β2microglobulina, Lipoproteína A
VIDAS	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i> (ELFA) (Sanduíche e Captura de IgM)	Anticorpos Anti <i>Toxoplasma gondii</i> IgG e IgM, Anticorpos Anti vírus da rubéola IgG e IgM, Anticorpos Anti Citomegalovírus IgG e IgM, Anticorpos Anti vírus Epstein Barr IgG, IgM e EBNA
Unicap 250	Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Pesquisa e doseamento de IgE específicas para vários alérgenos alimentares e inalantes, Doseamento de ANCA's e ENA's, Ac. Anti-GBM, Ac. Anti-Cardiolipina (IgG, IgM), Ac. Anti-β 2 glicoproteína (IgG, IgM), Ac. Anti-Gliadina (IgA, IgG), Transglutaminase IgA
Hydrasys	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de proteínas séricas
Mago Plus	Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunoensaio Enzimático (ELISA)	Pesquisa e doseamento de ANA e Ac. Anti-dsDNA, Doseamento de Ac. Anti-Mitocôndria (AMA-M2), Ac. Anti-Músculo liso (ASMA), Ac. Anti-Fosfolípidos (IgG, IgM), Ac. Anti <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (IgG, IgM), Ac. Anti <i>Chlamydia pneumoniae</i> (IgG, IgM), Aldosterona (soro e urina), NSE

TSH, Hormona estimulante da tireóide; ATPO, Anticorpo Antiperoxidase; ATG, Anticorpo Antitiroglobulina; AFP, Alfa Fetoproteína; CEA, Antígeno Carcinoembrionário; PSA, Antígeno Específico da Próstata; PTH, Hormona da Paratireoide; LH, Hormona Luteinizante; PRL, Prolactina; PRG, Progesterona; ACTH, Hormona adrenocorticotrófica; IgG, Imunoglobulina G; IgA, Imunoglobulina A; IgM, Imunoglobulina M; IgE, Imunoglobulina E; C3, Complemento fator 3; C4, Complemento fator 4; α1AT, Alfa 1 Antitripsina; FR, Fator Reumatóide; EBNA, Antígeno Nuclear do Vírus Epstein Barr; ANCA, Anticorpos Anti Citoplasma Neutrófilos; ENA, Anticorpos Nucleares Extraíveis; GBM, Membrana Basal Glomerular; ANA, Anticorpos Anti Nucleares; dsDNA, Ácido Desoxirribonucleico cadeia dupla; NSE, Enolase Neuro Específica

3.5.1. Metodologia e seus fundamentos

Neste capítulo irei abordar as principais metodologias utilizadas nas determinações de Bioquímica e Imunologia.

3.5.1.1 Potenciometria

Os métodos potenciométricos são baseados na medição da diferença de potencial (voltagem) entre dois elétrodos, imersos numa solução sob a condição de corrente elétrica essencialmente nula. Os elétrodos e a solução constituem uma célula eletroquímica. Cada eletrodo na célula eletroquímica é caracterizado pela sua semi-reação e o potencial correspondente. O eletrodo indicador é escolhido de forma a que o seu potencial de semi-reação responda a alterações na atividade de uma espécie particular em solução. O outro eletrodo é um eletrodo de referência cujo potencial de semi-reação não se altera.(5) Em conclusão, na potenciometria o que se mede é a diferença de potencial entre o eletrodo indicador (ou sensor) e o eletrodo de referência.

O eletrodo indicador mais utilizado em Química Clínica são os elétrodos ião-seletivos. Estes baseiam-se na medição do potencial que se desenvolve numa membrana seletiva. A seletividade de um potencial de resposta a um analito depende da especificidade da interação da membrana para com o analito. A relação logarítmica entre o potencial gerado na interface membrana-solução e a atividade de um analito é a base da utilização dos elétrodos ião-seletivos como instrumentos analíticos. A concentração iónica é determinada por aplicação da Equação de Nernst.

3.5.1.2 Espectrofotometria de refletância

Na espectrofotometria de refletância, um feixe de luz é direcionado para uma superfície e a luz refletida é quantificada. Alguma da luz que incide na amostra é absorvida por cromóforos existentes na sua superfície, a restante é refletida. Esta, depois de passar por várias fendas e lentes, chega a um fotodetector que converte o sinal na leitura apropriada.(6)

3.5.1.3 Turbidimetria e Nefelometria

A turbidimetria mede a redução na transmissão da luz devido à formação de partículas, e quantifica a luz residual transmitida. A nefelometria, por seu lado, deteta a porção de luz que é dispersa numa variedade de ângulos.(6)

Os doseamentos turbidimétricos são efetuados com um espectrofotómetro, para determinar a concentração de partículas numa amostra. A quantidade de luz bloqueada pelas partículas em suspensão depende da concentração mas também do tamanho destas. A deteção da luz transmitida faz-se num ângulo de 0° relativamente à luz incidente.

Na nefelometria, a dispersão da luz depende do comprimento de onda e do tamanho das partículas. A deteção de luz dispersa num ângulo entre 15° e 90° leva ao aumento da sensibilidade das determinações nefelométricas.(6) Os ângulos de deteção de 30° e 90° são os mais frequentemente encontrados nos nefelómetros comerciais (figura 1).

A intensidade da luz dispersa é proporcional à concentração do analito na amostra.

Os imunocomplexos formados entre antígeno e anticorpo de elevada afinidade, formam uma micela proteica com tamanho suficiente para dispersar a luz. A imunonefelometria é um método mais sensível que a turbidimetria, com limite de deteção mais baixo para proteínas séricas.(7)

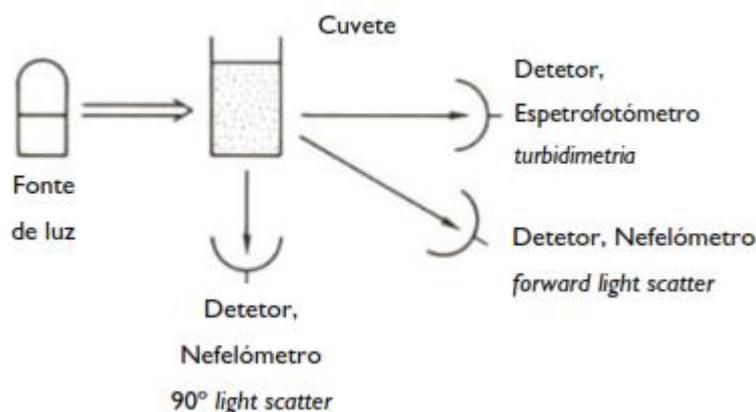


Figura 1: Nefelómetro versus espectrofotómetro – combinações óticas.(8)

3.5.1.4 Imunoensaios

Os imunoensaios são técnicas para a detecção e quantificação de antígenos (Ag) ou anticorpos (Ac), que têm por base a interação Ag - Ac. Podem ser empregues com uma variedade de sistemas de detecção, que vão de leituras visuais a fotométricas, com substratos cromogéneos, quimioluminescentes ou fluorescentes.(9)

Ensaio de aglutinação de partículas

A aglutinação é a agregação e sedimentação do Ag depois de reagir com o Ac. Ac aglutinantes podem ser direccionados contra Ag naturais na superfície das células (aglutinação direta) ou contra Ag aplicados na superfície das células ou partículas inertes (aglutinação indireta).(10)

Imunoensaios marcados

Em todos os imunoensaios marcados, um reagente (Ag ou Ac) é geralmente marcado pela adição de uma partícula ou molécula, que vai detetar melhor baixas concentrações de imunocomplexos. Logo, o marcador vai melhorar a sensibilidade analítica.(11) Os marcadores mais utilizados incluem enzimas, moléculas fluorescentes ou quimioluminescentes e compostos radioativos.

Os imunoensaios podem aplicar diferentes métodos: competitivos e não competitivos.

- Ensaio competitivo:

Neste tipo de ensaio (Figura 2), todos os reagentes são adicionados simultaneamente ou sequencialmente. Na abordagem simultânea, o Ag marcado e o Ag da amostra (não marcado) competem para se ligar ao Ac (reagente). Neste método, a afeição do Ac por ambos os Ag tem de ser igual. Nestas condições a probabilidade do Ac se ligar ao Ag marcado é inversamente proporcional à concentração do Ag não marcado.(7,11)

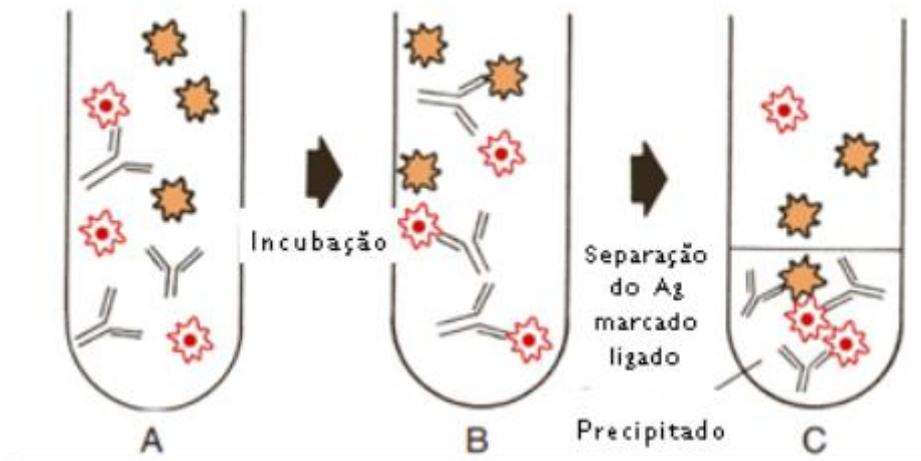


Figura 2: Imunoensaio competitivo. Durante a incubação simultânea, os Ag marcado e não marcado competem pela ligação ao Ac.(11)

- Ensaio não-competitivo:

Também conhecido como ensaio imunométrico, este tipo de ensaio utiliza um Ac marcado para detetar o Ag. É necessário um excesso de Ac marcado, para garantir que este não limita a reação. A concentração do Ag é proporcional à do Ac marcado.(11)

No método Sanduíche para detetar Ag, o Ac não marcado imobilizado numa fase sólida captura o Ag (Figura 3). Depois da lavagem para retirar o Ag não ligado, é adicionado o Ac marcado. Depois de nova lavagem para retirar o Ac marcado em excesso, o sinal do Ac marcado ligado é proporcional ao Ag capturado.

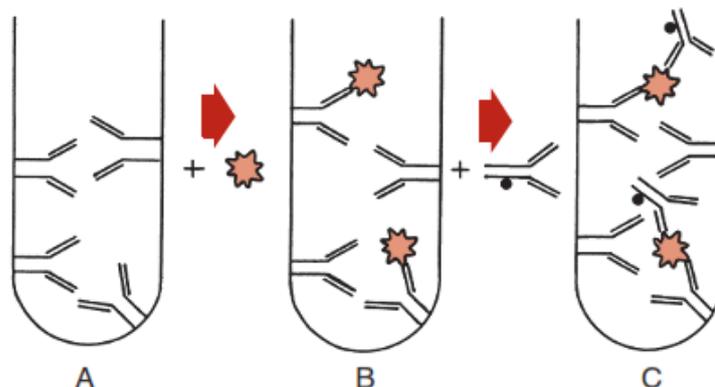


Figura 3: Imunoensaio não-competitivo Sanduíche, para deteção de Ag.(11)

No ensaio Sanduíche para detetar Ac, o Ag imobilizado na fase sólida captura o Ac presente na amostra. Depois da lavagem, o Ac marcado é adicionado, ligando-se ao Ac capturado. A quantidade de Ac marcado ligado é diretamente proporcional à quantidade de Ac específico presente (Figura 4).(11)

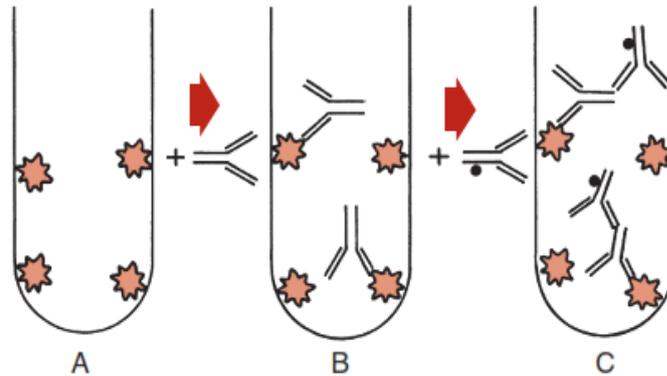


Figura 4: Imunoensaio não-competitivo Sanduíche para deteção de Ac.(11)

Este tipo de ensaio pode ser modificado para determinar a classe de imunoglobulina de um Ac específico presente na amostra. Por exemplo, a fase sólida é sensibilizada com Ac IgM específicos, vai detetar e quantificar apenas IgM humana capturada pelo Ag imobilizado.(11)

Imunoensaio Enzimático (ELISA)

Neste ensaio, um dos componentes da reação está imobilizado na superfície de uma fase sólida, como os poços de uma microplaca. Tipicamente num ensaio de ELISA, uma amostra contendo o Ag a medir é adicionada, permitindo-se que se ligue a um Ac da fase sólida. Depois da lavagem da fase sólida, um Ac marcado enzimaticamente diferente é adicionado. O Ac em excesso é lavado e adicionado o substrato da enzima. O marcador enzimático catalisa a conversão do substrato a produto, cuja quantidade é proporcional ao Ag presente na amostra.(7)

Estão disponíveis quatro tipos de ensaios de ELISA: competitivo com Ag marcado, competitivo com Ac marcado, não-competitivo para deteção de Ag e não-competitivo para deteção de Ac.

Imunofluorescência Indireta (IFI)

A imunofluorescência é amplamente utilizada para detetar autoanticorpos e Ac para Ag celulares e teciduais. Esta técnica é uma mais valia na determinação quantitativa das concentrações de Ac. Com a utilização de cortes de tecidos, Ac contra vários Ag diferentes podem ser identificados numa única lâmina (Figura 5), conforme a sua distribuição entre as células ou em diferentes compartimentos subcelulares.(12)



Figura 5: Esquema ilustrativo de algumas etapas da pesquisa de Anticorpos Anti Nucleares (ANA) em células HEp-2, por imunofluorescência indireta.

3.5.2 Equipamentos utilizados

Autoanalisador UniCel DxC 800



O DxC 800 (Figura 6) divide-se em sistema de químicas modular e sistema de químicas em cartucho. O sistema modular efetua determinações utilizando Eléttodos lão-Seletivos e deteta alterações de carga. O sistema de químicas em cartuchos é responsável pelas determinações por fotometria, com leitura por ponto final ou cinética de formaçãõ.

Figura 6: UniCel DxC 800 da Beckman Coulter.

Autoanalisador Access 2



O Access 2 (Figura 7) realiza imunoensaios imunoenzimáticos competitivos e não competitivos. Utiliza como fase sólida partículas paramagnéticas revestidas com Ac. A amostra incuba com um conjugado Ac-fosfatase alcalina e a camada ligada ao Ac da fase sólida é quantificada usando o dioxetano como substrato quimioluminescente.

Figura 7: Access 2 da Beckman Coulter.

Autoanalisador UniCel Dxl 800



O UniCel Dxl 800 (Figura 8) é um sistema de imunoensaios com protocolo de funcionamento semelhante ao sistema Access 2, explicado acima. Este equipamento veio substituir os dois autoanalisadores Immulite 2000 que existiam no laboratório.

Figura 8: UniCel Dxl 800 da Beckman Coulter.



Figura 9: VIDAS da Biomérieux.

Autoanalizador VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)

O VIDAS (Figura 9) utiliza uma metodologia que combina um imunoenensaio enzimático (ELISA) com detecção por fluorescência. A fase sólida aplicada são cones revestidos com Ac ou Ag. A fosfatase alcalina catalisa a reação originando um produto fluorescente.

Autoanalizador Image 800



Figura 10: Image 800 da Beckman Coulter.

O Image 800 (Figura 10) é um sistema de imuniquímica totalmente automatizado. Utiliza as metodologias de turbidimetria e nefelometria (detetor a 90° da fonte de luz incidente), para efetuar o doseamento de proteínas séricas e urinárias.

Autoanalizador Mago Plus



Figura 11: Mago Plus da Diamedix (Isoder).

O Mago Plus (Figura 11) é um equipamento automático com capacidade de executar as técnicas ELISA e IFI em simultâneo. As tiras de microtitulação possuem poços revestidos com Ag. Os Ac específicos na amostra ligam-se ao Ag; uma segunda incubação com um conjugado enzimático, catalisa uma reação de cor que é lida por fotometria.

Autoanalisador Aution Max



Figura 12: Aution Max AX 4280 da Menarini.

O Aution Max AX 4280 (Figura 12) é um analisador automatizado que executa as análises sumárias de urina, por índice de refração (densidade), dispersão de luz (turvação) e refletância (cor, pH, glucose, creatinina, corpos cetônicos, pigmentos biliares, urobilinogênio, nitritos, proteínas, hemoglobina e esterase leucocitária).

3.5.3 Determinações Analíticas

3.5.3.1 Avaliação do Equilíbrio Hidro Eletrolítico:

A manutenção da pressão osmótica e distribuição da água pelos vários compartimentos do corpo é principalmente função de quatro eletrólitos: sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-). Estes eletrólitos ocorrem principalmente na forma de íões livres.(13)

A determinação das concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- constituem o ionograma sérico e são das determinações mais frequentemente pedidas.

O **Sódio** é o catião mais importante do líquido extracelular. Tem por isso uma importância central na distribuição normal da água e pressão osmótica, no compartimento extracelular. O Na^+ é filtrado pelo glomérulo e cerca de 70% a 80% é reabsorvido de forma ativa nos túbulos proximais renais com o Cl^- . Este movimento de Na^+ é acompanhado passivamente pela água.(13)

A hiponatremia ocorre quando, no compartimento extracelular, existe mais água do que Na^+ ou quando existe um déficit maior de Na^+ do que água. As condições clínicas associadas a hiponatremia são a terapia diurética, perdas gastrointestinais (vômitos, diarreia) e acidose metabólica. A hipernatremia ocorre quando existe um déficit maior de água do que de Na^+ . Algumas das situações associadas a esta condição são a desidratação severa, a ingestão de grandes quantidades de Na^+ sem a ingestão de água adequada e no Síndrome de Cushing.(14)

O **Potássio** é o principal catião do fluido intracelular. A sua concentração nos eritrócitos é vinte e três vezes superior à concentração do plasma, pelo que não devem ser utilizadas amostras hemolisadas para o seu doseamento.

As necessidades diárias de K^+ são satisfeitas com a ingestão de 50 a 150 mmol/dia. O K^+ absorvido pelo trato gastrointestinal é rapidamente distribuído pelo organismo, sendo o excesso excretado pelos rins. O K^+ filtrado pelo glomérulo é reabsorvido nos túbulos proximais e depois secretado nos túbulos distais em troca de Na^+ sob a influência da aldosterona.(13) A hipercaliémia acontece quando o mecanismo de controlo homeostático de K^+ falha. No entanto, a ingestão excessiva deste catião leva a uma situação de retenção apenas se a função renal estiver comprometida.(14) A terapêutica prolongada com diuréticos e a alcalose são algumas das causas de hipocaliémia.

O ião **cloreto** é o principal anião extracelular. O Cl^- da alimentação é absorvido, praticamente na sua totalidade, no trato gastrointestinal. É filtrado do plasma no glomérulo e reabsorvido passivamente com o Na^+ nos túbulos proximais. O Cl^- em excesso é excretado na urina e no suor.(13) A hipoclorémia pode ser devida à ingestão de diuréticos e alcalose metabólica (por perdas gastrointestinais). A hiperclorémia pode acontecer em casos de acidose metabólica. Esta condição leva à produção de iões hidrogénio. Para manter a eletroneutralidade, os iões cloreto substituem o bicarbonato consumido.(14)

No equipamento DxC 800, o ionograma é determinado por potenciometria indireta, com eléctrodos seletivos.

A comparação das osmolalidades plasmática e urinária determina o estado da regulação hídrica pelos rins, em caso de distúrbio eletrolítico severo. A osmolalidade do plasma é calculada recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{Osmolalidade (mOsm/Kg)} = (1,86 \times [Na^+] \text{ mmol/L}) + [Glucose] \text{ mmol/L} + [Ureia] \text{ mmol/L} + 9$$

Os 9 mOsm/Kg representam a contribuição de outras substâncias osmoticamente ativas no plasma como K^+ , cálcio (Ca^{2+}) e proteínas. A constante 1,86 reflete a contribuição do Na^+ e do Cl^- .(13)

3.5.3.2 Avaliação do Metabolismo Ósseo

O crescimento ósseo é influenciado pelo metabolismo do cálcio, fosfato, magnésio (Mg^{2+}) e de várias hormonas, tais como a hormona da paratiroide (PTH) e 1,25 dihidroxivitamina D.

O **Cálcio** é o catião mais prevalente no organismo humano, com particular importância em vários mecanismos fisiológicos nomeadamente na contração muscular, na transmissão nervosa, em processos de ativação enzimática e na coagulação.

Na corrente sanguínea, o Ca^{2+} encontra-se na forma ionizada (livre), ligado a proteínas ou complexado com aniões (ex. fosfato). A forma livre do Ca^{2+} é a biologicamente ativa. A sua concentração no plasma é regulada pelas hormonas paratiroideia e 1,25 dihidroxivitamina D (calcitriol). A hipercalcémia pode ser detetada em casos de tumores ósseos ou hiperparatiroidismo. A hipoalbuminémia é a causa mais comum de hipocalcémia. As situações de insuficiência renal crónica, hiperfosfatémia e diminuição dos níveis de 1,25 dihidroxivitamina D, contribuem para hipocalcémia.(15)

A determinação da concentração de Ca^{2+} é realizada por potenciometria indireta com recurso a elétrodo seletivo do ião cálcio e um elétrodo de Na^+ de referência.

O **Fósforo**, na forma de fosfato inorgânico e orgânico, é um elemento importante e amplamente distribuído no organismo. O fosfato no plasma existe na forma de anião monovalente ($H_2PO_4^-$) e divalente (HPO_4^{2-}). (15)

O doseamento é baseado na reação do fosfato inorgânico com o molibdato de amónio. Desta reação é formado um complexo cuja absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de fósforo na amostra.

O **Magnésio** é o quarto catião mais abundante no corpo. Cerca de 50-60% do Mg^{2+} total encontra-se no tecido ósseo. O Mg^{2+} funciona como cofator de várias reações enzimáticas que envolvem armazenamento, transferência e produção de energia e síntese de ácidos nucleicos.(16)

O doseamento deste catião tem por base a reação do Mg^{2+} com a calmagite, formando-se um cromogénio. A alteração da absorvância a 520 nm é diretamente proporcional à concentração de Mg^{2+} na amostra.

A **PTH** é uma hormona produzida na paratiroide que atua sobre o osso e o rim. Promove o aumento da concentração do Ca^{2+} sérico, a diminuição da concentração do fósforo e pelo

aumento da forma ativa da vitamina D – calcitriol. No osso, a PTH mobiliza o Ca^{2+} e o fósforo para a circulação. No rim, a PTH leva ao aumento da retenção do Ca^{2+} e excreção do fósforo. A relação entre estes parâmetros encontra-se resumida na figura 13.

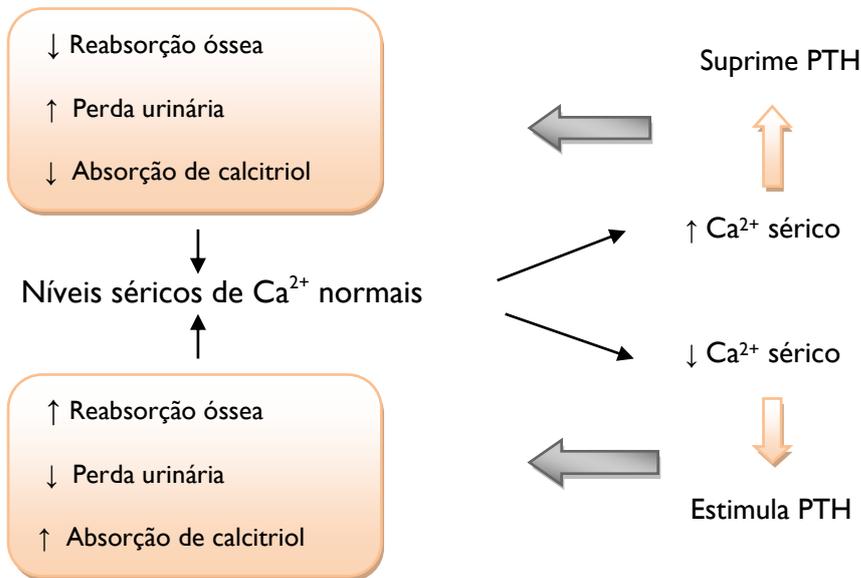


Figura 13: Relação entre concentrações de cálcio sérico, PTH e calcitriol.(16)

3.5.3.3. Avaliação da Função Renal:

Para a avaliação da função renal, os parâmetros mais determinados no laboratório de análises são a creatinina, a ureia, o ácido úrico, a β_2 Microglobulina e a microalbuminúria.

A **Creatinina** é formada a partir da creatina e fosfocreatina no músculo esquelético, sendo eliminada por filtração glomerular.

A determinação da creatinina é baseada na reação da creatinina com o ácido pícrico, em pH alcalino, formando o complexo vermelho creatinina-picrato. O aumento da absorvância a 520 nm é diretamente proporcional à concentração da creatinina na amostra.

A *clearance* da creatinina é o teste utilizado para avaliar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG). Trata-se de um parâmetro calculado, que recorre a uma amostra de urina de 24 horas, de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Clearance da Creatinina (mL/min)} = \frac{[\text{creatinina urina}]}{[\text{creatinina soro}]} \times \text{volume(urina 24 horas)}$$

A **Ureia** resultante do catabolismo das proteínas e aminoácidos é predominantemente eliminada pelos rins. O doseamento da ureia plasmática, tem sido utilizada como marcador

da função renal, no entanto é reconhecido atualmente que a creatinina fornece melhor informação a este respeito.(17)

A determinação da concentração da ureia é realizada por um método enzimático de variação da condutividade. A reação converte a espécie não iónica (ureia) numa espécie iónica (iões amónio e bicarbonato). Durante a reação, a taxa de elevação da condutividade é diretamente proporcional à concentração de ureia.

O **ácido úrico** é um composto azotado e é o principal produto do metabolismo das purinas adenosina e guanosina. A hiperuricémia tem um valor clínico maior, relativamente à hipouricémia. A hiperuricémia acompanha normalmente situações de gota, obesidade, aterosclerose, diabetes mellitus ou hipertensão. O seguimento de doentes hiperuricémicos assintomáticos é efetuado devido ao elevado risco de doença renal, provocada por acumulação de uratos nos túbulos renais.(17)

A determinação da concentração de ácido úrico no soro baseia-se numa reação de conversão do ácido úrico a alantoína e peróxido de hidrogénio por ação da enzima uricase. O peróxido de hidrogénio reage com a 4-amino-antipirina e o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfonato, numa reação catalisada pela peroxidase, produzindo um composto corado. A variação de absorvância lida a 520 nm é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

A **β_2 Microglobulina** é uma proteína de baixo peso molecular encontrada na superfície da maioria das células nucleadas. A β_2 microglobulina é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida nos túbulos proximais. A determinação deste parâmetro no soro é inversamente proporcional à TFG. Níveis séricos elevados, desta proteína, indicam patologias linfoproliferativas e mieloproliferativas, inflamação e falha renal. O doseamento é efetuado por nefelometria.(18)

A **Microalbuminúria** é definida pela determinação de baixas concentrações de albumina na urina. É um marcador prematuro da falha renal. O controlo deste parâmetro é essencial em patologias como a diabetes, para prevenção de uma das principais complicações desta patologia – a nefropatia diabética.

Para a quantificação da microalbuminúria são utilizados Ac policlonais contra a albumina humana, num ensaio turbidimétrico. O grau de turvação é proporcional à concentração de albumina na amostra.

A **Análise Sumária da Urina** (ou Urina Tipo II) permite a avaliação do estado renal utilizando uma amostra de fácil obtenção. A amostra deve ser, preferencialmente, a primeira urina da manhã, ou caso não seja possível, uma amostra pelo menos 2 horas após a última micção. Deve ser obtida por colheita do jato médio. Esta análise funciona como um indicador rápido do estado glicémico do indivíduo e da função hepatobiliar. A análise sumária da urina, de rotina, compreende a avaliação das características físicas (cor, turvação), análise química (densidade, pH, glicose, corpos cetônicos, pigmentos biliares, hemoglobina, proteínas, urobilinogénio, nitritos, esterase leucocitária) e observação do sedimento urinário (estimativa semi-quantitativa do número dos elementos figurados presentes na amostra).(18)

A análise dos parâmetros bioquímicos utiliza tiras-reagente, lidas por espectrofotometria.

3.5.3.4. Avaliação da Função Hepática

O fígado é o maior órgão do corpo e é responsável pela produção da maioria das fontes de energia utilizadas pelo organismo. O controlo da função hepática é efetuado no caso de diversas patologias, através de parâmetros como a bilirrubina e diversas enzimas.

A **Bilirrubina** deriva da lise dos eritrócitos no sistema reticulo-endotelial. Depois da sua formação, é transportada e biotransformada no fígado e excretada na bÍlis e urina.(19)

A bilirrubina circula na corrente sanguínea ligada à albumina; no fígado é conjugada com ácido glucorónico – bilirrubina conjugada ou direta. Esta fração de bilirrubina é solúvel em água, pelo que é excretada pelos rins. A bilirrubina não conjugada ou indireta é insolúvel na água.

O doseamento da concentração sérica de cada uma das frações de bilirrubina permite o diagnóstico diferencial da icterícia. A hiperbilirrubinémia não conjugada é uma situação pré hepática (por hemólise excessiva) ou hepática (defeito na eliminação ou conjugação com ácido glucorónico ineficaz). Nestas situações é detetado um aumento da bilirrubina total. A hiperbilirrubinémia conjugada pode ter origem hepática ou pós hepática, ocorrendo normalmente obstrução dos vasos hepáticos (icterícia obstrutiva).

A determinação da concentração de bilirrubina baseia-se na reação desta com o reagente diazo na presença de cafeína, benzoato e acetado (aceleradores), com formação do composto corado, azobilirrubina. A monitorização da alteração da absorvância a 520 nm é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina.

A **Fosfatase Alcalina** é responsável pela hidrólise de vários tipos de substrato. Encontra-se normalmente nas membranas celulares e a sua atividade é maior no fígado, osso, intestino, rim e placenta. O doseamento desta enzima no soro é útil para diferenciar patologias hepatobiliares de patologias ósseas. A atividade da fosfatase alcalina aumenta acentuadamente (10 vezes) como resultado de obstrução extra hepática (colestase ou cálculos).(19)

A determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina baseia-se numa reação catalisada pela mesma, na qual a hidrólise de *p*-nitrofenil fosfato (composto sem cor) leva à formação de *p*-nitrofenil (composto amarelo em pH alcalino) e fosfato inorgânico. O aumento da absorvância a 410 nm é diretamente proporcional à atividade da enzima.

A **Aspartato Aminotransferase (AST)** e a **Alanina Aminotransferase (ALT)** catalisam a conversão do aspartato e da alanina a oxaloacetato e piruvato, respetivamente. Estas transaminases são ainda os testes mais úteis para detetar danos nas células hepáticas. Os níveis mais elevados de ALT são encontrados no fígado, enquanto que a AST está presente, praticamente em níveis semelhantes, no coração, músculo esquelético e fígado.(18)

A determinação da atividade destas enzimas baseia-se na reação catalisada pela mesma, em que o grupo amina da L-Aspartato e da L-Alanina é transferido para o 2-Oxoglutarato, formando oxaloacetato. O oxaloacetato, na presença da forma reduzida de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e malato desidrogenase é reduzido a L-Malato, no caso da AST, e L-Lactato, no caso da ALT. O NADH é oxidado a nicotinamida adenina nucleótido (NAD⁺), sendo monitorizada a variação da absorvância a 340 nm que é diretamente proporcional à atividade das enzimas.

A **Gama Glutamyltransferase (GGT)** é uma enzima predominantemente ligada à membrana, em células de determinados tecidos, como rins, pâncreas, fígado, baço e intestino delgado. Apesar da atividade da GGT ser mais elevada no tecido renal, a GGT sérica está geralmente elevada como resultado de patologia hepática. Uma vez que esta é uma enzima hepática, a ingestão de álcool, drogas, barbitúricos e anti depressivos induzem o seu aumento. A determinação da sua atividade é útil no diagnóstico e monitorização de doenças do fígado e do trato biliar, sendo um teste de rastreio para deteção do alcoolismo não declarado.(19)

A deteção da atividade da GGT tem por base uma reação catalisada pela própria, na qual um grupo gama glutamilo é transferido do substrato incolor (gama glutamil-*p*-nitroanilina) para a

glicilglicina, produzindo a p-nitroanilina (produto corado). A variação da absorvância lida a 410 nm é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra.

A **Lactato Desidrogenase** (LDH) está presente em numerosos tecidos e catalisa a interconversão do piruvato e lactato, na presença de NAD^+ . O doseamento da LDH total pode ser útil nos casos em que apenas um órgão específico está envolvido. É portanto um marcador não específico, que é usado em combinação com outros marcadores no diagnóstico e tratamento. Encontra-se aumentada na hepatite tóxica ou viral, obstrução biliar extra hepática, necrose e cirrose hepática.(19)

A deteção da atividade da LDH tem por base uma reação reversível catalisada pela própria, na qual o lactato e o NAD^+ são convertidos a piruvato e NADH. A alteração de absorvância a 340 nm é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

O laboratório central do SPC efetua ainda o doseamento da proteína **Alfa₁ antitripsina**, por nefelometria. Esta proteína inibe enzimas proteolíticas e é útil no diagnóstico de cirrose hepática.

3.5.3.5. Avaliação da Função Pancreática

O pâncreas é uma glândula envolvida no processo digestivo, composta por tecido endócrino e exócrino. As funções endócrinas do pâncreas incluem a produção de insulina e glucagon. Ambas as hormonas estão envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono. A função exócrina envolve a produção de muitas enzimas envolvidas no processo digestivo. As doenças pancreáticas podem ser agrupadas em: patologias das células dos ilhéus pancreáticos, como a diabetes mellitus (deficiência de insulina) e excesso de glucagon; insuficiência exócrina, com malabsorção associada; patologias inflamatórias, como a pancreatite aguda ou crónica; patologias neoplásicas, como adenocarcinomas, que podem levar a obstrução biliar se a massa ocorrer na cabeça do pâncreas.(20)

Dependendo da etiologia e quadro clínico, deve suspeitar-se de envolvimento da função pancreática quando existe aumento da amilase e lipase.

A **Amilase** é uma enzima que catalisa a hidrólise do amido e glicogénio. A sua produção ocorre nas glândulas salivares e no pâncreas. O doseamento da amilase sérica e urinária tem significado clínico, particularmente no diagnóstico de pancreatite aguda.

A determinação da atividade da amilase baseia-se numa reação catalisada pela mesma, em que ocorre a hidrólise do substrato 4,6-etilideno-4-nitrofenil- α -D-maltoheptaosido e a subsequente hidrólise dos produtos para p-nitrofenol, com a ajuda da α -glucosidase. A variação da absorvância lida a 410 nm é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

A **Lipase** é uma enzima que catalisa a degradação dos triglicéridos a glicerol e ácidos gordos. A determinação da sua atividade no soro é útil para o diagnóstico de pancreatite aguda. A lipase aumenta no soro tão rápido como a amilase, mas permanece elevada mais tempo. Assim, alguns clínicos consideram a lipase mais sensível que a amilase como indicador de pancreatite aguda ou de outras causas de necrose pancreática.(20)

Para a determinação da atividade da lipase pancreática é monitorizada a taxa de formação de metil-resorufina que se forma espontaneamente a partir de duas reações acopladas que utilizam um éster do ácido 1,2-O-dilauril-glicero-3-ác.glutárico-6-metilresorufina como substrato. A taxa de formação de cor medida a 560 nm é diretamente proporcional à atividade da lipase.

3.5.3.6. Avaliação de Doença Muscular e Cardíaca

Os marcadores de lise muscular, tal como a creatinase (CK), permitem detetar situações de fadiga e desgaste muscular. Particularmente importante na monitorização do músculo cardíaco são parâmetros como a CK-MB e a troponina.

A **creatinase** é responsável pela transferência reversível do grupo fosfato da creatina fosfato para a molécula de adenosina difosfato (ADP), formando-se a creatina e adenosina trifosfato (ATP). A atividade desta enzima é mais elevada no músculo esquelético, tecido cerebral e miocárdio.

A determinação da isoenzima CK-MB (músculo cardíaco) é realizada com frequência devido à sua utilidade em caso de suspeita de enfarte do miocárdio. A CK-MB eleva-se no soro de doentes com enfarte miocárdio, 4 a 6 horas após dor torácica, tornando-se um marcador com elevada sensibilidade e especificidade de diagnóstico 8 a 12 horas após o evento. Têm sido documentados numerosos casos de níveis elevados de CK-MB acompanhados de níveis normais de CK, durante o início de um enfarte. Nestes casos, porém, existe um aumento e queda dos valores de CK, sem nunca ultrapassar o limite de referência superior.(21)

Na determinação da atividade enzimática, a CK presente na amostra catalisa a transferência de um grupo fosfato para o ADP. O ATP produzido é usado para fosforilar a glucose formando glucose-6-fosfato (G-6-P) na presença de hexocinase. A G-6-P é depois oxidada com redução de NADP^+ a NADPH. O aumento da formação de NADPH é monitorizado a 340 nm e é proporcional à atividade de CK na amostra.

A determinação da atividade enzimática da isoenzima CK-MB baseia-se numa reação semelhante, com a adição de uma mistura de anticorpos monoclonais que inibem a atividade da CK-MM e metade da atividade da CK-MB. A atividade é obtida multiplicando a atividade da CK-B por dois.

A **Troponina** é um complexo constituído por três proteínas reguladoras, troponina C, troponina I e troponina T, que está associado às células musculares e é responsável pela sua contração. A nível cardíaco existe um isómero específico da troponina I – cTnI. Em caso de lesão do miocárdio há libertação imediata de cTnI para a circulação, o que faz com que este parâmetro seja determinado em situações de urgência. Este parâmetro é determinado por quimioluminescência.(22)

3.5.3.7. Diabetes Mellitus

A principal função bioquímica da glucose é fornecer energia para os processos biológicos. A determinação da glicémia é das análises mais frequentes no laboratório de análises clínicas. Este parâmetro ajuda ao diagnóstico e monitorização da diabetes.

No equipamento DxC 800, a glucose é determinada com recurso a um eléctrodo de oxigénio. O pico de consumo de oxigénio é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra.

Segundo a norma da Direção Geral da Saúde para o Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus (23), o diagnóstico da diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores:

- a) Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dL;
- b) Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dL;
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75 g de glucose;
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$

O diagnóstico de diabetes num indivíduo assintomático, não deve ser efetuado na base de um único valor, devendo ser confirmado numa segunda análise após uma ou duas semanas. Nas análises de glicémia podem ser identificadas tolerâncias diminuídas à glicose, que constituem um risco para o desenvolvimento de diabetes. Nestes casos as glicémias em jejum são ≥ 110 mg/dL e < 126 mg/dL e glicémias às 2 horas na PTGO ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL.

Em casos de gravidez é realizado o despiste de diabetes gestacional:

- a) Glicémia em jejum (1ª consulta): ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL;
- b) Se glicémia em jejum < 92 mg/dL, efetua-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação.

O diagnóstico de diabetes gestacional é confirmado com um ou mais valores (Figura 14):

1. 0 hora após, glicémia ≥ 92 mg/dL;
2. 1 hora após, glicémia ≥ 180 mg/dL;
3. 2 horas após, glicémia ≥ 153 mg/dL

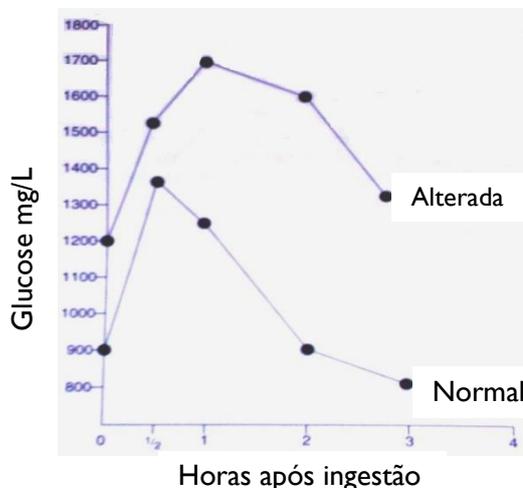


Figura 14: Prova de tolerância oral à glicose. Resposta normal e a diabética.(24)

O sistema de regulação dos níveis de glicose no sangue, está concebido para armazenar glicose em excesso sintetizando glicogénio ou mobilizar a glicose armazenada para manter os níveis de glicose sanguínea. O metabolismo da glicose é regulado por hormonas como a insulina e o cortisol, sendo estes parâmetros determinados no laboratório.

O papel da **insulina** é regular o armazenamento da glicose extracelular sob a forma de glicogénio, gorduras e proteínas. Esta hormona inibe a proteólise, lipólise, gluconeogénese e

glicogenólise. Vai estimular a síntese de lípidos e glicogénese no fígado e aumenta a síntese proteica no músculo.(23)

A determinação da insulina é efetuada por imunoensaio não competitivo, sanduíche com leitura quimioluminescente. A quantidade de insulina na amostra é diretamente proporcional ao sinal gerado.

3.5.3.8 Avaliação do Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos têm funções importantes em todos os aspetos da vida: funções hormonais, como fonte de energia, ajudando na digestão e como componentes estruturais das membranas celulares. No entanto, os lípidos e as lipoproteínas estão intimamente envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose, um processo patogénico que é causa de doenças cardiovasculares e doença vascular periférica.(25)

Os lípidos circulam na corrente sanguínea em complexos proteicos que, dependendo das suas dimensões e densidade, são classificados como quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

O estudo do metabolismo dos lípidos envolve a determinação de parâmetros como o Colesterol Total, Colesterol HDL, Colesterol LDL e Triglicéridos.

O **Colesterol** é um álcool do grupo dos esteróis que é precursor ou parte integrante de sais biliares, hormonas, membranas plasmáticas e outras moléculas ou estruturas especializadas.

Para o doseamento do colesterol é necessária a reversão da esterificação do colesterol. Assim é promovida a hidrólise dos ésteres a colesterol livre e ácidos gordos. O colesterol livre é oxidado obtendo-se peróxido de hidrogénio. Este reage, produzindo-se quinoneimina, um composto corado. A variação de absorvância a 520 nm é proporcional à concentração de colesterol na amostra.

As **HDL** são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado. No fígado é transformado em sais biliares, que são excretados para o intestino através das vias biliares, juntamente com algum colesterol livre.(25) Existe uma relação

inversa entre a quantidade de HDL presente na corrente sanguínea e a probabilidade de incidência de doenças cardiovasculares.

A quantificação das HDL é conseguida através da precipitação de lipoproteínas de maior dimensão. O colesterol HDL no sobrenadante é quantificado pelo método enzimático, colorimétrico, com leitura por ponto final. A intensidade da cor do corante formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol HDL.

As **LDL** são responsáveis, principalmente, pelo transporte do colesterol para os tecidos. As células possuem recetores específicos para as LDL nas suas membranas, sendo que o aumento das LDL em circulação está muitas vezes relacionado com a diminuição desses recetores. Este aumento está diretamente associado a um maior risco de aterosclerose.

No laboratório, a quantificação das LDL é efetuada por método indireto recorrendo à equação de Friedwald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicerídeos}/5]$$

Esta equação pode ser utilizada sempre que o valor de triglicerídeos não ultrapassar os 400 mg/dL, caso contrário não se obtém um resultado válido.(25)

Os **Triglicerídeos** (TG) são moléculas insolúveis na água que são transportadas no plasma em lipoproteínas e armazenadas no tecido adiposo. Estas moléculas são constituídas por três ácidos gordos ligados a um glicerol. Esta forma de reserva energética é altamente eficiente dada a magnitude da energia libertada quando os ácidos gordos sofrem o seu catabolismo.(25)

Para uma correta avaliação dos TG, é muito importante um jejum prolongado. A ingestão de alimentos leva a um aumento dos TG em circulação, principalmente ao nível da fração dos quilomicrons, fazendo com que o valor seja determinado por excesso.

A determinação dos níveis séricos de TG baseia-se numa cadeia de reações que tem o seu início com a sua hidrólise em glicerol e ácidos gordos, por ação da lipase. A variação da absorvância, lida por ponto final a 520 nm, é diretamente proporcional à concentração de TG na amostra.

A **Lipoproteína Lp(a)** é estruturalmente semelhante à LDL. Apesar da Lp(a) ter um papel na trombogénese, também desempenha uma função na deposição de colesterol na parede

arterial, induzindo a atividade dos monócitos. Valores elevados de Lp(a) estão associados com risco alto de doença cardíaca e coronária.(26)

A quantificação da Lp(a) é efetuada por nefelometria, com detecção da luz dispersa pelos complexos Ag-Ac formados.

3.5.3.9. Avaliação do Metabolismo do Ferro

O **Ferro** é um dos elementos mais abundantes na Terra, no entanto, está presente nas células em quantidades vestigiais. Participa em vários processos como o transporte de oxigênio e no metabolismo de oxidação celular. A homeostasia do ferro é regulada pela sua absorção intestinal. Apenas cerca de 10% do ferro ingerido diariamente é absorvido. Uma vez que o ferro existente na alimentação é na forma férrica (Fe^{3+}), este tem que ser reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) e ligado a proteínas, para ser absorvido. Depois de novamente convertido em Fe^{3+} pela ceruloplasmina, é transportado no sangue pela transferrina até à medula óssea, onde é incorporado na estrutura da hemoglobina, e ao fígado, onde pode ser armazenado pela ferritina. Quando a ferritina se encontra saturada de ferro, este pode ser armazenado nos tecidos em pequenos grânulos de óxido de ferro – hemosiderina.(27)

O estudo do metabolismo do ferro é útil no diagnóstico de anemias e outros estados patológicos.

O doseamento do ião ferro é efetuado por leitura da variação da absorvância a 560 nm, sendo diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra.

A **Ferritina** em circulação está em equilíbrio com a reserva de ferro nos tecidos, e na maior parte das circunstâncias reflete com precisão a quantidade de ferro armazenado.

A determinação da ferritina é efetuada por ensaio imunoenzimático não competitivo, sanduíche com leitura quimioluminescente. A produção de luz é diretamente proporcional à quantidade de ferritina na amostra.

A **Transferrina** é o nome do complexo apotransferrina- Fe^{3+} . Cada molécula de transferrina tem dois locais de ligação para Fe^{3+} . A transferrina transporta o ferro até às células onde se liga a recetores específicos existentes na superfície.

O doseamento da transferrina é realizado por imunoturbidimetria.

Para o estudo do metabolismo do ferro é ainda determinado outro parâmetro – a **capacidade total de fixação de ferro** (TIBC-Total Iron Binding Capacity). Este parâmetro corresponde à quantidade de ferro que poderia estar ligado aos locais de ligação de toda a transferrina em circulação, caso estivesse saturada.

Para a determinação da TIBC, é utilizado o doseamento da transferrina que é convertido em TIBC por aplicação de uma fórmula de conversão. A concentração sérica de ferro dividida pela TIBC dá-nos a saturação da transferrina.

Como já foi referido, o estudo do metabolismo do ferro é útil para o diagnóstico de anemias. Para auxiliar neste diagnóstico são também importantes parâmetros como a vitamina B₁₂ e o ácido fólico.

A **Vitamina B₁₂** (cianocobalamina) é necessária para a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN). A principal fonte de vitamina B₁₂ são alimentos de origem animal, como carne, ovos e leite. A sua absorção é através do complexo formado com o fator intrínseco, produzido nas células parietais gástricas.

O **ácido fólico** é também indispensável à síntese de ADN, necessária à maturação dos eritrócitos. Pode ser encontrado em vegetais de folha verde e carne. Armazenado no fígado, é libertado em circulação consoante as necessidades.

A deficiência de vitamina B₁₂ interrompe a absorção de ácido fólico nos eritrócitos. Uma vez que ambos estão ligados pela sua intervenção na síntese da metionina, é frequentemente necessário a determinação de ambos os parâmetros em simultâneo.(28)

As determinações da vitamina B₁₂ e do ácido fólico são efetuadas por ensaio imunoenzimático competitivo com leitura quimioluminescente.

3.5.3.10. Avaliação de Marcadores de Inflamação

Em situações clínicas que envolvam inflamação, são solicitados ao laboratório os doseamentos de parâmetros importantes para a sua caracterização: Proteína C-Reativa (PCR) e Fator Reumatóide (FR).

A **Proteína C-Reativa** é sintetizada no fígado e a sua concentração pode aumentar drasticamente em resultado de processos agudos de inflamação. Funciona como resposta à presença de citocinas solúveis produzidas por monócitos e macrófagos.

A PCR encontra-se no soro de indivíduos com pneumonia aguda, outra infeção bacteriana ou tumores malignos.(29)

O doseamento da PCR é conseguido pela formação de complexos PCR-Ac anti-PCR, que são detetados por turbidimetria.

O **Fator Reumatóide** pode ser detetado na maioria dos doentes com artrite reumatóide. Este é um anticorpo da classe IgM, com afinidade para a região constante (Fc) das IgG humanas. Os complexos formados acumulam-se nas articulações. Trata-se de um parâmetro importante para o diagnóstico e prognóstico dos indivíduos com concentrações elevadas de FR. Frequentemente é executado o teste de Waaler-Rose, para deteção de fatores reumatóides. Trata-se, no entanto, de um teste qualitativo, menos sensível e menos específico.

O doseamento do FR baseia-se numa reação imunológica entre partículas de látex revestidas com IgG humana e os Ac presentes na amostra. A aglutinação é detetada por nefelometria.

3.5.3.11 Monitorização de Drogas Terapêuticas

A monitorização de drogas terapêuticas é essencial para a gestão das patologias neurológicas e psiquiátricas. O clínico pode avaliar mais rapidamente a eficácia, toxicidade e interações medicamentosas, sabendo a concentração sérica do medicamento.(30)

O doseamento das concentrações de drogas antiepiléticas é dos parâmetros mais solicitados pelos neurologistas.

A **Fenitoína**, **Carbamazepina** e **Valproato** (ácido valpróico), são algumas das drogas antiepiléticas cujo doseamento é efetuado no laboratório. A metodologia utilizada é a imunoturbidimetria.

O **Lítio** é utilizado no tratamento de psicoses maníaco depressivas. A sua monitorização evita níveis séricos tóxicos. O doseamento é efetuado por espectrofotometria.

3.5.3.12 Outros parâmetros determinados

O **Etanol** é outro parâmetro determinado, cujo doseamento é utilizado no diagnóstico e tratamento da intoxicação e envenenamento por álcool.

O doseamento baseia-se numa reação enzimática em que a álcool desidrogenase catalisa a oxidação do etanol a acetaldeído, com redução do NAD a NADH. A variação na absorvância provocada pelo NADH é diretamente proporcional à concentração de álcool etílico na amostra.

O **Anti-Estreptolisina O (ASO)** é um anticorpo específico contra a estreptolisina O, uma enzima produzida por *Streptococcus* β hemolíticos do grupo A de Lancefield, *Streptococcus pyogenes*. Este agente bacteriano é responsável por faringites.

A determinação laboratorial baseia-se na reação imunológica entre a estreptolisina O ligada a partículas de látex e o Ac presente na amostra. A leitura é efetuada por turbidimetria.

A **Colinesterase** é responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina libertada nos terminais nervosos para a transmissão de impulsos nervosos na sinapse.

Os níveis de colinesterase no soro são úteis como indicadores de envenenamento por inseticida, pois esta enzima é inibida por compostos fosforosos orgânicos.

A sua determinação baseia-se na hidrólise da butiriltiocolina a tiocolina e butirato. A tiocolina reduz o hexacianoferrato(III) amarelo a hexacianoferrato(II) incolor. A diminuição da absorvância a 410 nm é diretamente proporcional à atividade da colinesterase na amostra.

3.5.3.13. Avaliação da Função Tiroideia

A tiróide é uma glândula que se divide em dois lóbulos (tem a forma de borboleta), constituídos por folículos. Os folículos são as unidades secretoras da glândula, são esferas de células foliculares que rodeiam um material viscoso, o colóide. O maior constituinte do colóide é a tiroglobulina produzida pelas células foliculares. As hormonas tiroideias atuam na mediação de numerosos processos metabólicos.

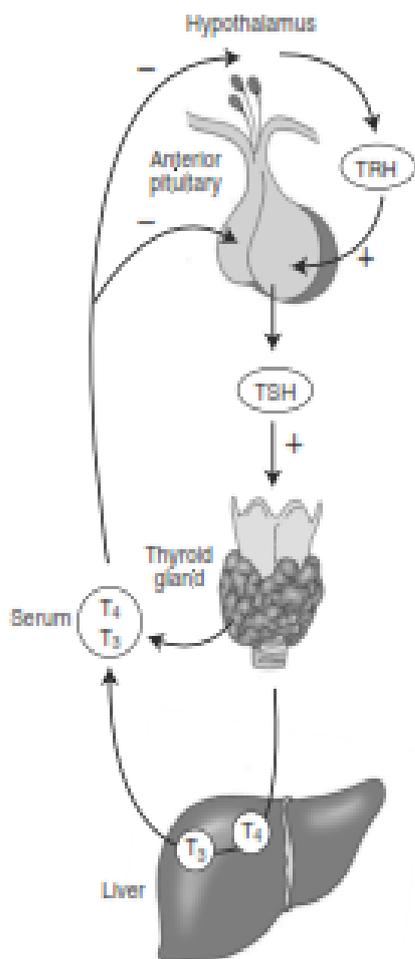


Figura 15: Eixo hipotálamo-pituitária-tiróide.(31)

A tirotrófina ou **hormona estimulante da tiróide** (TSH) é sintetizada e secretada pela pituitária anterior. A sua função é regular a libertação das hormonas da tiróide do colóide. A secreção de TSH, por sua vez, é regulada pelo hipotálamo através da hormona libertadora da tirotrófina (TRH) e pelo *feedback negativo* das hormonas da tiróide. Como se pode ver na figura 15, o aumento de triiodotironina (T3) ou tiroxina (T4) inibe a secreção de TSH, enquanto que a sua diminuição, estimula a TSH.(31) A produção das hormonas da tiróide requer iodeto captado do sangue pelas células da tiróide. A iodinação de resíduos de tirosina na tiroglobulina leva à formação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A T4 é constituída por dois resíduos DIT e a T3 por um resíduo de MIT e um de DIT. A tiróide liberta essencialmente T4, no entanto a T3 é mais ativa. A conversão de T4 em T3 é efetuada no fígado.

O doseamento da TSH é efetuado por ensaio imunoenzimático não competitivo, sanduíche.

A **Tiroglobulina (Tg)** armazenada no colóide funciona como pró hormona, na síntese de T3 e T4. Os níveis séricos de Tg podem estar aumentados em várias patologias que resultam na destruição do tecido da tiróide, como a tiroidite de Hashimoto, doença de Graves ou carcinoma da tiróide. O doseamento da Tg é realizado por imunoensaio enzimático não competitivo, sanduíche.

A **Triiodotironina** é secretada diretamente pela tiróide e é obtida por conversão da T4, no fígado. Circula na corrente sanguínea ligada a uma proteína de transporte – a globulina ligadora de tiroxina (TBG).

A **Tiroxina** representa a maior parte da produção da tiróide. Circula ligada a proteínas de transporte, como a TBG, transtiretina (pré albumina) e albumina.

As formas livres, **T3L** e **T4L**, são metabolicamente ativas. São também importantes na avaliação da função tiroideia visto que muitos fatores podem modificar a ligação da T3 e T4 às suas proteínas de transporte.

O aumento da TSH e a diminuição da T4L são os indicadores bioquímicos de hipotiroidismo primário. No adulto, o hipotiroidismo primário pode resultar de tiroidite crónica autoimune (tiroidite de Hashimoto), tratamento com iodo radioativo ou involução espontânea da tiróide. O hipotiroidismo secundário traduz-se na diminuição da TSH e T4L. O hipertiroidismo primário caracteriza-se pelo aumento das hormonas da tiróide com diminuição da TSH. No caso da TSH estar aumentada, estamos perante um hipertiroidismo secundário.(31)

As patologias autoimunes da tiróide resultam da ligação de autoanticorpos às membranas celulares da tiróide. As reações de inflamação resultantes levam a alterações da função da tiróide. As patologias autoimunes da tiróide são devidas a **anticorpos antiperoxidase (ATPO)**, dirigidos contra os microssomas citoplasmáticos das células da tiróide e a **anticorpos antitiroglobulina (ATG)**, dirigidos contra a tiroglobulina. Estão associados ao hipotiroidismo na tiroidite crónica autoimune, observando-se mais frequentemente os ATPO.

3.5.3.14 Avaliação da Função Gonadal

Os testes da função gonadal são úteis para a avaliação de patologias como o hipogonadismo no homem, distúrbios menstruais, problemas de fertilidade e hirsutismo na mulher. Os principais parâmetros determinados são a hormona luteinizante (LH), a hormona foliculoestimulante (FSH), a progesterona, a testosterona, o estradiol, a prolactina e a gonadotrofina coriónica humana (hCG). No laboratório central do SPC, estes doseamentos são efetuados por imunoensaio enzimático não competitivo, sanduíche com leitura por quimioluminescência.

A função gonadal é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitária-gónadas. O hipotálamo segrega a hormona de libertação das gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez, induz a segregação da LH e FSH pela hipófise. A secreção destas hormonas é assegurada por um mecanismo de

feedback das gónadas, através da produção de estrogénio e progesterona ou testosterona, para a hipófise e hipotálamo.(32)

Na mulher, a **FSH** estimula o crescimento do folículo e a síntese de progesterona e estradiol. Estas hormonas controlam os níveis de FSH por *feedback* negativo. No homem é responsável pela estimulação e manutenção da espermatogénese e consequentemente pelos níveis de testosterona circulantes. Nestes, níveis elevados de FSH estão associados a hipogonadismo (ausência de *feedback* negativo).

A **LH** é uma hormona que induz a ovulação e libertação de progesterona e estradiol.

O **Estradiol** (17- β -estradiol) é o estrogénio ovárico predominante. Na mulher pós menopausa encontra-se em maior concentração a estrona e o estriol é o estrogénio da placenta. O doseamento do estradiol é utilizado no estudo da função ovárica, na monitorização do desenvolvimento folicular em casos de fertilização e na confirmação de menopausa. Os níveis de estradiol encontram-se aumentados na gravidez e no caso de tumores produtores de estrogénios. Em casos de menopausa, insuficiência ovárica e hirsutismo, os níveis de estradiol estão diminuídos.(32)

A **Progesterona** é produzida pelo corpo lúteo e placenta. Trata-se da hormona fundamental para a preparação do endométrio e manutenção da gravidez. A diminuição para níveis de referência induz a menstruação.

A **Testosterona** é secretada pelas células de Leydig dos testículos por estimulação da LH. A diferenciação dos órgãos genitais externos masculinos e as características sexuais secundárias, são da responsabilidade desta hormona. Níveis diminuídos desta hormona podem ser a causa de hipogonadismo e insuficiência testicular. Na mulher, níveis elevados de testosterona são a causa de infertilidade, hirsutismo, amenorreia e obesidade.

A **Prolactina** é uma hormona hipofisária cujos níveis aumentam durante a gravidez. Estimula e mantém a lactação nas mulheres. É influenciada pelo exercício físico, stress, hipoglicémia e alguns fármacos.(32)

3.5.3.15. Avaliação da Função Adrenal

A glândula adrenal é um órgão multifuncional que produz hormonas esteróides. A maioria das patologias desta glândula estão ligadas pelo seu impacto na pressão sanguínea e equilíbrio eletrolítico.

A hormona **Adrenocorticotrófica (ACTH)** é produzida pela hipófise e atua no córtex adrenal com vista à produção de esteróides. A sua produção aumenta em situações de stress, obesidade e hipertensão. É útil no diagnóstico diferencial da insuficiência adrenal e hipersecreção de hidrocortisona no Síndrome de Cushing. Os níveis de ACTH encontram-se significativamente elevados em indivíduos com a doença de Addison, devido à ausência de *feedback* negativo do cortisol. Em casos de insuficiência adrenal secundária a uma deficiência da pituitária, os níveis de ACTH estão diminuídos. Os níveis séricos de ACTH podem ainda estar aumentados devido a produção ectópica, como no caso de carcinomas do pulmão, pâncreas, mama, estômago e cólon.

O seu doseamento é realizado em plasma, colhido a frio, por imunoensaio enzimático com leitura quimioluminescente.

O **Cortisol** é uma hormona glucocorticóide sintetizada a partir do colesterol, no córtex adrenal. A sua libertação é regulada por mecanismo de *feedback* negativo (Figura 16) ao nível do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Trata-se de uma hormona com ritmo circadiano, com um pico matinal, que regula o metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Possui ainda propriedades anti-inflamatórias.(33) O doseamento do cortisol na urina representa a quantidade de cortisol sérico não ligado, assim como a determinação do cortisol sérico, utilizando níveis da manhã e da noite ou testes de frenação com dexametasona, constitui um auxílio no diagnóstico de hiperatividade adrenal. O cortisol é determinado por ensaio imunoenzimático competitivo com leitura quimioluminescente.

A **Aldosterona** é um potente mineralocorticóide sintetizado no córtex adrenal. O mecanismo de controlo e secreção da aldosterona envolve o sistema renina-angiotensina II. Situações de hipovolémia e hiponatrémia ativam este sistema com consequente ativação da renina e libertação de aldosterona.

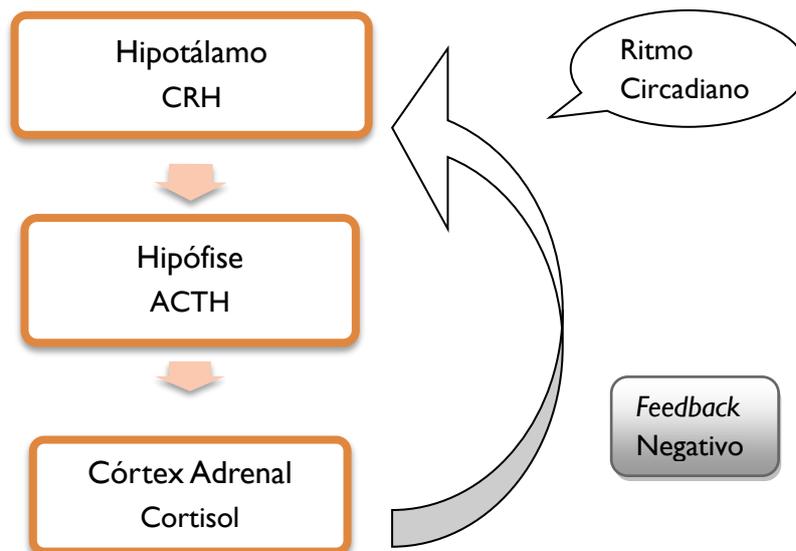


Figura 16: Esquema representativo da regulação e controlo da síntese de cortisol.

A aldosterona é responsável por promover a reabsorção de Na^+ e excreção de K^+ , no rim. O hipoadosteronismo ocorre na doença de Addison e em situações de produção inadequada de renina pelo rim. O hiperaldosteronismo primário ou Síndrome de Conn pode ser devido a adenomas no córtex adrenal.(33) Os doseamentos são efetuados em ortostatismo e decúbito para avaliar o comportamento deste sistema em caso de variação da pressão sanguínea. As amostras utilizadas para esta determinação são o soro e a urina de 24 horas. A metodologia aplicada é ELISA.

3.5.3.16 Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias produzidas pelas células neoplásicas e libertadas para fora do tumor. Podem ser detetados e doseados no próprio tumor, no sangue ou noutros líquidos biológicos. Uma vez que podem ser expressos noutras doenças não neoplásicas, não possuem sensibilidade e especificidade suficientes para utilização no rastreio de cancro. São utilizados na monitorização de doentes oncológicos.

O doseamento dos marcadores tumorais mais frequentemente solicitados e efetuados no SPC são α -Fetoproteína (AFP) e antígeno carcinoembrionário (CEA) (antígenos oncofetais), CA 19-9, CA 125 e CA 15-3 (antígenos tumorais), antígeno específico da próstata (PSA) e a

enolase neuro específica (NSE) (enzimas). O método aplicado na sua determinação é o ensaio imunoenzimático não competitivo, sanduíche com leitura por quimioluminescência. Apenas a NSE é doseada por ELISA.

A **α -Fetoproteína (AFP)** é uma proteína sérica encontrada na vida fetal e uma das principais proteínas carcinoembrionárias. Trata-se do principal marcador relacionado com o carcinoma hepatocelular primário. Níveis elevados deste marcador também podem ser encontrados em indivíduos com tumores no ovário e testículo, carcinoma gastrointestinal e pulmonar. Esta proteína encontra-se transitoriamente elevada em situações benignas como a gravidez.(34)

O **antigénio carcinoembrionário (CEA)** está associado ao cancro colo retal. A elevação dos seus níveis apresentam uma boa correlação com a massa tumoral inicial. Fornece portanto informações sobre o prognóstico do doente, eficácia da terapêutica e recorrência ou metastização. Níveis elevados também ocorrem no caso de carcinoma do esófago, estômago e pulmão. Em situações benignas, como a doença de Crohn, hepatite e pancreatite crônicas, os níveis séricos também se encontram elevados.(34)

O **CA 19-9** é um antigénio circulante associado ao carcinoma do pâncreas. O seu valor sérico está correlacionado com o prognóstico após terapêutica e com a deteção de recidivas. Valores aumentados são também encontrados em situações patológicas como carcinoma colo retal ou estase biliar.(34)

O **CA 125** é o melhor antigénio para avaliar a evolução e resposta terapêutica do carcinoma do ovário, bem como na deteção de recidivas. Apresenta valores elevados também nos carcinomas do útero, rim e estômago. Está presente em casos não neoplásicos como gravidez, endometriose e cirrose hepática.(34)

O **CA 15-3** é o antigénio associado ao carcinoma da mama. Apresenta valor elevado aquando do diagnóstico primário e o seu doseamento é importante na avaliação da resposta terapêutica e na deteção de recidivas.(34)

O **Antigénio Específico da Próstata (PSA)** está relacionado com o carcinoma da próstata, embora valores normais não possam afastar esse diagnóstico. O seu doseamento é importante na avaliação do tratamento. O PSA existe no soro na forma complexada e na forma livre. O PSA livre encontra-se aumentado na hiperplasia benigna da próstata. No caso do carcinoma da próstata, os níveis de PSA complexado estão aumentados e os de PSA livre diminuídos.(34)

A **Enolase Neuro Específica (NSE)** é uma enzima glicolítica encontrada no tecido neuronal. Trata-se de uma proteína encontrada nos tumores com origem neuroendócrina, como no carcinoma das células pequenas do pulmão, carcinoma medular da tiróide, melanoma e tumores endócrinos do pâncreas. A concentração sérica da NSE é determinada por ELISA e está bem correlacionada com a progressão da doença.(35)

3.5.3.17 Autoimunidade

A principal tarefa do sistema imunitário é proteger-nos de substâncias estranhas e nocivas, microrganismos, toxinas e células malignas. No processo de desenvolvimento do sistema imunitário, este aprendeu a inativar respostas destrutivas a substância endógenas e a evitar a lesão irreparável dos tecidos.(36) Quando o sistema imunitário responde inapropriadamente contra o próprio organismo, surgem as doenças autoimunes.

O estudo das doenças autoimunes tem tido uma enorme expansão e sabemos hoje que o desenvolvimento destas doenças dependem de uma combinação de fatores genéticos e ambientais, como hormonas, dieta, toxinas, fármacos e infeções (Figura 17).

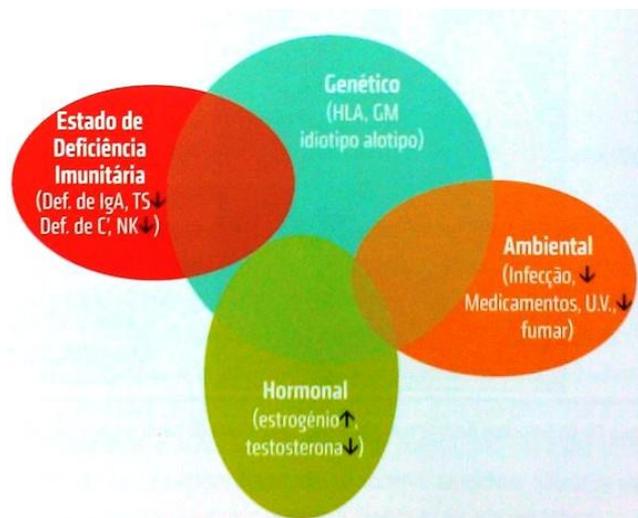


Figura 17: Mosaico da autoimunidade: Fatores de risco para o desenvolvimento da doença autoimune.

O mosaico da autoimunidade permite compreender que, para o desenvolvimento da doença autoimune são necessários vários fatores em simultâneo no mesmo indivíduo.

As doenças autoimunes sistémicas (tabela VI), são caracterizadas pelo aparecimento de autoanticorpos dirigidos contra componentes celulares, que se encontram em todo o organismo.

Tabela VI: Algumas doenças autoimunes sistémicas e seus antigénios.

Doença Autoimune Sistémica	Antigénio (Self)
Esclerose Múltipla	Cérebro e matéria branca
Artrite Reumatóide	Tecido Conectivo
Esclerodermia	Coração, Pulmão, Rim, Trato gastrointestinal
Síndrome Sjögren	Glândulas salivares, Fígado, Rim, Tiróide
Lúpus Eritematoso Sistémico	ADN, proteínas nucleares, membranas dos eritrócitos e plaquetas

As doenças autoimunes específicas de cada órgão são caracterizadas pelo aparecimento de autoanticorpos contra Ag presentes nesses órgãos (tabela VII).

Tabela VII: Principais anticorpos nas doenças autoimunes específicas de órgão.

Órgão	Anticorpo	Patologias associadas
Fígado	ANA, ASMA	Hepatite Autoimune, tipo I
	AMA M2, gp210, Sp100	Cirrose Biliar Primária
Intestino	Endomísio	
	Transglutaminase IgG,IgA	Doença Celíaca
	Gliadinas IgG,IgA	
Músculo	Recetores da acetilcolina	Miastenia Gravis

ANA, Anticorpos Antinucleares; ASMA, Anticorpos Anti Musculo Liso; AMA M2, Anticorpos Anti Mitocôndia fração M2; gp210, Glicoproteína de 210 KDa; Sp 100, Proteína ácidosolúvel de 100 KDa; IgG, Imunoglobulina G; IgA, Imunoglobulina A

A pesquisa e identificação de anticorpos antinucleares (ANA) e anticitoplasmáticos são fundamentais para o diagnóstico destas patologias, e têm sido determinados por IFI durante décadas.

Esta técnica de referência é, presentemente, efetuada utilizando como substrato células HEp-2 (Carcinoma Laríngeo Humano tipo 2), células com um grande núcleo e muitos nucléolos, grande variedade de Ag nucleares, citoplasma abundante e um grande potencial mitótico. Uma limitação desta técnica é a sua falta de especificidade dependendo, da população estudada, diluição da amostra e *cut-off* utilizado, sendo que cerca de 25 % dos soros de indivíduos aparentemente saudáveis podem ser ANA positivos.(37)

A crescente necessidade de efetuar a pesquisa de ANA levou a uma evolução técnica e ao desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico, como ELISA, imunoenaios quimioluminescentes, imunoenaios fluoroenzimáticos e *imunoblotting*.(37)

No SPC, o estudo da autoimunidade é efetuado recorrendo aos métodos de pesquisa IFI, ELISA, *Imunoblotting* e ensaios imunoenzimáticos, de acordo com a especificidade de cada caso. A IFI é o método de referência para o rastreio e determinação semi-qualitativa dos ANA e Ac anticitoplasmáticos no soro humano. Para o efeito são utilizadas lâminas com dois substratos: células HEp-2 (nas fases do ciclo celular mitose e interfase) e corte de fígado de primata. Os autoanticorpos originam padrões de fluorescência característicos no núcleo, nucléolos e citoplasma (Figura 18), cuja análise é subjetiva e depende da experiência do operador (Tabela VIII). Existe assim uma variabilidade intra- e interlaboratorial que constitui o maior desafio no diagnóstico das doenças autoimunes.

Tabela VIII: Padrões IFI (nucleares e citoplasmáticos) mais comuns detetados em células HEp-2 e patologias associadas (adaptado de (37)).

Padrão Nuclear	Antigénios	Patologia associada
Homogéneo	dsDNA, histonas, cromatina/nucleossomas	LES, Vasculite, artrite juvenil idiopática
Mosqueado	UI-RNP, Sm, matriz nuclear	DMTC, LES, Raynaud, SSc, SS,
Fino granular	SSA/Ro, SSB/La, Topo-I	LES, SS, SSc, MI, DMTC
Centromérico	Centrómeros A, B, C,F	SSc, Raynaud
Nucleolar	PM/Scl, RNA-polimerase,	SSc, Raynaud, MI
Padrão Citoplasmático	Antigénios	Patologia associada
Difuso	RibP, Jo-I,	LES, MI
Fino granular	Jo-I, mitocôndria	MI, DM, CBP, Doença intersticial pulmonar

dsDNA, Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla; LES, Lupus Eritematoso Sistémico; UI-RNP, Ribonucleoproteína; Sm, Smith; DMTC, Doença Mista Tecido Conectivo; SSc, Esclerose Sistémica; SS, Síndrome de Sjögren; Topo-I, Topoisomerase I; MI, Miopatia Inflamatória; PM/Scl, Polimiosite/Escleroderma; RibP, Proteína ribossomal P; Jo-I, Anticorpo anti histidil-RNA transferência; DM, Dermatomiosite; CBP, Cirrose Biliar Primária

O resultado da pesquisa de ANA por IFI é expresso em diluição e considerado positivo com um título superior a 1:160. É ainda referido o padrão de fluorescência observado.

Este teste de pesquisa irá orientar o estudo da amostra para métodos mais específicos que permitem a identificação dos Ac.

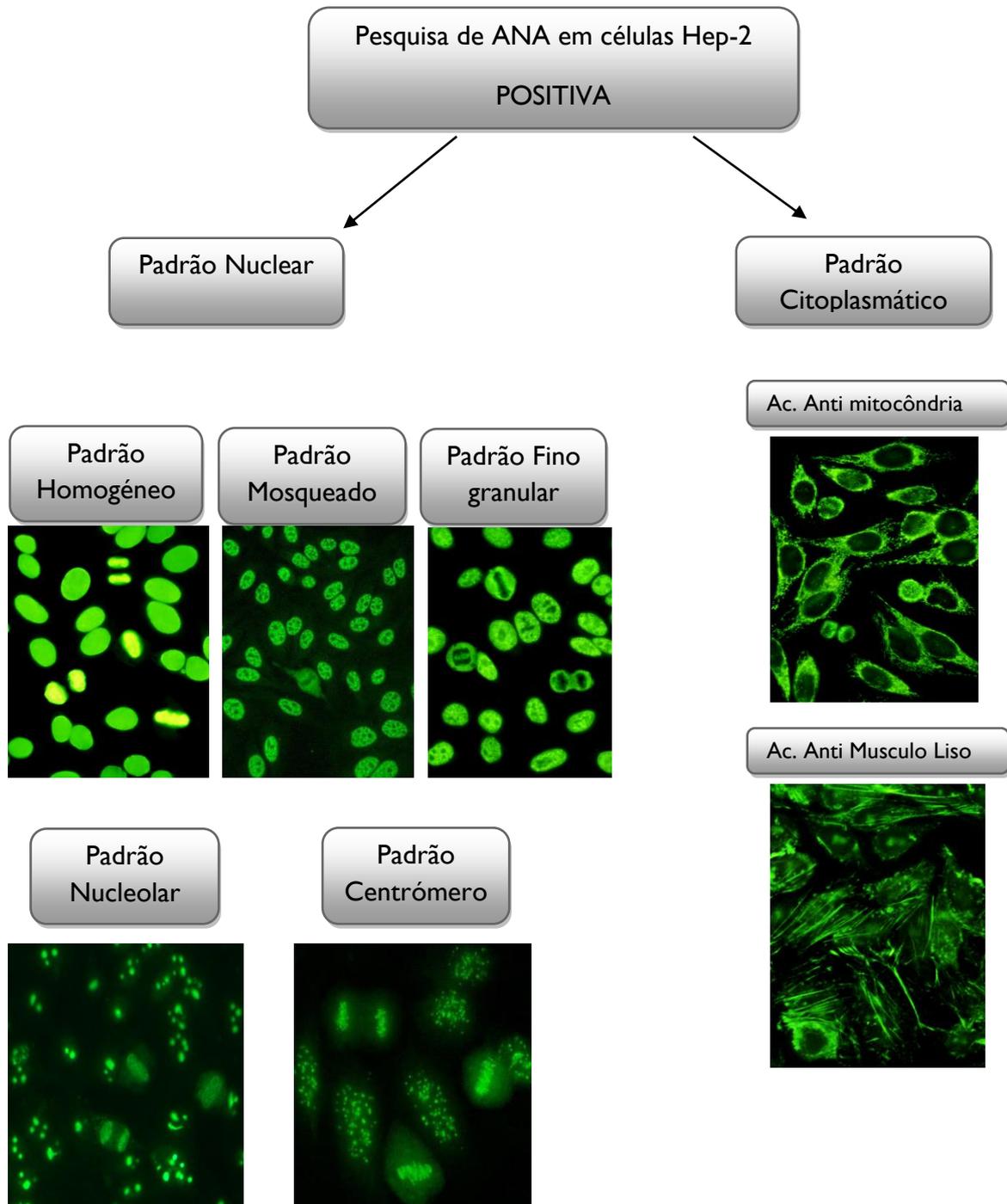


Figura 18: Esquema representativo de padrões de ANA positivos.

A técnica de IFI encontra-se automatizada e é executada no equipamento Mago Plus. Este equipamento permite efetuar as técnicas de IFI e ELISA em simultâneo.

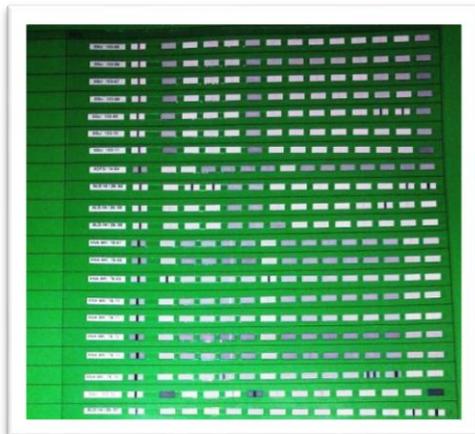


Figura 19: Ensaio de *Imunoblotting*.

O padrão de fluorescência fornece indicação para a presença de determinado Ac, sendo necessário confirmar ou identificar por método diferente. Os métodos disponíveis são ensaios imunoenzimáticos, ELISA e *Imunoblotting* (Figura 19). Na figura 20, estão indicados os antígenos disponíveis para a pesquisa de ANA, por método.

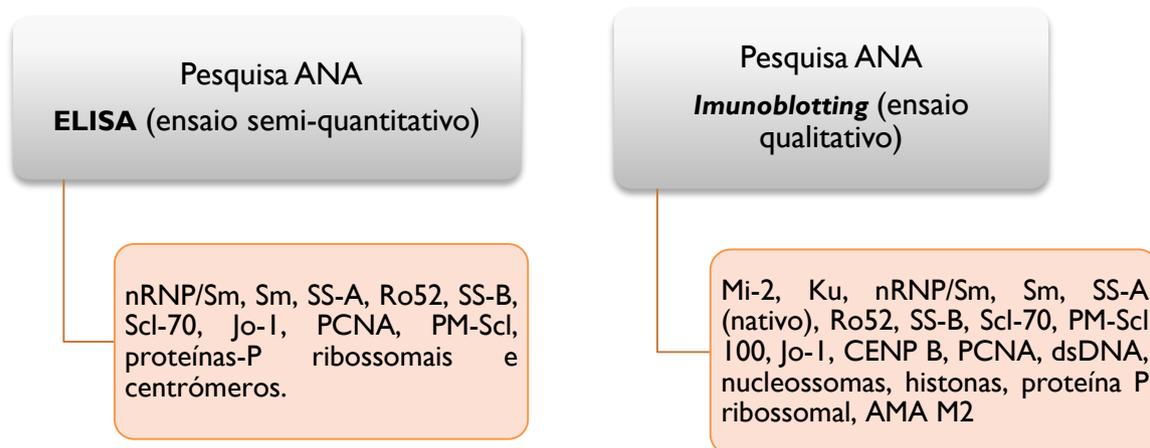


Figura 20: Esquema representativo dos antígenos presentes nas metodologias ELISA e *Imunoblotting*.

A quantificação de anticorpos, Anti Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla (anti dsADN) é realizada por ELISA. Os Ac anti ENA (anti Antígenos Nucleares Extraíveis), assim denominados porque foi possível extrair as proteínas alvo destes Ac, de células do timo, baço e cultura de células, são quantificados por ensaio imunoenzimático.

IV. Conclusões

A realização do estágio em Análises Clínicas no Laboratório da Unidade Hospitalar de Tomar do Serviço de Patologia Clínica, permitiu-me descobrir um Serviço com uma dinâmica e equipanovas, após a minha ausência de três anos. Este estágio possibilitou uma nova integração nas diferentes áreas laboratoriais e simultaneamente o aprofundamento dos conhecimentos teóricos adquiridos durante o Mestrado.

Na área da Microbiologia, este Estágio permitiu-me desenvolver a prática de sementeiras dos diferentes produtos, trabalhar com um equipamento automático de identificações de microrganismos e execução de antibiogramas que não conhecia. Assim, foi possível aplicar os conhecimentos adquiridos em Bacteriologia Clínica e Microbiologia.

Nas áreas de trabalho da Hematologia, Bioquímica e Imunologia, este estágio permitiu adquirir conhecimentos para trabalhar com diferentes equipamentos. Conhecendo as metodologias aplicadas, foi possível melhor interpretar e validar tecnicamente os resultados dos parâmetros analíticos determinados. Na área da Imunologia foi-me permitido ainda executar ensaios para determinação de Ac associados a doenças autoimunes, pelas metodologias de IFI e ELISA.

Durante o Estágio tive oportunidade de participar ativamente no processo de certificação do Serviço. Identifiquei situações de melhoria na área da fase pré analítica e participei nas ações corretivas e preventivas com vista à melhoria da qualidade do serviço prestado pelo laboratório.

A frequência do Mestrado de Análises Clínicas e particularmente a realização deste estágio permitiu a minha valorização pessoal e tornou-me uma profissional melhor preparada para responder às exigências diárias de um laboratório de análises clínicas.

V. Bibliografia

- (1) MACCALL, Ruth E.; TANKERSLEY, Cathie M. – **Phlebotomy and Specimen Considerations** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 71- 72.
- (2) DUFOUR, Robert D. – **Sources and Control of Preanalytical Variation** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 76-77.
- (3) COOPER, G. – **Quality Control** In: Basic Lessons in Laboratory Quality Control. Bio-Rad Laboratories, Inc. – Quality Systems Division, 2008, pp 4-8.
- (4) COOPER, G. – **Levey-Jennings Charts & Westgard Rules** In: Basic Lessons in Laboratory Quality Control. Bio-Rad Laboratories, Inc. – Quality Systems Division, 2008, p 23.
- (5) HEINEMAN, William R. et al. – **Electrochemistry: Principles and Measurements** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 273 - 277.
- (6) PESCE, Amadeo J.; FRINGS, Christopher S.; GAULDIE, Jack – **Spectral Techniques** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 94-105.
- (7) KRICKA, L. et al - **Principles of Immunochemical Techniques** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp.162-169.

- (8) DREES, Julia C.; WU, Alan H.B. – **Analytical Techniques** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 130-165.
- (9) FERREIRA, António W.; ÁVILA, Sandra L.M. – *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1996. ISBN: 978-8-5277-2303-9.
- (10) FELDKAMP, Carolyn S.– **Immunochemical Techniques** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 227 – 237.
- (11) ORTON, Susan – **Immunoassays** In BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 185-190.
- (12) ROITT, Ivan; BROSTOFF, Jonathan; MALE, David – **Imunologia**. 6^a Ed. São Paulo: Manole, 2003. ISBN: 85-204-1439-7. pp 419-421.
- (13) SCOTT, Mitchell et al – **Electrolytes and blood gases** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp. 431-439.
- (14) LORENZ, John M.; KLEINMAN, Leonard I. – **Physiology and Pathophysiology of Body Water and Electrolytes** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 441 - 461.

- (15) ENDRES, D.; RUDE, R.– **Disorders of Bone** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 711-721.
- (16) ITANI, O; TSANG, Reginald – **Bone Disease** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 507 - 515.
- (17) LAMB, Edmund J.; PRICE, Christopher – **Creatinine, Urea, and Uric Acid** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 363-370.
- (18) LYNCH, Kara; WU, Alan – **Renal Function** In BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 565-570.
- (19) SHERWIN, John – **Liver Function** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 493 - 505.
- (20) FODY, Edward P. – **Pancreatic Function and Gastrointestinal Function** In BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 578 -587.
- (21) SANHAI, Wendy R.; CHRISTENSON, Robert H. – **Cardiac and Muscle Disease** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 566-577.

- (22) APPLE, Fred; JAFFE, Alan – **Cardiovascular Disease** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 619-622.
- (23) Norma da Direção Geral da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N°002/2011, 14/01/2011.
- (24) DODS, Richard F. – **Diabetes Mellitus** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 580 – 600.
- (25) RIFAI, N.; WARNICK, G; REMALAY, A. – **Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins and Other Cardiovascular Risk Factors** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 402 – 430.
- (26) NAITO, Herbert – **Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 603-615.
- (27) ROCKWOOD, Alan; BACOWSKA, Elzbieta – **Trace Elements** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 416-418.
- (28) DONNELLY, James – **Vitamins** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 723-749.
- (29) JOHNSON, A. – **Amino Acids and Proteins** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 298-316.

- (30) PRIVITERA, Michael; CAO, Cathy; KAPLAN, Marcia – **Nervous System** In: KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 787-807.
- (31) GROTZKE, Marissa – **The Thyroid Gland** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 490-499.
- (32) GROTZKE, Marissa – **Gonadal Function** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 477-488.
- (33) DEMERS, Laurence – **Adrenal Cortical Disorders** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp. 749 - 765.
- (34) MACCUDDEN, Christopher; WILLIS, Monte – **Circulating Tumor Markers: Basic concepts and Clinical Applications** In: BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 637 – 649.
- (35) CHAN, Daniel; BOOTH, Ronald; DIAMANDIS, Eleftherios – **Tumor Markers** In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp.337 - 344.
- (36) BURMESTER, Gerd; PEZZUTTO, Antonio – **Imunologia – Texto e Atlas**. 1^a Ed. Lisboa: Lidel, 2005. ISBN:972-757-329-0.
- (37) LEVIN-AGMON, Nancy *et al.* - **International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies**. 2013. [Acedido a 17 de Abril de 2015]. Disponível na internet: <http://ard.bmj.com>

➡ **1. Objectivo**

Definir os critérios da rejeição de requisição e de amostras biológicas.

2. Âmbito

Aplica-se ao Serviço de Patologia Clínica.

➡ **3. Descrição**

Todas as amostras recebidas no laboratório devem ser corretamente colhidas, transportadas e processadas. O processamento de amostras não adequadas pode fornecer informações erróneas que podem levar a diagnósticos e tratamentos incorretos.

O registo das requisições e amostras não conformes deve ser efetuado no Sistema Informático do Laboratório, ou em caso de falha deste, no *IMP.SPC.001 – Amostras e Requisições Não Conformes*. Este impresso deve também ser utilizado em caso de amostras ou requisições excedentes sem que haja possibilidade de qualquer registo no sistema informático do laboratório.

Os critérios descritos, devem ser cumpridos, sem exceção, por todos os colaboradores responsáveis pela receção das requisições e das amostras biológicas no laboratório.

3.1. Critérios de Rejeição da Requisição

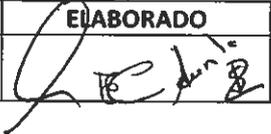
a) Preenchimento incorreto da requisição de exames laboratoriais;

A requisição é rejeitada quando não contém os seguintes dados:

- Nome, nº de processo único e número de episódio;
- Identificação do serviço requisitante;
- Identificação do médico prescriptor (rubrica e nº da cédula profissional);
- Indicação das análises requisitadas e natureza do produto.

b) Requisição em impressos não controlados / obsoletos;

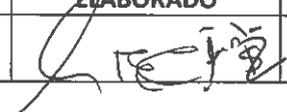
c) Requisições rasuradas ou alteradas;

Nº. DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
PT.SPC.002.04				15.10.2014	1/2

3.2. Critérios de Rejeição das Amostras Biológicas

Critérios	Como proceder
Discrepância na identificação do utente entre a amostra e a requisição	Devolver a requisição e inutilizar a amostra
Discrepância entre o tipo de amostra enviada e a requisição	
Amostra sem identificação (nome e nº de processo do utente)	Inutilizar a amostra
Contentor ou sistema de meio de transporte não apropriado para a amostra e/ou análise a efetuar	
Volume inadequado de amostra	
Condições inadequadas de colheita da amostra	
Integridade do meio de transporte não assegurada	
Verificação de más condições de conservação e estabilidade da amostra	
Contaminação macroscópica da amostra	
Presença de coágulos na amostra a analisar em que estes possam alterar o resultado	
Amostras hemolisadas ou lipémicas, que interfiram nos resultados	
Produto enviado em seringa com agulha	
Amostras derramadas (resíduos de amostra no exterior do contentor / requisição)	Inutilizar amostras ou requisição Contactar serviço requisitante
Catéter não acompanhado de hemocultura	Contactar serviço requisitante

Em todas as situações, é contactado o Serviço requisitante e registado o contacto e a identificação do colaborador contactado no Sistema Informático do Laboratório na secção do relatório interno da amostra.

Nº. DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
PT.SPC.002.04				15.10.2014	2/2