
ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	2
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	4
I. HEMATOLOGIA.....	5
1.1 Equipamentos e Metodologias Utilizadas	5
1.2 Hemograma.....	6
1.2.1 Anemia	10
1.2.2 Execução e Observação do Esfregaço Sanguíneo de Sangue Periférico.....	11
1.2.3 Contagem de Reticulócitos	13
1.2.4 Velocidade de Sedimentação (VS).....	13
1.3 Hemostase e Provas de Coagulação	14
1.4 Grupos Sanguíneos.....	17
1.4.1 Sistema AB0	17
1.4.2 Sistema Rh.....	18
1.5 Ferritina.....	19
1.6 Controlo de Qualidade.....	19
2. BIOQUÍMICA.....	21
2.1 Hidratos de Carbono.....	22
2.1.1 Glicose	22
2.1.2 HbA1c (Hemoglobina Glicosilada).....	23
2.2 Lípidos	24
2.2.1 Colesterol Total	24
2.2.2 Colesterol-HDL.....	25

2.2.3 Colesterol-LDL.....	26
2.2.4 Triglicéridos	26
2.3 Compostos Nitrogenados Proteicos	27
2.3.1 Proteínas Totais.....	27
2.3.2 Proteína C Reativa (PCR)	28
2.3.3 Albumina Sérica.....	29
2.3.4 Microalbuminúria	29
2.4 Compostos Nitrogenados Não Proteicos	30
2.4.1 Ácido úrico	30
2.4.2 Ureia	31
2.4.3 Creatinina e Clearance da Creatinina.....	32
2.5 Enzimas	33
2.5.1 AST /GOT	33
2.5.2 ALT /GPT.....	34
2.5.3 Fosfatase Alcalina (ALP)	35
2.5.4 Gama-glutamil transferase (-GT)	36
2.5.5 Creatina Cinase (CK).....	37
2.5.6 LDH (Lactato Desidrogenase)	38
2.5.7 Amilase	39
2.6 Bilirrubinas	40
2.6.1 Bilirrubina Total.....	40
2.6.2 Bilirrubina Direta	41
2.6.3 Bilirrubina Indireta.....	42
2.7 Iões	42
2.7.1 Sódio	44
2.7.2 Potássio	45
2.7.3 Cloretos	46
2.7.4 Magnésio	46

	Índice
2.7.5 Cálcio	47
2.7.6 Fósforo	49
2.7.7 Ferro Sérico	50
2.8 Controlo de Qualidade no Laboratório de Bioquímica	50
2.8.1 Calibração	50
2.8.2 Controlo de Qualidade Interno	51
2.8.3 Controlo de Qualidade Externo	51
CONCLUSÕES	53
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXOS	57

ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ADE(RDW)	Amplitude da Distribuição Eritrocitária
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase Sérica
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
AR	Artrite Reumatóide
AST	Aspartato Aminotransferase sérica
4-AAP	4-Aminoantipirina
Ca²⁺	Cálcio
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CK	Creatina Cinase
Cl⁻	Cloro
CE	Colesterol Esterase
CNPG3	2-cloro-4-nitrofenil-alfa-D-maltotriosido
CO	Colesterol Oxidase
CPNP	2-cloro-4-nitrofenol
CQI	Controlo de Qualidade Interna
CTFF	Capacidade de Fixação da Transferrina
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfónico
DCHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfonato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase Alcalina
FI	Fentolitros
FR	Fator Reumatóide
FFUC	Faculdade Farmácia da Universidade de Coimbra
FvW	Fator de von Wilebrand
GI	Gastrointestinal
GK	Glicerol Cinase
GLDH	Glutamato Desidrogenase

Abreviaturas

GPO	Glicerolfosfato Oxidase
G6PDH	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
HBA	Ácido Hidroxibenzóico
Hb	Concentração da Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
Hgb	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina Globular Média
HK	Hexocinase
HPO	Peroxidase de Rábano
Ht	Hematócrito
IDL	Lipoproteínas de Densidade Intermédia
INR	International Normalized Ratio
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional (Tromboplastina)
K⁺	Potássio
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LCR	Líquido Cefalorraquideo
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LDH	Lactato Desidrogenase
MDH	Malato Desidrogenase
Mg²⁺	Magnésio
MPV	Volume Médio das Plaquetas
4-MUP	4-metil umbeliferil fosfato
NAC	N-Acetil-L-Cisteína
NAD	Beta –nicotinamida Adenina
NADH	Beta -Nicotinamida Adenina Dinucleótido
Na⁺	Sódio
Nm	Nanómetros
PCR	Proteína-C-Reativa
pg	Picogramas
PTGO	Prova Oral de Tolerância à Glicose
PTH	Hormona Paratiróide
RNA	Ácido Ribonucleico
RF	Fator Reumatóide

Rpm	Rotações por minuto
SASUC	Serviços de Ação Social da Universidade de Coimbra
SD	Desvio Padrão
SGQ	Sistema de Gestão de Qualidade
SIADH	Síndrome de Secreção Inapropriada de Hormona Antidiurética
ST	Saturação da Transferrina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TP	Tempo de Protrombina
TTP	Tempo Parcial de Tromboplastina
UKNEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service
VGM	Volume Globular Médio
VIDAS	Vitek Immuno Diagnostic Assay System
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de densidade muito baixa)
VS	Velocidade de Sedimentação

RESUMO

Este relatório de estágio do Mestrado de Análises Clínicas pretende descrever todas as atividades nas quais estive envolvida durante o período de estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Desta forma, vão ser descritos os métodos usados na execução de análises nas áreas do laboratório em que mais trabalhei hematologia e bioquímica e a respetiva interpretação de resultados.

ABSTRACT

This report for the Clinical Biology Master pretends to describe all the activities on which I was involved during my practice in the Clinical Analyses Laboratory of FFUC.

In this way, there will be described all the methods used in the lab tests on the laboratory areas I worked the most like Hematology and Biochemistry and the results evaluation involved in this testing.

INTRODUÇÃO

Este relatório visa descrever todas as atividades laboratoriais que desempenhei como estagiária do Mestrado de Análises Clínicas, durante o período de 27 de Setembro de 2010 a 15 de Julho de 2011, sob a orientação da Dra. Maria Lucília Silveira e da Dra. Ana Donato, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu todos os dias da semana, de acordo com o horário do laboratório e dependendo do número de amostras diárias. Este estágio de carácter profissional contemplou de forma geral as valências: Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia.

As áreas seleccionadas para complementar os meus conhecimentos a nível clínico foram a Hematologia e a Bioquímica.

Primeiramente, fui integrada na parte organizacional do laboratório, de seguida pela fase de colheitas de amostras e posteriormente no trabalho laboratorial em contato com as amostras do cliente/utente, as técnicas para cada tipo de análise e aparelhos correspondentes. Na primeira fase laboratorial acima referida, a pré-analítica, é muito importante que o cliente/utente, a amostra e a solicitação de exames estejam devidamente identificados. Tem que se ter em conta a correta preparação do doente antes da colheita da amostra em causa, como o fato de estar em jejum, o estado nutricional do utente/cliente, interferência dos medicamentos, exercício físico. Já na fase de colheita da amostra biológica é essencial ter conhecimento dos erros e variações que podem ocorrer antes, durante e após a obtenção da mesma (identificação incorreta da amostra, troca de material, contaminação da amostra, erro por hemólise, homogeneização).

As diversas variáveis analíticas devem ser muito bem controladas na realização de um exame laboratorial para assegurar que os resultados sejam precisos e exatos.

CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O laboratório onde estagiei está incorporado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Este Laboratório de Análises Clínicas tem como Diretora Técnica a Dra. Maria Lucília Silveira Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e como Diretora Técnica Adjunta a Dra. Ana Donato Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas. No LAC também trabalham uma técnica de diagnóstico e terapêutica, duas enfermeiras e duas funcionárias administrativas.

O laboratório está dividido em várias áreas: administrativa, colheitas e laboratório. Também tem um armazém e casas de banho.

As valências disponíveis são: Hematologia, Bioquímica, Endocrinologia, Imunologia e Microbiologia.

O LAC envia amostras específicas dos clientes/utentes para o Laboratório D. Diniz e tem um setor de colheitas no SASUC.

O número médio de amostras diárias do LAC é cerca de 15.

O serviço participa no Programa de Avaliação Externa da Qualidade do INSA, que abrange as áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Endocrinologia e Microbiologia.

O LAC tem vários equipamentos automáticos para processar as diversas análises:

- 1) **Analizador Coulter Max'M** para a realização de análises hematológicas; utilizando o princípio Coulter e Tecnologia VCS;
- 2) **Syncron CX4**: autoanalizador, totalmente automatizado e controlado por computador para a determinação quantitativa de numerosos componentes dos fluidos biológicos, nomeadamente do soro, plasma e urina, usado na Bioquímica;
- 3) **VIDAS**: analisador da Biomérieux, equipamento automatizado para análises imunológicas utilizando a tecnologia ELFA que combina o método ELISA com uma leitura final em fluorescência;
- 4) **Analizador de VS**: autoanalizador para ESR com deteção por fotodiodo e apresentação de resultados em mm Westergreen;

- 5) **Option Plus4**: coagulómetro automático; funcionamento por deteção ótica do coágulo com agitação magnética constante do meio reacional;
- 6) **Spotlyte Na⁺/K⁺/Cl⁻**: analisador automático baseado em eléctrodos seletivos de iões.
- 7) **Sistema Helena** para eletroforese;
- 8) **Combi Scan 100 (analisador de tiras de urina)** para determinar parâmetros bioquímicos na urina.

Dispõe ainda de uma centrífuga e microscópio ótico.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Como já foi referido, estagiei e desenvolvi atividades nos diversos setores:

- 1) **Imunologia:** pesquisa do título de anti-estreptolisina O, ac. anti-citomegalovírus IgG/IgM, ac. anti-HVA, ac. anti-HBc, ac. anti-HBc IgM, ac. anti-HBe, ac. anti-HBs, ac. anti-hepatite C, ac. anti-HIV, ac. anti-HVA IgM, ac. anti-tiróideus, ac. anti-toxoplasma IgG/IgM, ac. anti-vírus da rubéola IgG/IgM, ag. HBe, ag. HBs, fator reumatoide/RA teste, reação de Widal, reação de Waller Rose, reação de VDRL.

- 2) **Microbiologia:** na urina - exame citobacteriológico (direto e cultural com identificação e eventual contagem de colónias e antibiograma).

- 3) **Endocrinologia:** doseamento do estradiol, hormona folículo-estimulante, hormona lúteo-estimulante, hormona tireo-estimulante, tiroxina total ou livre, triiodotironina total e fração livre, prolactina, testosterona e progesterona, marcadores tumorais: Ca 19-9, Ca 125, Ca 15-3, alfa-fetoproteína, ag. carcinoembrionário, ag. específico da próstata- total e fração livre.

- 4) **Hematologia e Bioquímica:** as duas vertentes que mais estudei e que vou focar mais à frente, detalhadamente.

I. HEMATOLOGIA

1.1 Equipamentos e Metodologias Utilizadas

a) Analisador Coulter Max'M para a realização dos hemogramas:



Fig. 1 - Analisador Coulter Max'M

Funcionamento base do Coulter Max'M:

A tecnologia VCS é o mecanismo pelo qual os analisadores de hematologia Coulter fazem a diferenciação dos leucócitos em cinco tipos: Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos.

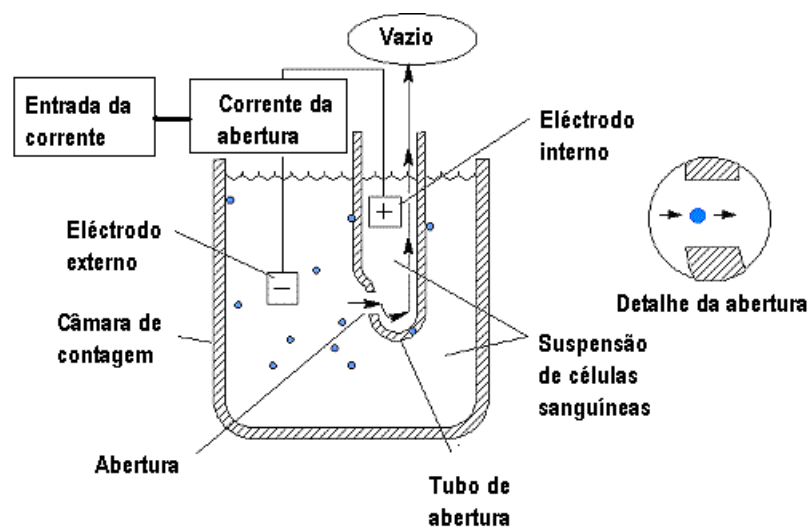


Fig. 2 – Esquema de funcionamento do Coulter

Para a contagem de partículas:

- 1) o número de impulsos elétricos correspondente ao número de partículas que passam na abertura, amplitude dos impulsos proporcional ao volume das partículas;
- 2) abertura na câmara de contagem de eritrócitos e plaquetas de 50 μ m, na câmara de contagem de leucócitos 10 μ m;
- 3) contagem em triplicado para cada tipo de partículas: eritrócitos, plaquetas e leucócitos;
- 4) na câmara de contagem de eritrócitos: eritrócitos-partículas com volume superior ou igual a 36 fl; plaquetas- partículas entre 2 e 20 fl;
- 5) na câmara de leucócitos- partículas com volume superior ou igual a 36 fl.

b) Aparelho automático de VS para medir a Velocidade de Sedimentação.

c) Option Plus4 para realizar os Testes de Coagulação Sanguínea: funcionamento por deteção ótica do coágulo com agitação magnética constante do meio reacional.

1.2 Hemograma

Este exame fornece-nos um conjunto de informações hematológicas quer quantitativas quer qualitativas. É um dos exames laboratoriais mais requisitado pelos clínicos para screening e diagnóstico de diversas patologias. No Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra utiliza-se o Coulter Max'M para a contagem celular. No Coulter Max'M é feito o controlo de qualidade interno antes do processamento das amostras dos utentes, com três níveis de controlo: alto, médio e baixo. Quando aparecem valores muito desfasados no autoanalisador, comparamos esses mesmos valores com o histórico de análises do cliente/utente para termos a certeza se se trata de uma patologia.

Feita a análise dos resultados emitidos pelo Coulter, se nos depararmos com uma alteração significativa dos valores podemos suspeitar de uma patologia, nomeadamente de uma anemia. Após o hemograma faz-se um esfregaço sanguíneo de sangue periférico e por fim a contagem de reticulócitos.

O sangue é colhido por punção venosa para tubos que contêm EDTA na proporção de 1:9 com o sangue.

O EDTA é um anticoagulante capaz de remover o cálcio necessário à coagulação e é o mais indicado uma vez que não altera a morfologia celular.

a) Contagem de eritrócitos: é o número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, expressa em $10^{12}/L$.

b) Concentração da Hemoglobina (Hb): medida de quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue, expressa em g/dl.

c) Hematócrito (Ht): determina o volume sanguíneo ocupado pela massa dos eritrócitos, em percentagem ou L/L. A partir dos valores do hematócrito, da contagem de eritrócitos e da concentração de hemoglobina podemos calcular as constantes eritrocitárias: VGM, HCM, CHCM e o RDW.

d) Volume globular médio (VGM) que é o volume médio dos eritrócitos expresso em fentolitros (fl): $VGM = \frac{Ht/l}{n^{\circ} \text{eritrócitos} \times 10^{12}/l}$. Os valores normais são de **80±10 fl**, os valores acima de **96** indicam **macrocitose** e os valores **inferiores a 80 fl** indicam **microcitose**. É um parâmetro muito útil na classificação de anemias. Quando estamos perante determinadas doenças em que se denota uma variação do tamanho eritrocitário, embora o tamanho médio esteja inalterado, o VGM pode não apresentar alterações e observamos no esfregaço sanguíneo uma anisocitose, que são glóbulos vermelhos de vários tamanhos e, por vezes, também com diferentes formas chamado de poiquilocitose.

e) Hemoglobina corpuscular média (HCM) representa o conteúdo hemoglobínico de um eritrócito expresso em picogramas (pg): $HCM = \frac{Hgbg/l}{n^{\circ} \text{eritrócitos} \times 10^{12}/l}$, os valores normais variam entre **27±6 picogramas**, os valores acima de **33 pg** indicam **hipercromia** e abaixo de **27 hipocromia** (Princípios de Hematologia Clínica, 2007).

f) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) é a razão entre a quantidade de hemoglobina e o volume total de eritrócitos. Assim, $CHCM = \frac{Hgbg/l}{HCTl/l}$.

g) Amplitude da Distribuição Eritrocitária (RDW): é o coeficiente da variação da distribuição dos volumes eritrocitários individuais, expresso em percentagem.

Quanto maior a percentagem de RDW maior é a anisocitose.

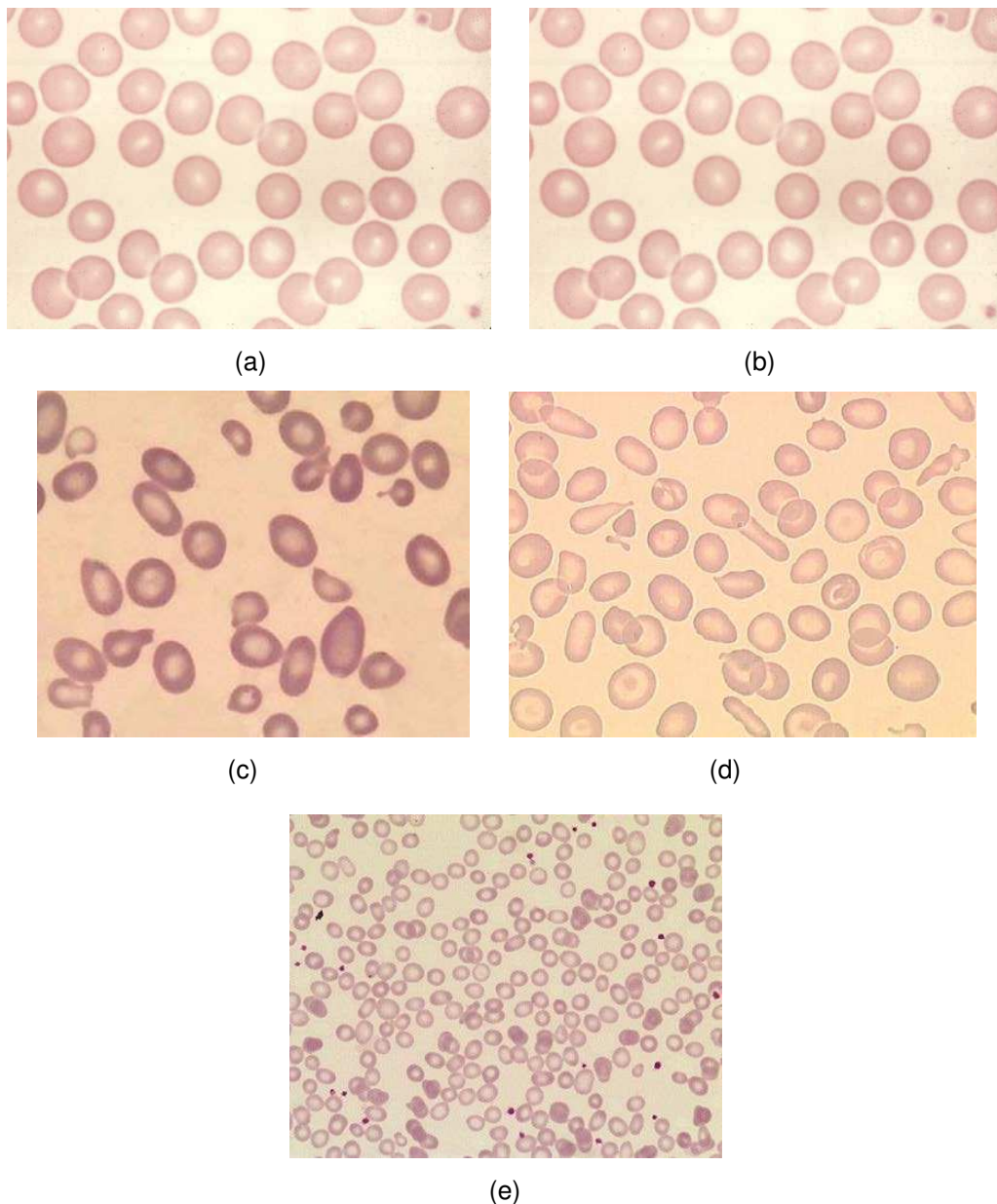


Fig. 3 - Diferentes formas de apresentação das células sanguíneas vermelhas, desde a forma normal a) até ao estado hipocrómico.: (a) Eritócitos normais; (b) Micrócitos; (c) Anisocitose; (d) Poiquilocitose; (e) Hipocromia

Hemograma	Valores de referência
Eritrócitos	♂ 4,52 – 5,9 x 10 ¹² /L ♀ 4,1 – 5,1 x 10 ¹² /L
Hemoglobina	♂ 14,0 – 17,5 mg/dL ♀ 12,0 – 15,0 mg/dL
Hematócrito	♂ 0,42 – 0,5 L/L ♀ 0,36 – 0,45 L/L
VGM	Adultos 80 – 96 fl
HCM	Adultos 27 – 33 pg
CHCM	Adultos 30 – 35 mg/dL
Leucócitos	Adultos 4,4 – 11,3 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos	Adultos 40 – 75 % (2,0 – 7,0 x 10 ⁹ /L)
Linfócitos	Adultos 20 – 45 % (1,0 – 3,0 x 10 ⁹ /L)
Monócitos	Adultos 2 – 10 % (0,2 – 1,0 x 10 ⁹ /L)
Eosinófilos	Adultos 1 – 6 % (0,02 – 0,5 x 10 ⁹ /L)
Basófilos	Adultos < 1% (0,02 – 0,1 x 10 ⁹ /L)

Tabela I – Valores de referência relativos ao hemograma.

h) Contagem de Leucócitos: esta contagem representa o número de leucócitos por unidade de volume de sangue em 10⁹/L. A fórmula leucocitária que completa o hemograma pode ser estabelecida quer pelo contador automático quer pela observação ao microscópio de um esfregaço sanguíneo. A partir daqui faz-se a interpretação analítica através dos números absolutos.

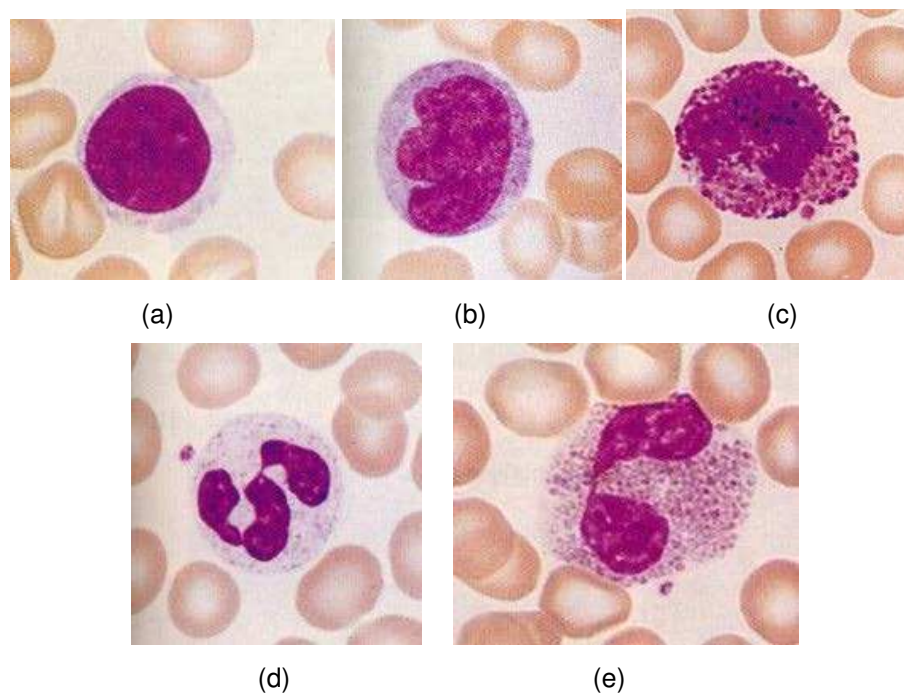


Fig. 4 - Morfologia dos diferentes tipos de leucócitos: (a) Linfócito; (b) Monócitos; (c) Basófilos; Neutrófilos; (e) Eosinófilos

i) Contagem de plaquetas: Este é um tipo de contagem direcionado para o número de plaquetas por unidade de volume de sangue, cujos valores variam entre 150 a $400 \times 10^9/L$ de sangue. Um valor $< 100 \times 10^9/L$ é considerado Trombocitopenia e um valor $> 500 \times 10^9/L$ Trombocitose. Relativamente a esta última, é de todo necessário um estudo cuidadoso, uma vez que é um parâmetro patologicamente importante, pois o perigo de hemorragias pode condicionar a sobrevivência do indivíduo. Para o estudo das plaquetas são necessários testes complementares tais como provas de agregação plaquetar e quantificação do Fator de Von Willebrand.

1.2.1 Anemia

Trata-se de um complexo de sinais e sintomas associados à diminuição da concentração de hemoglobina e do hematócrito abaixo de valores definidos como normais para pessoas normais, saudáveis da mesma idade, sexo e raça, em condições ambientais semelhantes. Os dados laboratoriais que permitem defini-las são as constantes eritrocitárias, hemoglobina, leucócitos, plaquetas e RDW. As anemias distinguem-se em três grupos: microcíticas, hipocrómicas (deficiências em ferro, talassémias) apresentam os valores de VGM $< 80 \text{ fl}$ e HCM $< 27 \text{ pg}$. As anemias normocíticas, normocrómicas têm um VGM entre $80-95 \text{ fl}$ e HCM $> 26 \text{ pg}$ (muitas anemias hemolíticas). As anemias macrocíticas (megaloblásticas ou não megaloblásticas) apresentam um VGM $> 95 \text{ fl}$. Estas são distinções claras mas, contudo, existem características morfológicas da anemia que não são assim tão evidentes, as alterações dependem do estágio de evolução do processo anémico. Por exemplo, a anemia por doença crónica pode ser normocítica e normocrómica ou se a escala de tempo for mais prolongada microcítica e hipocrómica. Estes problemas de diagnóstico são geralmente resolvidos através do aspeto morfológico das células vermelhas; alterações leucocitárias e plaquetárias podem provocar várias dúvidas acerca da natureza das anemias. Nas anemias microcíticas hipocrómicas mede-se o ferro plasmático, a capacidade total de ligação do ferro e a ferritina. Nas anemias macrocíticas o reconhecimento de alterações morfológicas nas células vermelhas por excesso de álcool ou doença do fígado é vital tal como é a crescente policromasia da reticulose. (Practical Haematology, 1995).

1.2.2 Execução e Observação do Esfregaço Sanguíneo de Sangue Periférico

Depois da interpretação dos resultados fornecidos pelo hemograma se suspeitarmos que estamos na presença de alguma patologia executamos um esfregaço sanguíneo de sangue periférico. O esfregaço é feito fazendo deslizar uma gotícula de sangue entre a lâmina e a lamela. Posteriormente para se observarem muito bem os elementos figurados do sangue e alterações morfológicas que possam aparecer realizamos uma coloração de Maygrünwald-Giemsa.

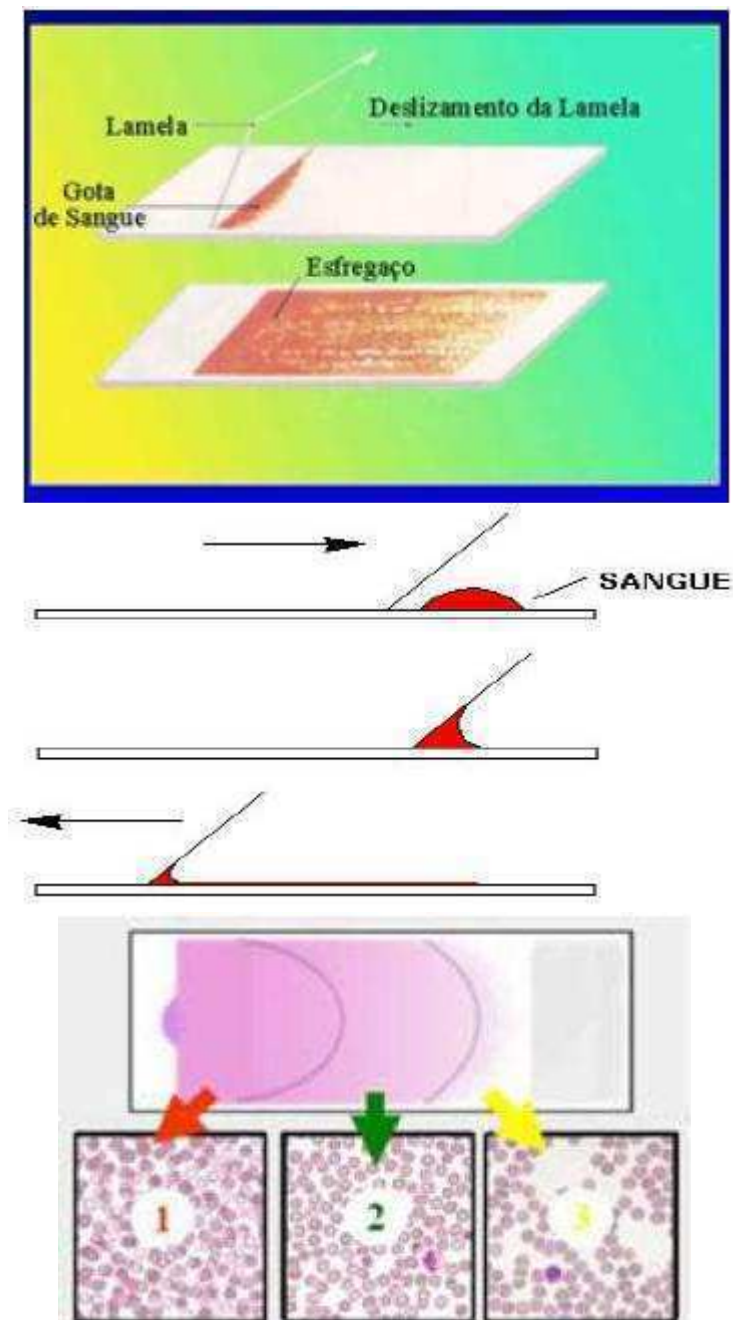
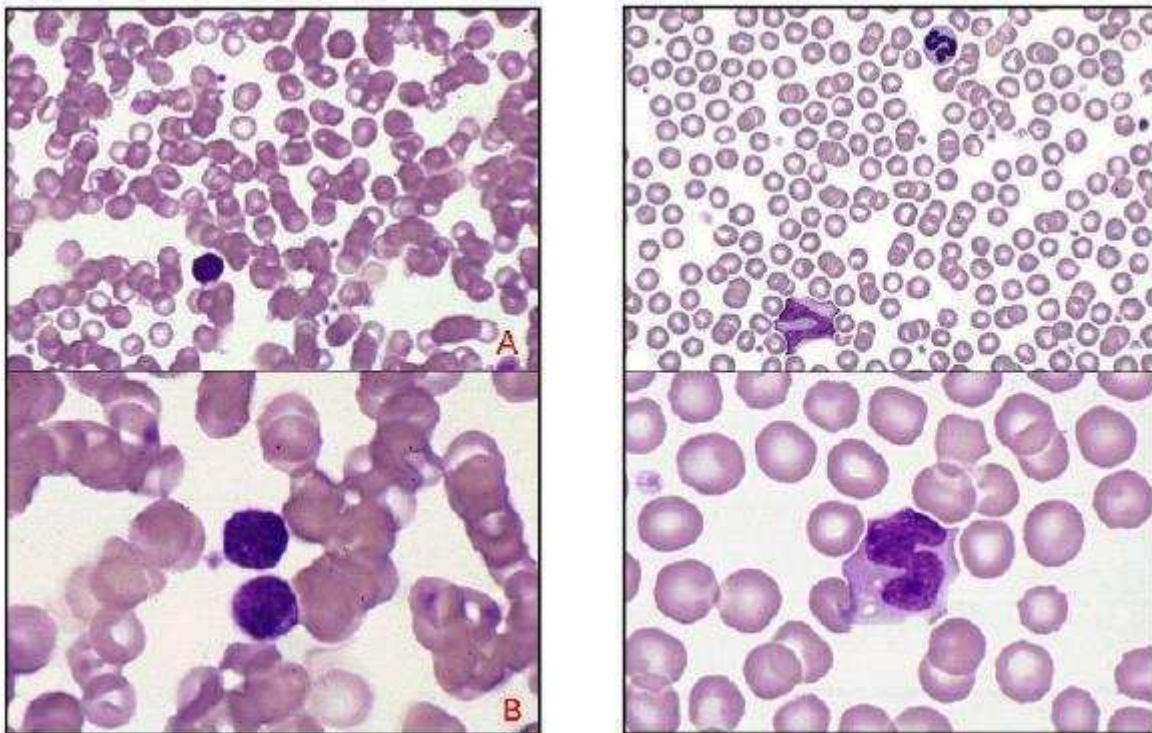
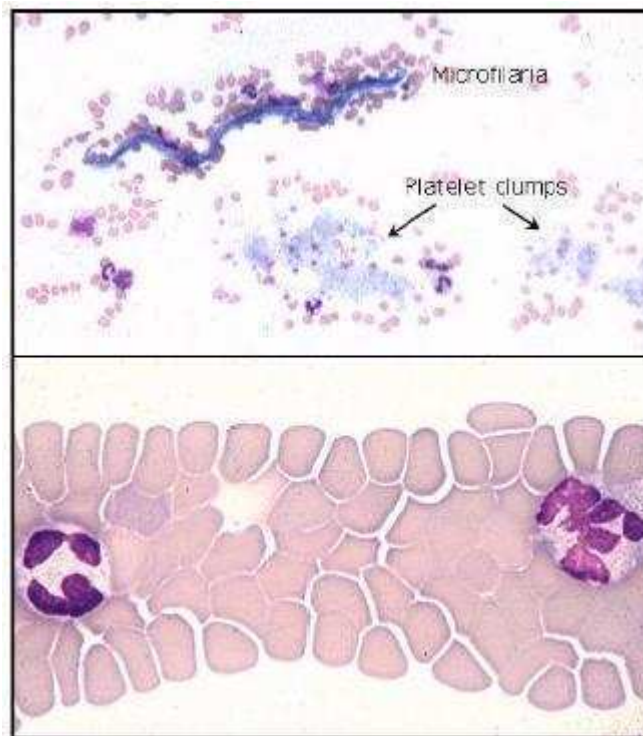


Fig. 5 - Execução de um esfregaço sanguíneo de sangue periférico



(a)

(b)



(c)

Fig. 6 - Observação microscópica de um esfregaço sanguíneo de sangue periférico: (a) Zona espessa de um esfregaço, (b) Zona correta para observação, (c) Zona terminal de um esfregaço.

1.2.3 Contagem de Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos jovens que possuem RNA no seu citoplasma. São células vermelhas mais jovens e precursoras das hemácias normais, cuja percentagem, corrigida pelo hematócrito do paciente, nos dá uma ideia da taxa de produção medular dos eritrócitos (Princípios de Hematologia Clínica, 2007).

Esta contagem é feita para avaliar a capacidade de produção de hemácias da medula óssea e distinguir anemias relacionadas com perda sanguínea ou destruição excessiva de hemácias e anemias por diminuição da produção de hemácias. Para monitorizar a resposta da medula óssea e a reposição da sua função normal após quimioterapia, transplante de medula óssea ou tratamento de anemias.

Procedemos a este tipo de contagem celular quando o paciente apresenta uma diminuição ou um aumento da contagem de hemácias, da hemoglobina, do hematócrito, e também quando o médico quer avaliar a função da medula óssea.

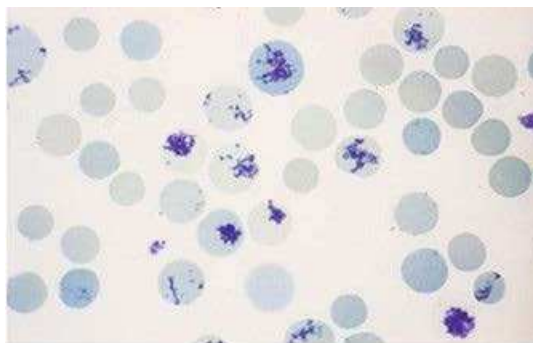


Fig. 7 - Reticulócitos

1.2.4 Velocidade de Sedimentação (VS)

Amostra: plasma citratado em tubo específico.

A velocidade de sedimentação é determinada ao encher um tubo calibrado de diâmetro padrão com sangue total anticoagulado e ao determinar a velocidade de sedimentação dos eritrócitos durante um período de tempo específico, geralmente 1h. Quando os eritrócitos se depositam no fundo do tubo, surge uma zona bastante

grande de plasma transparente, que é a área medida. A maioria das alterações na VS é causada por alterações das proteínas plasmáticas, principalmente fibrinogénio, com menor contribuição das alfa-2-globulinas. A VS está quase sempre aumentada em utentes com insuficiência renal crónica submetidos ou não a diálise. A VS possui três aplicações principais para ajudar a detetar e estabelecer o diagnóstico de distúrbios inflamatórios ou para excluir a possibilidade dessas patologias; como meio de acompanhar a evolução clínica ou no tratamento de doenças com componente inflamatório, como artrite reumatóide ou glomerulonefrite aguda; para confirmar a presença ou ausência de doença oculta, por exemplo quando o doente está totalmente assintomático. Os tubos devem estar numa posição absolutamente vertical; mesmo graus mínimos de inclinação possuem grande efeito sobre a velocidade de sedimentação.

O método de Westergren, no qual se baseia o Option Plus 4, tem a reputação de ser imune aos efeitos da anemia, todavia existem estudos que contrariam esta hipótese. Além da anemia e das alterações observadas no fibrinogénio e nas alfa-2-globulinas, outros fatores também afetam a VS. As alterações nas proteínas séricas que modificam a viscosidade do plasma influenciam a sedimentação dos eritrócitos. Certas doenças como, como a anemia falciforme e a policitemia, diminuem falsamente a VS. Os valores normais estão relacionados com a idade.

1.3 Hemostase e Provas de Coagulação

A hemostase é o conjunto de processos que permitem manter o sangue no estado fluido, resultante da interação entre os fatores de coagulação, plaquetas sanguíneas e a capacidade de contração ou distensão dos vasos sanguíneos em equilíbrio com o sistema fibrinolítico. Para o controlo da hemorragia, quando há rompimento de um pequeno vaso sanguíneo, temos a Hemostase Primária (vasoconstrição e formação de um agregado de plaquetas); de seguida, temos a Coagulação Sanguínea onde há formação de uma rede de fibrina, por ativação da cascata de coagulação. Por último, a Fibrinólise, onde ocorre a dissolução do coágulo e um restabelecimento do fluxo sanguíneo. Mas quando se trata de lesões maiores, o sistema hemostático não é suficiente para solucionar a hemorragia.

Classicamente, a cascata de coagulação divide-se em três vias: a intrínseca, extrínseca e a via comum. Na primeira, os elementos necessários encontram-se no sangue e o processo inicia-se quando há lesão endotelial e consequente exposição do colagénio. A via extrínseca ou via do fator VII é considerada a principal via de iniciação do processo de coagulação que a coagulação parte de uma lesão tecidual com libertação do fator III ou tromboplastina. As duas vias convergem a nível do fator X (via comum), com posterior ativação do fibrinogénio em fibrina. Apesar de ter três vias que a caracterizam, a coagulação é um processo dinâmico, não devendo ser, por isso, compartimentado (Correia- Pinto *et al.*, 1996).

No que diz respeito às Provas de coagulação:

a) Tempo de Protrombina (TP)

O TP é utilizado em três situações: para monitorizar a terapia anticoagulante; como parte de uma triagem geral para distúrbios da cascata de coagulação e como prova de função hepática. O TP indica principalmente a existência de defeitos no sistema extrínseco da coagulação (protrombina e factores V, VII e X). Se o defeito no fibrinogénio for grave ele também irá produzir resultados anormais do TP, uma vez que o teste depende de um mecanismo íntegro da fibrina para produzir o coágulo. É ótimo no controlo da terapêutica com anticoagulantes orais (cumarínicos, antagonistas da vitamina K). As células hepáticas produzem certos factores de coagulação que necessitam da presença da vitamina K para a sua síntese numa forma passível de ser ativada. Os anticoagulantes cumarínicos inibem a utilização de vitamina K pelas células hepáticas. Os factores vitamina K-dependentes, situados por ordem decrescente de sensibilidade à cumarina, são: fator VII, fator IX, fator X e protrombina. A anticoagulação obtida por estes anticoagulante é mais bem monitorizada pelo TP, embora esta prova não seja afetada pelo fator IX (Ravel, 1995).

Para determinar o TP, no sentido de reduzir as diferenças entre os vários tipos de testes utilizados, procedeu-se à padronização das tromboplastinas, atribuindo-se a cada uma o seu ISI. Assim, os utentes/clientes devem monitorizar a dose diária de anticoagulante através do INR dado pela fórmula: $INR = \left(\frac{TP\ doente}{TP\ normal} \right)^{ISI}$, geralmente um INR de 2,5 (Princípios de Hematologia Clínica, 2007).

Método:

O tempo consumido, em segundos, até à coagulação do plasma é o Tempo de Protrombina.

1º Aplicar esferas na cúpula da amostra em duplicado.

2º Colocar 100 µl de plasma em duplicado + 200 µl de reagente (tromboplastina cálcica).

3º Ler INR.

Valores de referência: 0,9-1,1.

Interpretação: O reagente tromboplástico tissular utilizado no teste não contém os fatores V, VII e X, que devem ser fornecidos pelo plasma do paciente, juntamente com a protrombina e o fibrinogênio. Assim, a deficiência ou ausência de qualquer um desses fatores, resulta num prolongamento do Tempo de Protrombina. Admitindo-se que o fibrinogênio esteja em concentração normal, o prolongamento do Tempo de Protrombina deve-se à deficiência de alguns dos fatores do complexo da Protrombina. O Tempo de Protrombina pode encontrar-se alongado nos seguintes casos: presença de anticoagulantes circulantes, na deficiência de vitamina K e nas hepatopatias de um modo geral.

b) Tempo Parcial de Tromboplastina (TTP)

Este é o método mais apropriado para investigar coagulopatias por deficiência de um ou mais fatores de coagulação como a hemofilia, para controlar doentes heparinizados, uma vez que tem a capacidade de avaliar as vias intrínseca e final comum da cascata de coagulação. Avalia todos os fatores de coagulação exceto o VII e o III, com sensibilidade máxima para os fatores VIII e IX.

Método:

1º Aplicar esferas na cúpula reagente/amostra em duplicado

2º Colocar 100 µL de reagente (Triniclot TTP) com as partículas de sílica que formam a superfície de contato + fosfolípidos (libertados na hemostase) e 100 µl da amostra

3º Incubar em 3 min.

4º Aplicar 100 µl de cloreto de cálcio

Notas: é aplicado o reagente + amostra para desencadear a cascata de coagulação.

$$R = \frac{TTP \text{ doente}}{TP \text{ normal}}, (R=0,8 \text{ a } 1,2).$$

Valores de referência: 25-35 segundos

Interpretação: O TTPA é uma prova sensível para avaliar alterações no processo da coagulação. O alongamento do TTPA, é indicativo de alteração dos fatores V, VII, IX, X, II e I, ou ainda, de quando existirem anticoagulantes circulantes.

1.4 Grupos Sanguíneos

O sangue de cada indivíduo é classificado em grupos de acordo com a presença de antígenos específicos nos eritrócitos. O conhecimento do grupo sanguíneo de um doente e de uma determinada unidade de sangue é essencial para a realização de transfusões sanguíneas com um maior grau de segurança. No trabalho laboratorial de rotina fiz as determinações dos grupos AB0 e Rh.

1.4.1 Sistema AB0

O sistema de grupo sanguíneo AB0 é um exemplo clássico de aglutinogénios e seus isoanticorpos correspondentes. Existem três desses antígenos: A, B e 0, cujos genes se localizam num locus em cada cromossoma de um par homólogo. Os antígeno A e B são antígenos relativamente fortes e, do ponto de vista sorológico comportam-se como genes dominantes, enquanto o antígeno 0 não é detetado por soros de tipagem comercial e, portanto, comporta-se sorologicamente como um gene recessivo. O grupo sanguíneo 0 é diagnosticado pela ausência de reação para os antígeno A ou B, de modo que o grupo sanguíneo 0 implica a presença de antígeno 0 em ambos os cromossomas, em vez de apenas um. Esta situação resulta na possibilidade de quatro fenótipos principais A, B, AB e 0, visto que A e B são dominantes em relação a 0. Além disso quando os eritrócitos do indivíduo possuem antígeno A ou B, os isoanticorpos correspondentes anti-A ou anti-B estão ausentes no soro. Por outro lado, se o indivíduo carece de antígenos A ou B, o soro contém o isoanticorpo contra o isoantígeno ausente. O antígeno 0 é tão fraco, que

para finalidades práticas ele é considerado não antigénio. Por conseguinte o indivíduo AA ou A0 terá isoanticorpos anti-B no soro; o indivíduo 00 terá isoanticorpos anti-A e anti-B, e assim por diante.(Ravel,1995)

Amostra: sangue total (EDTA K3)

Método em lâmina: Pesquisa dos antigénios nos eritrócitos do utente/paciente

Para a tipificação AB0 usam-se soros comercializados que contêm anticorpos conhecidos dirigidos contra os respetivos antigénios, que existem à superfície dos eritrócitos: soro anti-A, soro anti-B e anti-AB. A leitura final é feita pela técnica de aglutinação.

1.4.2 Sistema Rh

De acordo com Wiener, o grupo Rh é determinado por genes isolados, contendo cada cromossoma um par desses genes. Na maioria das situações, cada gene deve determinar supostamente um antigénio contra o qual pode ser produzido um anticorpo específico. Na teoria do sistema Rh de Wiener, cada gene controla na verdade um antigénio. Todavia cada um desses antigénios dá origem a vários fatores sanguíneos diferentes, sendo os anticorpos dirigidos contra esses fatores, que são os componentes sorológicos do sistema Rh (Ravel, 1995).

Amostra: sangue total (EDTA K3)

Método: A técnica usada é igual ao Sistema AB0, ou seja, a aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo do AB0, sendo que a aglutinação corresponde a Rh positivo e a sua ausência é Rh negativo.

1.5 Ferritina

A ferritina é uma proteína de elevado peso molecular que contém ferro e que funciona como uma reserva de ferro no nosso organismo. É encontrada fundamentalmente nas células da medula óssea, baço e fígado, onde armazena o ferro em excesso. A ferritina constitui uma medida mais sensível, específica e fiável para a determinação precoce do estado de depleção de ferro.

Amostra: soro

Método: Imunoensaio no VIDAS 30. Para detetar os anticorpos, fixa-se o antigénio nas paredes do cone. Se a amostra tiver o anticorpo pesquisado, 4-metil umbeliferil fosfato é hidrolisado em Umbeliferona (ELISA indireta). Para detetar as imunoglobulinas M, a IgM é pesquisada e capturada pelos anti-IgM fixados nas paredes do cone. A presença de IgM é revelada pelo Ag estabilizado meio líquido. A deteção de antigénios (baterianos, virais, proteicos) o anticorpo é fixado nas paredes do cone. Para estes três princípios, a fluorescência medida é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos ou de antigénios presentes na amostra. Para calibrar este aparelho automatizado temos que introduzir um cartão com toda a informação necessária para reconhecer o kit, recalibrar de 14 em 14 dias.

Valores de referência:

Homens: 21,8 a 274 ng/ml

Mulheres: 4,6 a 204 ng/ml

1.6 Controlo de Qualidade

O sistema de controlo de qualidade minimiza os erros analíticos no laboratório, com a finalidade de obter resultados fiáveis e seguros. Temos assim um sistema de controlo de qualidade interno e externo. O controlo interno é uma análise diária de amostras baseada nos valores dos analitos conhecidos para avaliar a precisão dos ensaios. Assim, podemos avaliar o funcionamento eficiente das técnicas laboratoriais fornecendo resultados válidos que posteriormente contribuirão para um

bom diagnóstico clínico. Este parâmetro tem como objetivos garantir a reprodutibilidade (precisão), verificar a calibração dos analitos e indicar o momento certo para promover ações corretivas quando surgir uma não conformidade. Todos os documentos referentes ao controlo da qualidade devem ser arquivados para estarem sempre disponíveis a todos os elementos integrantes do LAC, de acordo com as premissas das Boas Práticas de Laboratório

Clínico.

Temos também o controlo de qualidade efetuados pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade em Hematologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Este tipo de controlo interlaboratorial visa comparar a exatidão dos exames do laboratório com a de outros participantes, tendo em conta análises de alíquotas do mesmo material, a partir de concentrações desconhecidas fornecidas pelo controlo de qualidade externo. Com a participação do INSA no controlo externo torna-se possível assegurar resultados finais muito próximos do valor real (exatidão) dentro de uma variabilidade analítica permitida. Não podemos descurar a importância do material de controlo, homogéneo e estável e os analitos presentes devem ser estáveis durante o prazo de validade tanto na forma liofilizada quanto após dissolução.

2. BIOQUÍMICA

No setor de Bioquímica do LAC, os principais equipamentos automatizados no sentido de assegurar um resultado válido são:

- a) O autoanalisador Synchron CX4
- b) O Spotlyte Na⁺/K⁺/Cl⁻
- c) Combi Scan 100 (Analisador de tiras da urina)
- d) Aparelho para eletroforese da Helena Biosciences



Fig. 8 – Autonalisador Synchron CX4

O autoanalisador Synchron CX4 executa todos os passos que eram usados manualmente nos tempos mais remotos.

Primeiramente, procede-se à calibração, depois é feito o controlo e por último coloca-se a amostra a correr no carrossel, fazendo uso de códigos de barra para facilitar todo o processo. Para a leitura final são usados fotómetros com quatro filtros de comprimentos de onda. Este é um autoanalisador que funciona pela técnica de quimioluminescência nas amostras de soro; urina (urina 24h), sangue total (HbA1c). No Synchron CX4 existem vários tipos de técnicas consoante os requisitos dos parâmetros a analisar. Técnicas estas como a colorimétrica direta para as proteínas totais, cálcio, ferro, entre outros; métodos enzimáticos colorimétricos em que a intensidade de cor é proporcional às enzimas mas não é direta porque há uma

interferência de enzimas (ex.: na glicose, é a glicose oxidase); cinéticas de ordem zero para todos os enzimas e o princípio de turbidimetria que doseia a PCR, o Fator Reumatoide, a Microalbuminúria e a HbA1c, exibem uma maior sensibilidade para traçar as curvas de calibração.

2.1 Hidratos de Carbono

2.1.1 Glicose

Resumo do teste: a determinação deste monossacarídeo no sangue é o diagnóstico mais frequentemente utilizado para auxiliar no diagnóstico da diabetes. O doseamento de glucose é feito num conjunto específico de provas em jejum; em jejum e pós-prandial; Prova de Tolerância oral à glucose e curva de glicémia.

As alterações no metabolismo da glucose correspondem, na maioria das vezes, a uma hiperglicemia (> 106 mg/dL) e com menor frequência, a hipoglicémia (< 74 mg/dL). Pode ocorrer também uma tolerância diminuída à glucose; Diabetes Mellitus 1 e 2 e ainda Diabetes Gestacional. Em jejum, pode estar relacionada com diversas patologias como disfunção hepática, deficiência hormonal; Insuficiência Renal Crônica, septicémia e muitas outras. A prova pós-prandial, é utilizada mas é pouco específica pois depende de muitas variáveis como idade, peso e dieta de um indivíduo. A PTGO consiste na determinação da glicémia em jejum e 2 horas após a ingestão de 75 gramas de glucose sendo o teste mais usado atualmente como auxiliar de diagnóstico da diabetes.

Metodologia: A hexocinase catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para a glicose, formando ADP e glucose-6-fosfato. A G-6-P é oxidada a 6-fosfogluconato com a redução de NAD a NADH, pela ação da G-6-PDH. (Abbot Diagnostics, 2009)

Amostra: Soro

Valores de referência: 70-105 mg/dL

2.1.2 HbA1c (Hemoglobina Glicosilada)

A determinação da Hemoglobina é aceite como um método de controlo da glicose a longo prazo em doentes com diabetes mellitus, pois fornece informação importante para a monitorização terapêutica durante o tratamento desta patologia. O tratamento da doença a longo prazo mostra a importância do controlo dos níveis sanguíneos de glicose na prevenção das complicações agudas da cetose e da hiperglicémia. A hemoglobina ao ser analisada cromatograficamente mostra ser fracionada em HbA1a, HbA1b e HbA1c, sendo esta última a mais abundante. O processo de conversão de hemoglobina A em hemoglobina A1c depende da concentração sanguínea da glicose. Dado que o tempo de vida média de um eritrócito é de 120 dias, a determinação da hemoglobina A1c pode refletir a concentração sanguínea média diária de glicose ao longo dos dois meses e fornece indicação muito mais fiável do controlo da glicémia que as determinações de glicose no sangue ou na urina. Níveis elevados de HbA1c indicam a necessidade de um tratamento mais agressivo da glicémia (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Amostra: Sangue total (colhida em tubos com EDTA)

Metodologia: 1ml de reagente hemolisante adicionado a 25 ul de sangue total. De seguida, calcula-se a % de HbA1c no Synchron CX4. O reagente de HbA1c é utilizado para determinar a concentração total de hemoglobina por colorimetria. O sistema SYNCRON CX distribui automaticamente a amostra e os volumes de reagente apropriados na cuvete. É monitorizada a variação da absorvância a 410 nanómetros. A variação de absorvância é diretamente proporcional à concentração total de hemoglobina na amostra e é utilizada pelo Sistema para calcular e exprimir a concentração de hemoglobina total.

O reagente A1c é utilizado para medir a concentração de HbA1c através de um método de imunoinibição turbidimétrica. Durante a reação os anticorpos da hemoglobina A1c combinam-se com a hemoglobina A1c da amostra para formarem complexos antigénio-anticorpo solúveis.

Valores de referência: 4,6%- 6,2%

2.2 Lípidos

2.2.1 Colesterol Total

O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um componente essencial das membranas celulares e lipoproteínas. Endogenamente é sintetizado pelo fígado e outros tecidos, sendo uma pequena parte derivado da dieta. É igualmente, um precursor da síntese de hormonas esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D.

Clinicamente: As determinações de colesterol são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças ateroscleróticas das artérias coronárias. As determinações de colesterol são também utilizadas no diagnóstico de doenças metabólicas que envolvem lípidos e lipoproteínas. As concentrações totais de colesterol sérico dependem de muitos fatores como a idade, sexo, dieta, atividade física, doenças hepáticas e outras doenças metabólicas (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Amostra: Soro humano, em jejum.

Metodologia: O reagente CHOL é usado para medir a concentração de colesterol através de um método de ponto final de tempo fixo. Na reação, a colesterol esterase (CE) hidrolisa ésteres de colesterol a colesterol livre e ácidos gordos. O colesterol livre é oxidado a colesteno-3 e peróxido de hidrogénio pela colesterol oxidase (CO). A peroxidase catalisa a reação do peróxido de hidrogénio com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e fenol, para produzir um produto corado de quinona-imina.

Ter em atenção as interferências tais como: A hemólise e a hiperbilirrubinémia.

Valores de referência: (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

- a) Baixo risco: <200 mg/dL
- b) Risco limite : 201 a 239 mg/dL
- c) Risco elevado : igual ou > 240 mg/dL

2.2.2 Colesterol-HDL

O HDL é o responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, é considerado um protetor cardiovascular. Assim, dentro do intervalo de referência, os valores elevados são considerados benéficos para o organismo.

A determinação dos níveis séricos de colesterol HDL constitui um valioso parâmetro para a identificação de doentes de alto risco de doença cardíaca coronária. Tudo isto depende das diversas classes destas lipoproteínas: quilomicrons, VLDL, LDL e HDL.

Clinicamente: O colesterol HDL está inversamente relacionado com o risco de aparecimento de doenças das artérias coronárias. Uma baixa relação colesterol HDL/LDL está diretamente relacionada com o risco de aparecimento de doenças das artérias coronárias. Um nível elevado de colesterol HDL está associado ao síndrome da “longevidade” (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Metodologia: É um ensaio homogêneo que não requer quaisquer passos off-line de pré-tratamento ou centrifugação. O método depende de um único detergente que solubiliza apenas as partículas de lipoproteínas-HDL e liberta colesterol-HDL, o qual reage com a colesterol esterase e a colesterol oxidase na presença de substâncias cromogénicas, produzindo um produto corado. O mesmo detergente inibe também a reação das enzimas de colesterol com as lipoproteínas- LDL, VLDL e quilomicrons. Um polianião contido no reagente aumenta a seletividade para o ensaio de colesterol-HDL complexando as lipoproteínas-LDL, VLDL e quilomicrons.

Amostra e valores de referência: Soro/plasma

Baixo risco cardiovascular > ou igual a 60 mg/dl

Elevado risco cardiovascular < 40 mg/dl

2.2.3 Colesterol-LDL

As lipoproteínas de baixa densidade são os principais transportadores de ésteres de colesterol do fígado aos tecidos periféricos. As LDL são conhecidas como o mau colesterol, pois estão implicadas na formação das placas de aterosclerose e consequente doença cardiovascular. Esta determinação é feita através da fórmula de Friedwald: $Colesterol\ LDL = Colesterol\ total - \left(\frac{Triglicéridos}{5} + Colesterol\ HLD\right)$, utilizada sempre que o valor de triglicéridos não ultrapassar os 400 mg/dl, para se obter um resultado válido. O colesterol VLDL corresponde a um quinto da concentração de triglicéridos (Tietz, 2009).

2.2.4 Triglicéridos

Na alimentação humana, os triglicéridos são os ésteres de glicerol com uma maior prevalência, constituindo 95% de reservas tecidulares lipídicas. Após a absorção no intestino, os triglicéridos são resintetizados nas células epiteliais intestinais e combinados com colesterol e apolipoproteína B formam quilomicrons.

O ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa de triglicéridos é feito no soro e plasma humanos.

Clinicamente: A avaliação dos triglicéridos deve ser feita em conjunto com o colesterol e as outras lipoproteínas, pois é a integração de todos estes parâmetros que se torna importante no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares.

Existem ainda doenças genéticas, como a hipertrigliceridemia familiar, em que os triglicéridos chegam a atingir 10x o seu valor normal, e que, por isso, devem ser monitorizados frequentemente.

A determinação de triglicéridos são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doentes com diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática e de outras doenças

relacionadas com o metabolismo dos lípidos, bem como de diversas patologias endócrinas.

Metodologia: O reagente para triglicéridos GPO é utilizado para determinar a concentração de triglicéridos através de um método de ponto final de tempo fixo. Os triglicéridos presentes na amostra são hidrolisados a glicerol e ácidos gordos livres por ação da lipase. Uma sequência de três passos enzimáticos acoplados que utilizam glicerol cinase (GK), glicerolfosfato oxidase (GPO) e peroxidase de rábano (HPO) causa o acoplamento oxidativo do ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfónico (DHBS) com a 4-aminoantipirina para formar um produto corado de quinonaimina.

Valores de referência (Risco cardiovascular):

- a) Normal <150 mg/dl
- b) Valor limitrofe elevado 150 a 199 mg/dl
- c) Elevado 200 a 500 mg/dl
- d) Muito elevado > 500 mg/dl

2.3 Compostos Nitrogenados Proteicos

2.3.1 Proteínas Totais

Clinicamente: O doseamento das proteínas totais é utilizado no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como perturbações ósseas e nutricionais.

As proteínas totais são também doseadas e aparecem aumentadas, diminuídas ou normais consoante a patologia em causa. Podemos ter síndromas nefróticos, infeções agudas, cirroses hepáticas, gamopatias, anemia por deficiência de ferro, entre outras. As proteínas totais no soro aparecem diminuídas em relação à urina onde surgem sempre mais aumentadas.

Amostra: Soro

Metodologia: Químico baseado na reação do biureto. O reagente TP é utilizado para medir a concentração de proteína total através de um método de biureto de ponto final temporizado. Durante a reação, as ligações peptídicas na amostra de proteína ligam-se aos íons cúpricos num meio alcalino para formar complexos de péptidos/cobre coloridos.

Valores de referência:

Adultos: 6,4 a 8,3 g/dL

2.3.2 Proteína C Reativa (PCR)

A PCR é uma glicoproteína produzida durante a inflamação aguda ou a destruição dos tecidos. É uma das proteínas de fase aguda, produzida pelo fígado, que aumenta significativamente em resposta a estímulos inflamatórios. É utilizada como auxiliar de diagnóstico, controlo terapêutico e acompanhamento de diversas patologias, uma vez que é dos mais sensíveis e precoces indicadores de processos inflamatórios resultantes de infeções, carcinomas e necrose de tecidos.

A deteção de níveis de PCR muito mais baixos pode indicar um risco acrescido de doença coronária em doentes assintomáticos.

Clinicamente: As determinações da proteína-C-reativa têm utilidade na avaliação clínica dos estados de stress, traumatismo, infeções, inflamações e intervenções cirúrgicas.

Amostra: Soro

Metodologia: S reagente de CRP é utilizado para determinar a concentração de proteína-c-reativa por turbidimetria. Durante a reação a proteína-c-reativa combina-se com um anticorpo específico para formar complexos insolúveis de antigénio-anticorpo.

Valores de referência: < 1,0 mg/dL

2.3.3 Albumina Sérica

Esta é a proteína principal do soro em pessoas normais. Níveis muito elevados da albumina resultam da desidratação, enquanto que níveis mais baixos desta proteína ocorrem em diversas patologias como doença renal, hepática, má absorção, desnutrição, queimaduras graves, infeções e cancro.

Clinicamente: As determinações de albumina são utilizadas no tratamento de muitas doenças que afetam sobretudo os rins e/ou o fígado.

Metodologia: O reagente ALB é utilizado para medir a concentração de albumina através de um método de ponto final temporizado. Durante a reação, a albumina combina-se com o bromocresol púrpura (BCP) para formar o produto final.

Amostra : Soro

Intervalos de referência: 3,5- 5,0 g/dL

2.3.4 Microalbuminúria

O rim é o primeiro órgão em falência, então esta prova é de grande importância visto que vai dosear pequenas quantidades de albumina no rim, que passa a mais do que devia. É uma análise feita na urina, extremamente sensível, dando por isso um bom diagnóstico. A microalbuminúria, é assim, definida como um aumento da excreção urinária de albumina acima do valor de referência para indivíduos não diabéticos, mas não detetável noutros testes para a determinação de proteína urinária. A microalbuminúria é agora considerada um importante fator indicador do declínio da função renal em utentes/clientes diabéticos. Então, clinicamente é um excelente auxiliar no diagnóstico de disfunções renais.

Amostra: Colheita de urina das 24h

Metodologia: O reagente de MA é utilizado para determinar a concentração de albumina por turbidimetria. Durante a reação a albumina combina-se com um

anticorpo específico para formar complexos insolúveis de antígeno-anticorpo. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência: Os níveis normais de albumina, microalbuminúria e macroalbuminúria são, respetivamente de: <30 mg/24h; 30-300 mg/24h; > 300mg/24h.

2.4 Compostos Nitrogenados Não Proteicos

2.4.1 Ácido úrico

O ácido úrico é o produto principal do catabolismo de purinas no ser humano, e é formado a partir da xantina sob a ação da xantina-oxidase. A maior parte da formação do ácido úrico ocorre no fígado e é eliminado através dos rins. A reserva de ácido úrico no organismo é determinada pela diferença entre a síntese e a eliminação.

A Gota é uma patologia com origem na hiperuricemia, podendo esta última estar relacionada para além da gota com casos de leucemia, disfunção renal, diabetes, hipotiroidismo e algumas doenças genéticas. Níveis baixos de ácido úrico são observados na Doença de Wilson.

Amostras: Soro e urina; na urina usar a urina de 24h.

Metodologia: O reagente de URIC é utilizado para determinar a concentração de ácido úrico através de um método de ponto final de tempo fixo. O ácido úrico é oxidado pela uricase, produzindo a alantoína e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio reage com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfonato (DCHBS), numa reação catalisada pela peroxidase, produzindo um produto corado. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

Soro/ Plasma- 2,6 a 7,2 mg/dL

Urina- 250-750 mg/24h

2.4.2 Ureia

A ureia é o produto metabólico nitrogenado existente em maior quantidade no organismo, proveniente do catabolismo proteico. A biossíntese da ureia a partir da amónia derivada de aminoácidos é feita exclusivamente a nível hepático no ciclo da ureia. A ureia quando apresenta pequenos aumentos não tem grande significado a nível renal, mas se se apresentar valores aumentados pode tratar-se de três tipos de causa: pré renais, renais e pós renais. Quanto às primeiras, relacionadas com uma deficiência na perfusão renal, uma vez que ocorre a diminuição do fluxo de urina com um aumento da reabsorção tubular. Também se observa um aumento dos níveis plasmáticos de ureia quando há ingestão de dietas ricas em proteínas ou, como resultado do aumento do catabolismo proteico devido, por exemplo, a traumatismos. As causas renais onde há insuficiência renal aguda ou crónica com diminuição da filtração glomerular. Há um aumento dos níveis plasmáticos de ureia até estes igualarem a quantidade excretada na urina, ou continuam a aumentar quando há uma insuficiência renal completa. Referindo-me agora às causas pós renais ocorrem quando há uma obstrução do fluxo de urina que pode acontecer a diferentes níveis (uréter, bexiga ou uretra) e devido a várias causas (ex.: pedras no rim, prostatites, cancro geniturinário). Contrariamente, os níveis de ureia podem estar diminuídos na hepatopatia grave e, por vezes, no final da gravidez.

Clinicamente: As determinações de azoto ureico/ácido úrico são utilizadas no diagnóstico e tratamento de certas doenças renais e metabólicas.

Amostra: Soro ou urina; urina preferencialmente das 24h (Tietz NW, 1995)

Metodologia: O reagente de UREA é utilizado para medir a concentração de azoto ureico através de um método de cinética enzimática. Durante a reação, a ureia é hidrolisada pela urease a amoníaco e dióxido de carbono. A glutamato desidrogenase (GLDH) catalisa a condensação de amoníaco e de alfa-cetoglutarato a glutamato, com a concomitante oxidação da forma reduzida do dinucleótido de beta-nicotinamida adenina (NADP) a dinucleótido de beta- nicotinamida adenina

(NAD). (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

Soro: 15-38 mg/dL

Urina: 26-43 g/24h

2.4.3 Creatinina e Clearance da Creatinina

A creatinina está presente em quase todos os fluidos corporais e é filtrada livremente pelo glomérulo. Posteriormente, não sofre reabsorção pelos túbulos renais e sofre uma pequena, mas significativa, secreção tubular. Este fato faz com que a creatinina seja um analito de eleição para a avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG) e da função renal.

Amostras: Soro e urina

Metodologia: Cinético colorimétrico- Jaffe modificado. Num pH alcalino, a creatinina reage com o picrato e forma o complexo creatinina-picrato. A taxa de aumento da absorvância a 500 nanómetros em consequência da formação deste complexo corado. É diretamente proporcional à concentração de creatinina presente na amostra.

Valores de referência:

Soro: Homens: 0,7 - 1,3 mg/dL

Mulheres: 0,5 – 1,0 mg/dL

Urina: Homens: 21 – 26 mg/Kg peso/24h

Mulheres: 16 – 22mg/Kg peso/24h

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

A Clearance da Creatinina é o marcador mais preciso da TFG e o método mais sensível para a detecção de disfunção renal do que o doseamento da creatinina plasmática. Esta prova, tem os mesmos interferentes do doseamento plasmático, mas são mais reduzidos ou anulados, uma vez que a recolha da urina é feita em 24 horas. A depuração ou clearance da creatinina tem sido considerada uma das provas mais sensíveis disponíveis para indicar a presença de insuficiência renal, devido à rápida queda dos seus valores. Uma diminuição do seu valor abaixo dos valores de referência será indicativo de uma diminuição da TFG e consequentes lesões renais.

Valores abaixo de 10 ml/min indicam a necessidade de diálise.

Clearance da creatinina = $\frac{\text{Creatinina Urinária (mg/dl)}}{\text{Creatinina Sérica (mg/dl)}} \times \text{Volume urina de 24h (ml)}/1440$
(min)

Valores de referência:

Homens: 97 – 137 mL/minuto/1,73m²

Mulheres: 88 – 128 mL/minuto/1,73m²

2.5 Enzimas

2.5.1 AST /GOT

A Aspartato Aminotransferase sérica é uma enzima encontrada em vários órgãos e tecidos, incluindo o fígado, o coração, o músculo-esquelético e os eritrócitos.

Clinicamente: No diagnóstico e tratamento de certos tipos de doenças hepáticas e cardíacos.

Amostra: Soro

Metodologia: O reagente AST é utilizado para medir a atividade do aspartato aminotransferase através de um método de classificação enzimático. Durante a

reação, o aspartato aminotransferase catalisa a transaminação reversível do L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato é então reduzido a malato na presença de malato desidrogenase (MDH) com a oxidação simultânea de beta-nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) reduzido em beta-nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência: 10-42 UI/L

2.5.2 ALT /GPT

A Alanina Aminotransferase sérica é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, porém com quantidades moderadas no rim e pequenas quantidades no coração e no músculo-esquelético. Em, geral, a maior parte do aumento da ALT deve-se à presença de uma doença hepática, embora a ocorrência de graus significativos de lesão tecidual nos outros órgãos mencionados também possa afetar os níveis séricos. Na maioria das vezes a ALT tem maior atividade que a AST, mas há exceções a referir: como a hepatite alcoólica; a cirrose hepática; o cancro hepático. Nas hepatites virais e outras formas de necrose hepática, os valores destas enzimas elevam-se antes dos sinais clínicos e do aparecimento de sintomas. A atividade das enzimas pode ser bastante elevada, chegando a alcançar valores de 100 vezes maiores ou mais que o referido valor de referência. Quando a persistência da ALT se prolonga por mais de 6 meses após um episódio de hepatite aguda é usada para diagnosticar uma hepatite crónica. Na colestase extra-hepática, a concentração de transaminases é elevada, sendo maior do que a obstrução crónica (Tietz analytes, 2009). Na cirrose, a concentração varia consoante o estado do processo e, pode atingir um máximo de 45 vezes o limite máximo de referência, com um ratio AST/ALT superior a 1. Este ratio pode refletir o grau de fibrose nestes pacientes.

No cancro hepático, aumentam as duas enzimas sendo a AST mais elevada do que a ALT. Podem ser encontradas ligeiras alterações nos valores das enzimas concomitantes com a administração de medicamentos.

A ALT é uma enzima mais específica do fígado, pelo que os seus valores elevados são geralmente observados em doenças hepáticas parenquimatosas. No caso de

uma elevação isolada da AST, podemos estar perante um enfarte do miocárdio, pois esta enzima tem uma concentração elevada no músculo cardíaco. No entanto, também pode aparecer em distrofias musculares e dermatomiosite. Nas patologias do músculo-esquelético estriado, a CK também está aumentada.

Amostra: Soro (os eritrócitos têm aproximadamente 3 a 5 vezes mais ALT do que o soro. Portanto a hemólise no soro pode aumentar os resultados do teste).

Metologia: O reagente de ALT é utilizado para determinar a atividade do analito através de um método cinético. Durante a reação, a alanina aminotransferase catalisa a transaminação reversível da L-alanina e do alfa cetoglutarato a piruvato e L-glutamato. Em seguida, o piruvato é reduzido a lactato na presença de lactato desidrogenase (LDH), com a correspondente oxidação do dinucleótido de beta-nicotinamida adenina reduzido (NADH) a dinucleótido de beta-nicotinamida adenina (NAD).

Valores de referência: 10-40 UI/L

2.5.3 Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é constituída por um grupo de enzimas estritamente relacionadas e com atividade máxima em pH 10. A atividade da ALP está presente na maioria dos órgãos e está associada a membranas e superfícies celulares localizadas na mucosa do intestino delgado e túbulos contornados proximais do rim, ossos (osteoblastos), fígado e placenta.

Clinicamente: As determinações de fosfatase alcalina são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, ósseas, da paratiróide e intestinais.

O doseamento da ALP tem um interesse particular na investigação de duas patologias: a doença hepatobiliar e a doença óssea associada a aumento de atividade de osteoblastos. Quanto à doença hepatobiliar, esta enzima mostra-se especialmente sensível à obstrução do trato biliar, de caráter intra- ou extra-hepática. O seu aumento reflete o grau de obstrução e o nível de tecido biliar

afetado. O aumento do resultado tende a ser maior no caso de obstrução extra-hepática (pedras na vesícula ou cancro da cabeça do pâncreas) do que na intra-hepática. Uma elevação de valores semelhante ao anterior pode surgir no cancro hepático avançado ou em metástases hepáticas. Lesões parenquimatosas, como na hepatite infecciosa, refletem apenas um ligeiro aumento de resultados ou, resultados normais. No segundo caso, a doença óssea, podemos estar perante um tumor metastizante com reação osteoblástica ou a Doença de Paget. Esta enzima também apresenta aumentos de atividade nalgumas situações fisiológicas como o crescimento e a gravidez (Tietz, 2009).

Amostra: Soro

Metodologia: O reagente de ALP é utilizado para determinar a atividade da fosfatase alcalina por um método cinético utilizando um tampão de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). Durante a reação, a fosfatase alcalina catalisa a hidrólise do substrato incolor de éster orgânico fosfatado, p-nitrofenilfosfato, para dar o produto corado amarelo, p-nitrofenol e fosfato. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX-ficha de informação química, 2010).

Valores de referência: 5-1000 UI/L

2.5.4 Gama-glutamil transferase (-GT)

A Gama GT pertence a um grupo de peptidases que catalisam a transferência de aminoácidos de um péptido para outro atuando, assim, como transferases de aa. A GT existe em todas as células do organismo, exceto nos músculos. A enzima existente no soro parece ter essencialmente origem no sistema hepatobiliar. O aumento da atividade de GGT parece ser um marcador sensível de doença hepatobiliar. Tal como a ALP, a GGT apresenta valores bastante elevados quando está na presença de uma obstrução intra ou pós-hepática. O seu aumento aparece em doentes com hepatite infecciosa, fígado gordo e com a toma de fármacos anticonvulsivos. Em doentes com cirrose alcoólica e na maioria dos doentes que consomem grandes quantidades de álcool, a GGT encontra-se elevada, desempenhando um papel importante na deteção do alcoolismo e monitorização de

patologias. Ao contrário da ALP, a GGT não está aumentada em situações patológicas de caráter ósseo. No enfarte do miocárdio, esta enzima apresenta-se normal. No entanto, um aumento pode ocorrer ao fim do 4º dia e implica normalmente lesão hepática secundária (Abbot Diagnostics, 2009).

Clinicamente: As determinações de γ - glutamil transferase são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas como a cirrose alcoólica e tumores primários e secundários do fígado.

Amostra: Soro.

Metodologia: O reagente de GGT é utilizado para determinar a atividade da GGT através de um método de cinética enzimática. Na reação, a γ -glutamil transferase catalisa a transferência de um grupo gama-glutamilo do substrato incolor, a γ -glutamil-p-nitroanilina, para o aceitador, a glicilglicina, com produção de um produto corado, a p-nitroanilina.

Valores de referência: 5-750 UI/L

2.5.5 Creatina Cinase (CK)

A CK é um dímero composto por subunidades M-músculo e/ou B-cérebro que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CKMB e CK-BB. Estes catalisam a fosforilação reversível da creatina por ATP. A atividade da CK é maior no músculo estriado e no coração, apresentando uma atividade menor nos outros tecidos, como o cérebro, trato GI e bexiga. O valor sérico da CK está muito aumentado em todos os tipos de distrofia muscular (ex.: Poliomiosite). A atividade da CK aumenta após danos no miocárdio, com aumento significativo das frações MM e MB. No diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio, faz-se a análise desta enzima com a Troponina I, Troponina T, CK-MB, GOT, LDH e mioglobina. Na rotina a CK é muito pedida, uma vez, que os doentes diabéticos tomam muita civastatina que altera o músculo. A CK juntamente com as transaminases determina a toma deste medicamento.

Clinicamente: As determinações de CK e das respectivas isoenzimas são utilizadas no diagnóstico e tratamento do enfarte do miocárdio e de doenças musculares como a distrofia muscular progressiva do tipo de distrofia de Duchenne.

Amostra: Soro; as amostras que apresentam um nível moderado a elevado de hemólise podem afetar o ensaio da CK.

Metodologia: O reagente de CK é utilizado para determinar a atividade de CK através de um método de cinética enzimática. Na reação, a creatina cinase catalisa a transferência de um grupo fosfato do substrato creatina fosfato para o difosfato de adenosina (ADP). A formação subsequente de trifosfato de adenosina (ATP) é medida através da utilização de duas reações acopladas, catalisadas por hexocinase (HK) e pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), com a consequente produção de dinucleótido de beta- nicotinamida adenina reduzido (NADH) a partir de dinucleótido de beta- nicotinamida adenina (NAD). O ensaio de CK contém o ativador monotioglicerol. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

- a) Indivíduo do sexo masculino 38-174 UI/L
- b) Indivíduo do sexo feminino 26-140 UI/L

2.5.6 LDH (Lactato Desidrogenase)

A LDH do soro consiste na atividade de 5 isoenzimas, LDH-1 a LDH-5, e encontra-se distribuída por todo o corpo daí ser relevante no diagnóstico do enfarte do miocárdio, da anemia hemolítica, etc. O papel principal do LDH total consiste na deteção de lesões reduzidas no tecido. A LDH aparece elevada em hepatites, nefrites glomerulares, embolismo pulmonar, doenças musculares e em muitas leucemias e linfomas.

Como a LDH é um marcador não específico é usado em combinação com outros marcadores em diagnósticos e na gestão dos doentes.

Clinicamente: As determinações de lactato desidrogenase são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, tais como a hepatite viral aguda, a cirrose e o carcinoma hepático metastizado, de doenças cardíacas como o enfarte do miocárdio e de tumores dos pulmões ou dos rins.

Amostra: Soro

Metodologia: O reagente de LDH é utilizado para determinar a atividade da lactato desidrogenase através de um método enzimático cinético. Durante a reação o LDH catalisa a redução reversível de piruvato a L-lactato, com a correspondente oxidação do dinucleótido de beta- nicotinamida adenina reduzido (NADH) a dinucleótido de beta-nicotinamida adenina (NAD). (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Intervalo de referência: 266-500 UI/L

2.5.7 Amilase

A amilase é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa a hidrólise de ligação 1,4-glucosídicas em polissacáridos. Esta enzima encontra-se num grande número de tecidos e órgãos. A maior concentração é nas glândulas salivares (tipo-S), e no pâncreas (tipo-P) produzida pelas células acinares. (Tietz, 2009)

A amilase sérica é normalmente baixa, aumentando drasticamente: na pancreatite aguda primária ou pancreatite crónica recidivantes, colecistite, litíase, tumor, úlcera gastroduodenal, peritonite, entre outros.

A amilase urinária pode ser útil na confirmação de valores séricos, ou quando os valores estão normais. Em geral, a amilasúria aumenta 24 horas após a amilase sérica e, permanece alterada durante 7- 10 dias, após a normalização dos valores séricos. A amilase sérica é rapidamente eliminada pelos rins, pelo que as doenças que afetam o pâncreas fazem aumentar os níveis urinários da enzima. A amilasúria é sensível para a doença hepática, mas não é específica. Para maior informação

deve-se comparar a razão amilásúria/clearance da creatinina. Uma razão superior a 5% indica uma pancreatite e uma inferior aponta para outras causas. (Tietz, 2009).

Amostras: Soro e urina; na urina conservar amostras aleatórias ou de 24h sem adição de conservantes.

Metodologia: Substrato de CNPG3.

A alfa-amilase hidrolisa o 2-cloro-4-nitrofenil-alfa-D-maltotriosido (CNPG3) para libertar o 2-cloro-4-nitrofenol (CPNP) e formar 2-cloro-4-nitrofenil-alfa-D-maltosido (CNPG2), maltotriose e glicose. A taxa de formação de 2-cloro-4-nitrofenol pode ser detetada por espectrofotometria a 404 nm para fornecer uma quantificação direta da atividade da alfa-amilase na amostra. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX-ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

Soro/Plasma: 28 – 100 U/L

Urina Amostras de 24h: 1 a 17 U/hora

Nota: cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência com base nas características locais e populacionais.

2.6 Bilirrubinas

2.6.1 Bilirrubina Total

A bilirrubina é um pigmento amarelo-alaranjado derivado da destruição eritrocitária, conjugado no fígado e excretado na bÍlis e na urina. Esta molécula provém da degradação do heme, da mioglobina e de citocromos. Esta proteína insolúvel no plasma é transportada ligada à albumina até aos hepatócitos. AÍ é conjugada com o ácido glucorónico tornando-a hidrossolúvel. A sua libertação posterior no intestino serve para saponificar as gorduras. A bilirrubina total é a soma das fracções conjugadas e não conjugadas.

Clinicamente: As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas hemolíticas, hematológicas e metabólicas, incluindo hepatite e bloqueio da vesícula biliar.

O seu doseamento tem interesse no estudo de doentes ictericos em que está associada uma hiperbilirrubinemia. Este aumento de bilirrubina pode ocorrer por causas pré-hepáticas que existem quando há uma produção exagerada de bilirrubina que se traduz por um aumento da sua forma não conjugada. É uma alteração que está presente em todas as formas de anemias hemolíticas. A Hiperbilirrubinemia hepatocelular surge em várias situações, nomeadamente, com um uptake hepático anormal de bilirrubina (ex.: Síndrome de Gilbert, hepatite ou cirrose), com uma conjugação de bilirrubina ineficiente (ex.: Recém-nascidos prematuros, Síndrome de Gilbert e de Crigler-Najjar), uma secreção anormal de bilirrubina na bÍlis (ex.: Síndromas de Rotor e Dubin-Johnson, lesão hepatocelular generalizada). Todas estas situações traduzem um aumento das duas formas (conjugada e não conjugada) de bilirrubina. Quanto à Hiperbilirrubinemia colestática: a obstrução do fluxo da bÍlis tanto pode ser intra como extra-hepática e, ambas, traduzem-se num aumento da forma conjugada de bilirrubina.

Amostra: Soro; amostras protegidas da luz uma vez que a bilirrubina é fotolábil

Metodologia: O reagente de TBIL é utilizado para determinar a concentração de bilirrubina total através de um método de diazo de ponto final de tempo fixo. Na reação, a bilirrubina reage com o reagente diazo na presença de cafeína, benzoato e acetato como aceleradores para formar azobilirrubina. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência: 0,2 a 1,0 mg/dL

2.6.2 Bilirrubina Direta

Clinicamente: As determinações de bilirrubina direta são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, hemolíticas, hematológicas e metabólicas, incluindo hepatite e bloqueio da vesícula biliar.

Amostra: Soro sem hemólise ou lipémia visíveis, as amostras sempre protegidas

Metodologia: O reagente de DBIL é utilizado para determinar a concentração de bilirrubina direta através de um método diazo de ponto final de tempo fixo. Na reação a DBIL combina-se com a espécie diazo para formar azobilirrubina.

Valores de referência: 0,0 a 0,2 mg/dL

2.6.3 Bilirrubina Indireta

Esta fração de bilirrubina é denominada de bilirrubina indireta ou não conjugada. No fígado conjuga-se com o ácido glucurónico para formar a bilirrubina conjugada. Esta é excretada do sistema biliar para o intestino, onde é metabolizada pelas bactérias a um grupo de produtos conhecidos que são os pigmentos. Uma parte é reabsorvida pela circulação enterohepática, entra na circulação sanguínea e é eliminada na urina sob a forma de urobilinogénio, que dá a cor característica da urina.

Esta aumenta quando estamos perante situações de hemorragia graves, na doença de Gilbert ou em hemólise acentuada.

Amostra: Soro

Metodologia: Diferença entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta

2.7 Iões

O **Spotlyte Na⁺/K⁺/Cl⁻** faz o doseamento do sódio, do potássio e dos cloretos.



Fig. 9 – Spotlyte Na⁺/K⁺/Cl⁻

Amostra: soro e a urina. No soro, no ensaio de potássio não podem ser utilizadas amostras hemolisadas. Na urina das 24h ou a primeira da manhã, colher amostras de 24h sem adicionar conservantes. (Burtis CA, 1999)

Muitos medicamentos e estados patológicos causam desequilíbrios eletrolíticos temporários no organismo, uma vez que, não há quase processos metabólicos que não dependam ou não sejam afetados por eletrólitos. Torna-se, portanto, necessário integrar na terapêutica do doente um controlo frequente desses eletrólitos.

Metodologia: O aparelho tem três elétrodos com afinidade para os referidos iões. O potencial de cada elétrodo é medido em relação a uma voltagem fixa de um elétrodo de referência (elétrodo de prata). Cada elétrodo desenvolve uma voltagem que varia com a concentração do ião correspondente. A relação entre as voltagens desenvolvidas e as concentrações dos iões é determinada por uma fórmula já existente em memória, no aparelho. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a Equação de Nernst para um ião específico. Quando comparado com uma referência interna, este potencial elétrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões da amostra. Em alternativa a este método temos a Fotometria de Chama.

2.7.1 Sódio

a) Sódio Sérico

É o principal catião extracelular, pois dele depende o fluido extracelular. A diminuição de sódio pode ser devida à utilização de diuréticos, mas está frequentemente associado a situações de desidratação extrema. Fora dos valores normais podemos ter uma hiponatrémia ou hipernatrémia. Na hiponatrémia pode haver uma depleção de sódio e água, por défice, uma perda metabólica. Temos também o caso da hiponatrémia dilucional em que ocorre um excesso de água, uma hipoalbuminémia, cirrose, síndrome nefrótica, insuficiência renal aguda com oligúria.

Existe também a possibilidade de ocorrência de SIADH – Síndrome de secreção inapropriada de hormona antidiurética; perda Intracelular, uma falsa hiponatrémia, triglicéridos altos, proteinémia alta e uma glicémia alta – grave também são hipóteses.

No que concerne à hipernatrémia, a principal causa a é a desidratação, que pode ter como causa: a ingestão insuficiente de água, um débito renal excessivo de água (ex.: Diabetes Insípida), um débito excessivo de água pela pele, um débito excessivo do trato GI, uma sobredosagem de sódio ou uma alimentação com alto teor de sódio.

b) Sódio Urinário

A sua determinação na urina é feita para explorar as causas de hiponatrémia. Normalmente o rim tenta conservar o sódio, de modo que a sua excreção é baixa (<20 mmol/l, geralmente <10 mmol/l na primeira urina da manhã). Caso o doente tenha hiponatrémia e a concentração de sódio esteja elevado na urina, então estamos perante uma perda inadequada pelo rim: Insuficiência Renal Crónica ou Aguda, devido a diuréticos, Doença de Addison ou Síndrome de SIADH (Tietz, 2009). Por isso, quando temos um sódio urinário baixo, a hiponatrémia deve-se a causas extra-renais.

2.7.2 Potássio

a) Potássio sérico

Este é o catião mais abundante logo a seguir ao sódio e o mais importante intracelularmente na regulação da excitabilidade neuromuscular, contração cardíaca, no volume de fluido intracelular e na concentração de H^+ . A sua determinação é muito importante nalguns tipos de patologias. A alteração da homeostase do potássio trás sérias consequências a vários níveis: cardíaco e cerebral. Os medicamentos diuréticos (hipotensores) diminuem os níveis de potássio e o potássio não convém estar abaixo de $3mEq$ (hipocaliémia), porque provoca problemas a nível cerebral. Por outro lado, nível acima de $6mEq$ (hipercaliémia) faz com que uma pessoa entre em falência cardíaca podendo inclusivamente levar à morte. Os grandes edemas aumentam o potássio no plasma eliminando, conseqüentemente, o líquido presente nos edemas. (Tietz, 2009).

b) Potássio urinário

Se o K^+ urinário for menor que 25 mmol/dia estamos perante uma perda extra-renal como: diarreia, fístula, sudorese excessiva, aporte insuficiente de potássio na dieta.

Se o K^+ urinário exceder os 25 mmol/dia há uma acidose metabólica (acidose tubular tipo I e II), uma necrose tubular aguda, uma toxicidade medicamentosa por Anfotericina B, entre outros.

Com o aumento da concentração de potássio tais como suplementos de K^+ , transfusão sanguínea, hemólise, necrose tecidual e doses elevadas de penicilina surge a oligúria.

Um fator a ter em conta é que o doseamento de potássio é que as amostras levemente hemolisadas conduzem geralmente a grandes alterações nos valores séricos de potássio, já que este é altamente afetado pela hemólise.

2.7.3 Cloretos

O cloro é o principal anião extracelular e intervém, entre outras funções na manutenção da pressão osmótica. Geralmente, os valores do cloro acompanham os do ião sódio. A determinação do cloro é importante como diagnóstico diferencial de desequilíbrios eletrolíticos. Quanto maiores as concentrações de Na^+ e Cl^- no soro maior a influência na tensão arterial. Quando estamos perante uma hipoclorémia quando temos uma acidose metabólica (falha renal e cetoacidose diabética), vômitos e secreção gástrica persistente (alcalose metabólica), diuréticos e SIADH. O cloro aparece diminuído no soro em várias doenças renais, como por exemplo nas nefrites e pielonefrites crónicas, em que há perda de sais.

Em situações de hiperclorémia temos um quadro de desidratação, acidose tubular renal, insuficiência renal aguda, acidose metabólica (diarreia prolongada e perda de bicarbonato), hiperfunção adrenocortical, hipomagnesémia, alcalose metabólica.

Valores de referência:

- Soro: a) Sódio 136-145 mmol/l
- b) Potássio 3.5-5.1 mmol/l
- c) Cloretos 98-107 mmol/l
- Urina: a) Sódio 40-220 mmol/dia
- b) Potássio 25-125 mmol/dia
- c) Cloretos 110-250 mmol/dia

No **Synchron Cx4** medem-se os restantes iões:

2.7.4 Magnésio

O magnésio, catião intracelular, tem um papel extremamente importante no metabolismo celular, participando ativamente em mecanismos como a fosforilação oxidativa, a glicólise e a replicação celular. Também é um cofator de muitas enzimas funcionando como substrato ativador ou desencadeador de várias reações.

Clinicamente: A determinação de magnésio é útil na avaliação de diversas doenças e afeições. Níveis elevados de magnésio estão associados a urémia, a desidratação, a acidose diabética, à Doença de Addison e à administração medicinal de magnésio como por exemplo, no tratamento da pré-eclâmpsia (hipertensão induzida pela gravidez). Níveis baixos de magnésio estão associados ao síndrome de malabsorção, pancreatite aguda, hipoparatiroidismo, alcoolismo crónico, glomerulonefrite crónica, aldosteronismo.

Amostra: Soro e urina. Soro: amostras não hemolisadas; urina: amostras de urina de 24h

Metodologia: O reagente de MG é utilizado para determinar a concentração de MG através de um método de ponto final de tempo fixo. Na reação o magnésio combina-se com a calmagite para formar um cromogénio estável. O produto forma-se rapidamente, fornecendo resultados reprodutíveis com um mínimo de interferências. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

Soro: 1,7-2,8 mg/Dl

Urina(24h): 72,9-121,5 mg/24h

2.7.5 Cálcio

É o elemento mineral mais abundante do organismo e participa em diversos processos fisiológicos como a coagulação, a condução neuromuscular e a consequente excitabilidade dos músculos esquelético e cardíaco, na prevenção e integridade da membrana celular e na mineralização do tecido ósseo. Apresenta-se em três estados fisiológicos no plasma: ionizado, ligado a proteínas plasmáticas e complexado com pequenos iões. O cálcio livre é a fração biologicamente ativa, sendo a sua concentração regulada pela PTH e a 1,25-dihidroxitamina D. Entre as causas da hipocalcémia podemos ter: uma hipoalbuminémia que traduz a causa mais frequente, esta condição pode ser devida a insuficiência hepática crónica, síndrome nefrótico, falha cardíaca congestiva e má nutrição. Inclui também a

insuficiência renal crónica – também comum devido à hipoproteinémia, hiperfosfatémia. Deparamo-nos com uma hipomagnesiémia, hipoparatiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, osteomalácia e raquitismo devido a deficiência ou resistência à vitamina D e pancreatite aguda.

A hipercalemia é muitas vezes encontrada, resultando do aumento do fluxo de cálcio para o fluido extracelular do esqueleto, intestino ou rins. Assim, quando a capacidade renal é excedida, desenvolve-se uma hipercalemia. As duas causas principais são: hiperparatiroidismo primário – devido a adenoma (80-85% dos casos), carcinoma das paratiroides, neoplasia da pituitária, pâncreas, tiróide e feocromatocitoma. Neoplasias com ou sem envolvimento esquelético, neoplasia hematológica coexistente com hiperparatiroidismo (Tietz, 2009).

Clinicamente: as medições de cálcio são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças da paratiroides, várias doenças ósseas, insuficiência renal crónica e tetania (contrações ou espasmos intermitentes dos músculos). A medição do cálcio urinário é utilizada em diagnósticos diferenciais de hipercalemia de “fuga renal”, como observado na acidose tubular renal.

Amostra: Soro e urina

Método: O reagente de Cálcio é utilizado para medir a concentração de cálcio através de um método de ponto final temporizado. Durante a reação, o cálcio combina-se com o Arsenazo III para formar um produto de cor púrpura-azulado. (Beckman Coulter, Sistemas SYNCRON CX- ficha de informação química, 2010).

Valores de referência:

Soro/ Plasma: 8,4-10,2 mg/dL

Urina: 100-300 mg/24h

2.7.6 Fósforo

O plasma contém fósforo inorgânico e orgânico, mas apenas o inorgânico é medido. O fósforo inorgânico é o componente principal da hidroxiapatite no osso e, por isso, desempenha um importante papel no suporte estrutural do corpo.

A maior parte do fósforo corporal é intracelular, constituindo o anião intracelular mais abundante. O metabolismo do fósforo está intimamente ligado ao cálcio. Fisiologicamente, quando o cálcio sobe no soro, o fósforo desce, sendo este controlo feito a nível renal.

A hipofosfatémia (<2.5 mg/dL) pode ter as seguintes causas: mudança do fósforo do fluido extracelular para o fluido intracelular (a causa mais comum de hipofosfatémia). A glucose oral ou endovenosa e as injeções de insulina também fazem diminuir a concentração plasmática de fósforo. A alcalose respiratória, conduz a um aumento de pH intracelular e a um aumento da glicólise, levando à entrada de fósforo para a célula.

Por sua vez, a hiperfosfatémia pode ser causada por: insuficiência renal, causa mais comum e pode ter origem na diminuição da taxa de filtração glomerular e aumento da reabsorção tubular. Temos também um aumento do aporte de fosfato na dieta, uma mudança de fósforo do fluido intracelular para o extracelular (Tietz, 2009).

Amostra: Soro e urina

Metodologia: O fosfato inorgânico reage com o molibdato de amónio para formar um complexo hétero-poli-ácido. A utilização de um surfactante elimina a necessidade de preparação de um filtrado livre de proteínas. A absorvância a 340 nm é diretamente proporcional ao nível de fósforo inorgânico presente na amostra. Os brancos de amostra têm de ser analisados para corrigir uma eventual absorvância inespecífica da amostra.

Valores de referência:

Soro- 2,3 a 4,7 mg/dl

Urina- 0,4 a 1,3 g/dia

2.7.7 Ferro Sérico

O ferro do organismo circula ligado à transferrina, formando a ferritina. Está presente nos fluídos biológicos como componente da hemoglobina e mioglobina, ligado à transferrina que atua como proteína de transporte. A hemocromatose e a doença hepática registam-se quando os valores da concentração de ferro estão elevados. Quando os valores aparecem baixos podem ser resultado de uma anemia, devido a uma má absorção ou elevado sangramento menstrual.

Amostra: Soro não hemolisado, como anticoagulante utilizar sais de heparina.

Metodologia: Determinação colorimétrica direta de ferro

Valores de referência:

Homens: 60 - 160 µg/dL

Mulheres: 40 - 145 µg/dL

2.8 Controlo de Qualidade no Laboratório de Bioquímica

2.8.1 Calibração

Todos os reagentes introduzidos de novo e durante a sua utilização têm que ser calibrados, utilizando padrões de concentração conhecida, cujos valores são previamente introduzidos no programa do autoanalisador. O tempo entre calibrações varia conforme os reagentes já que a sua estabilidade não é igual para todos. O programa deste aparelho permite saber diariamente quais as calibrações a efetuar. É com os fatores obtidos com a calibrações que as leituras das amostras são convertidas nos resultados finais.

2.8.2 Controlo de Qualidade Interno

Diariamente devem ser analisados pelo menos, dois níveis de material de controlo. Adicionalmente, estes controlos devem ser analisados com cada nova calibração, com cada novo cartucho de reagente e após manutenção específica ou procedimentos de resolução rápida dos problemas, conforme detalhado no manual do sistema adequado. A utilização mais frequente de controlos ou a utilização de controlos adicionais é deixada ao critério do utilizador, baseado nas Boas Práticas de Laboratório ou requisitos de acreditação do laboratório e legislação aplicável. Os valores de controlo têm que estar entre 2SD para a esquerda e para a direita, do valor médio que seria o valor ideal a obter. O controlo de qualidade interno é obrigatório, são guardadas as cartas de controlo que correspondem aos controlos internos dos diversos parâmetros durante cinco anos para posterior inspeção.

2.8.3 Controlo de Qualidade Externo

A avaliação externa é feita no INSA no sentido de otimizar as condições do trabalho laboratorial.

CONCLUSÕES

Durante o estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e através da aplicação prática dos conhecimentos que adquiri ao longo do Mestrado de Análises Clínicas consegui aprender a lidar com vários aspetos da vida real, ou seja, atingi a meta para uma validação final dos resultados analisados.

Durante este percurso foi fundamental o histórico de análises clínicas dos clientes/utentes, o modo de funcionamento de diversos aparelhos, o conhecimento prévio das técnicas e o manuseamento correto de todo o material, desde a fase de colheita de sangue, onde me iniciei, até à validação de resultados (fase pós-analítica).

Ao mesmo tempo foram tidos em conta fatores de carácter económico, como por exemplo como racionar o uso dos kits comerciais de acordo com o número de amostras que chegavam ao laboratório.

As análises clínicas são completamente imprescindíveis para diagnósticos de saúde, auxiliando os médicos na monitorização terapêutica das diferentes patologias.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbot Diagnostics. Manual de operação do Architect System. Folheto de Instruções para uso (reagentes). IL, USA, 2009.
2. Abbot Diagnostics. Manual de operação do equipamento ARCHITECT SYSTEM Equipamento-folheto de instruções de utilização de reagentes e kits. IL, USA. Clinical Chemistry, 2009.
3. Ault, A. Kenneth; Hillman, S. Robert, Hematology in Clinical Practice- A Guide to Diagnosis and Management, International Edition, 1995.
4. Carl A. Burtis; Edward R. Ashwood. Tietz- Fundamentals of Clinical Chemistry. 5ª Edição, 2009.
5. Dacie, V. Sir John; Lewis, S. M. Practical Haematology. 8ª Edition, 1995.
6. Failace, Renato. Hemograma: manual de interpretação. 3ª Edição, Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
7. Kalins, Rafael; Giglio, Auro; Princípios de Hematologia Clínic. 5ª Edição, 2007.
8. Ravel R. Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6ª Edição. Guanabara Koogan, 1995.
9. Theml, H. Color Atlas of Haemathology. 2ª Edição, 2004.

ANEXOS

1. Hematologia

1.1 Coloração de MayGrunwald-Giemsa

Os esfregaços de sangue periférico podem ser preparados, no momento da colheita, a partir de sangue total sem anticoagulante ou a partir de sangue com anticoagulante (EDTAK3).

A coloração May-Grünwald-Giemsa é uma coloração o tipo Romanowsky. Os dois componentes principais são o Azur B (Trimetiltionina) e Eosina Y (Tetrabromofluoresceína).

O Azur B liga-se a moléculas aniónicas, enquanto a Eosina Y liga-se aos sítios catiónicos proteicos. Assim, os ácidos nucleicos e proteínas têm afinidade para o corante básico – Azur B-, enquanto que o grupo de moléculas da hemoglobina tem afinidade para os corante ácidos sendo corados pela Eosina. Relativamente às granulações leucocitárias temos: as neutrofílicas levemente coradas pelo Azur, as basofílicas coradas fortemente pelo Azur, e as eosinofílicas coradas pela Eosina.

- 1º Fixação com metanol-3 minutos
- 2º Coloração com Maygrunwald-5 minutos
- 3º Coloração com Giemsa
- 4º Lavagem com água desionizada
- 5º Secar
- 6º Observar ao microscópio

1.2 Determinação de Grupos sanguíneos

I) Preparação das células de referência e células dos doentes

As células de referência têm um fenótipo conhecido. As células A1, A2, B e 0 são usadas na prova sérica, de determinação dos antígenos do sistema AB0. As células 0I e 0II e as 0I e 0II papainizadas são utilizadas na pesquisa de aloanticorpos e nos controlos do sistema Rh e Kell.

Antes da sua utilização as células devem ser lavadas 3 vezes em solução salina que é desperdiçada após a lavagem, na última lavagem deve ter-se especial atenção à decantação de modo a retirar a maior quantidade possível de solução salina para assim evitar a diluição de reagentes a adicionar posteriormente (AGH).

A centrifugação em cada lavagem deverá ser suficiente para fornecer um aglomerado celular firme e minimizar a perda de células na decantação (3 minutos a 3000 rpm).

As células A1, A2, B e 0 são diluídas e lavadas três vezes, para uma concentração de aproximadamente 1%, com uma solução de meio salino. Este procedimento serve para remover os eritrócitos lisados e os conservantes (antibióticos e nutrientes), adicionados às células para a sua conservação. Ficam assim prontas a serem usadas, nas 24 horas seguintes, sendo guardadas após o uso a 2-8°C.

As células 0I e 0II são submetidas ao mesmo procedimento das anteriores.

As células 0I e 0II papainizadas têm de ser preparadas todos os dias, a partir das células 0I e 0II. Estas células são incubadas com papaína diluída, na proporção de uma parte para nove partes de tampão fosfato (pH 7,0) durante 12 minutos (tempo necessário para a papaína reagir) a 37°C. Após esse período as células são lavadas e diluídas, tal como as anteriores. A acção desta enzima (papaína) promove a redução dos resíduos de ácido siálico, que existem na superfície das hemácias e que são responsáveis pela carga negativa nestas células. A diminuição das cargas negativas na superfície da membrana do eritrócito leva à diminuição das repulsões entre as células e conseqüente diminuição do potencial zeta, o que favorece a aglutinação.

Após de depositar o soro dos pacientes nos vários poços das microplacas, para a pesquisa dos auto-anticorpos, são retirados eritrócitos à amostra do paciente,

procedendo-se à sua lavagem com meio salino por três vezes. Esta lavagem tem o intuito de retirar as proteínas do soro e outras biomoléculas, que poderiam interferir com as reacções antigénio-anticorpo.

II) Sistema AB0

Os reagentes usados para o sistema AB0 são anticorpos monoclonais IgM: Anti-A, Anti-B e Anti-AB.

O método usado é a aglutinação direta com um reagente que indica a presença do antigénio correspondente.

Para a determinação do grupo sanguíneo utiliza-se a microplaca. Neste caso, colocam-se 2 gotas de sangue na placa, às quais se junta 1 gota de anti-A a uma delas e à outra uma gota de Anti-B. Mistura-se e observa-se a presença ou ausência de aglutinação. O resultado é positivo quando há aglutinação e negativo na sua ausência.

Quando o Anti-A e o Anti-B não geram aglutinação, usa-se o Anti-AB, o qual contém clones diferentes dos usados. Assim sendo, se a aglutinação continua ausente podemos classificar este soro como pertencente ao Grupo 0.

Em caso de dúvida, como por exemplo uma aglutinação duvidosa ou discrepância de resultados entre os anti-soros, prossegue-se o estudo através da técnica em tubo.

III) Sistema Rh

Método:

O reagente Anti-D tem os seguintes anticorpos:

- anticorpo IgM
- anticorpo IgG

A técnica usada é igual ao Sistema AB0, ou seja, aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo do Sistema AB0, sendo que a aglutinação corresponde a Rh positivo e a sua ausência é Rh negativo.

A confirmação dos casos Rh negativo faz-se por Técnica em tubo, usando o reagente Anti-D anterior e um outro reagente com clones diferentes:

- anticorpo IgM
- anticorpo IgG

1.3 Provas de Coagulação

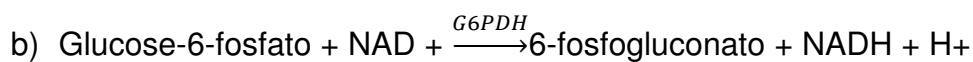
As provas de coagulação realizadas no setor de Hematologia incluem: tempo de tromboplastina parcial (TTP), tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT) e detecção de produtos de degradação de fibrina (PDF), sendo estas provas realizadas no autoanalisador.

Os tubos de colheita de sangue para estudos de coagulação contêm citrato trisódico que fica na proporção de 1:9 com o sangue. O citrato trisódico complexa o cálcio necessário à cascata de coagulação. Estes tubos são centrifugados a 3000rpm durante 10 minutos e o plasma (sobrenadante), que contém os fatores de coagulação essenciais aos estudos de coagulação, é utilizado pelo aparelho para determinação dos tempos de coagulação. Este plasma contém os fatores de coagulação e não contém cálcio e é pobre em plaquetas.

2. Bioquímica

2.1. Glucose

Reações:



O aumento na absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de glucose na amostra.

O doseamento de glucose é feito num conjunto específico de provas

1) Doseamento de glucose em jejum;

2) Glucose em jejum e pós-prandial:

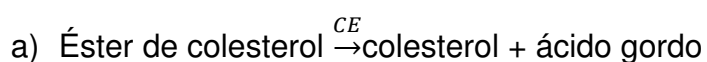
- i. Doseamento da glucose ao tempo 0';
- ii. Doseamento 1 ou 2 horas após a toma de um pequeno-almoço açucarado:
 - (1) 1 Hora – para testar a elevação da glucose no indivíduo
 - (2) 2 Horas – para verificar se o valor de glucose se encontra estabilizado

3) Prova de Tolerância Oral à Glucose. Nesta prova o doente toma 75g de glucose após uma recolha de sangue ao tempo 0'. Posteriormente é feita uma colheita às 2 horas.

4) Curva de Glicémia. Nesta prova o doente toma habitualmente 100g de glucose após uma recolha de sangue ao tempo 0'. Posteriormente são feitas 4 colheitas: 30', 60', 120' e 180'.

2.2 Colesterol total

Esquema da reação:



- b) Colesterol + O₂ \xrightarrow{CO} Colestenona-3 + H₂O₂
- c) 2H₂O₂ + 4-AAP $\xrightarrow{Peroxidase}$ Quinoneimina + H₂O

2.3 Colesterol-HDL

Esquema da reação

- a) LDL, VLDL, Quilomicrons $\xrightarrow{Detergente, Polianiões}$ Complexos estáveis
- b) Colesterol-HDL $\xrightarrow{CE, CO}$ 4Δ Colestenona + H₂O₂
- c) H₂O₂ + DSBmT + 4-AAP $\xrightarrow{Peroxidase}$ Produto corado DSBmT: N,N-bis (4-sulfobutil)-m-toluina- dissódio e 4-AAP: 4-aminoantipirina.

2.4 Triglicéridos

Esquema da reação

- a) Triglicéridos \xrightarrow{Lipase} Glicerol + ácidos gordos
- b) Glicerol + ATP $\xrightarrow{GK, Mg^{2+}}$ Glicerol-3-fosfato + ADP
- c) Glicerol-3-fosfato + O₂ \xrightarrow{GPO} Dihidroxiacetona + H₂O₂
- d) 2H₂O₂ + 4-AAP + DHBS \xrightarrow{HPO} Corante quinoneímina + HCl + 2H₂O

2.5 Iões

2.5.1 Sódio, Potássio e Cloro

O módulo ISE para Na⁺, K⁺ e Cl⁻ integra elétrodos específicos para cada ião de interesse na amostra:

- a) de membrana éter-coroa para sódio e potássio;
- b) uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o cloro.

É desenvolvido um potencial eléctrico de acordo com a Equação de Nernst para um ião específico. Quando comparado com uma referência interna, este potencial eléctrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões da amostra.

2.5.2 Ferro

Esquema de reacção

- Transferrina- $(\text{Fe}^{3+})_2 \xrightarrow{\text{Ácido acético pH 4.3}}$ Transferrina + 2Fe^{3+}
- Fe^{3+} + hidroxilamina+tioglicolato $\rightarrow \text{Fe}^{2+}$
- Fe^{2+} + 3FerroZine $\rightarrow \text{Fe}^{2+}(\text{FerroZine})_3$

2.6 Enzimas:

2.6.1 AST

- L-Aspartato + α -cetoglutarato $\xleftrightarrow{\text{AST}}$ Oxalacetato + L-glutamato
- Oxalacetato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \xleftrightarrow{\text{MDH}}$ Malato + NAD^+

2.6.2 ALT

- L-alanina + α -cetoglutarato $\xleftrightarrow{\text{ALT}}$ + Piruvato + L-glutamato
- Piruvato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \xleftrightarrow{\text{LDH}}$ Lactato+ NAD^+

2.6.3 Creatina Cinase (CK)

Esquema de reacção

- Creatina fosfato + $\text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}}$ Creatina + ATP
- ATP + Glucose $\xrightarrow{\text{HK}}$ Glucose-6-fosfato + ADP
- Glucose-6-fosfato + $\text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}}$ 6-Fosfogluconato + $\text{NADPH} + \text{H}^+$

Nota: As fórmulas químicas que não se encontram em anexo são as fórmulas químicas directas, descritas ao longo do trabalho escrito.

2.7 Fator reumatóide

Esquema de reação

Quando uma amostra é misturada com tampão Glicina e suspensão de látex de IgG, o RF reage especificamente com a IgG em partículas de látex para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de RF na amostra.

2.8 Eletroforese de proteínas:

Consiste na separação eletroforética das proteínas séricas. Conforme o meio de suporte utilizado, assim se obtêm menor ou maior número de bandas. Na rotina clínica, é comum utilizar-se acetato de celulose ou gele de agarose. Nestes meios de suporte separam-se cinco bandas: albumina, alfa1 globulina, alfa2 globulina, beta globulina e gama globulina. Com exceção da albumina, em todas as outras bandas migram várias proteínas. Por exemplo, na banda da alfa 1 migra a alfa1 antitripsina e a alfa1 glicoproteína ácida; na alfa2 globulina migram a haptoglobina e a alfa2 macroglobulina; na beta globulina migram a transferrina e a beta2 microglobulina, na gama globulina migram a IgG, IgA e a IgM.

O proteinograma é um auxiliar no diagnóstico de algumas patologias, sendo a sua interpretação baseada no aumento ou diminuição das cinco bandas obtidas, que correspondem às alterações quantitativas de algumas proteínas séricas. As proteínas totais são também doseadas, e podem aparecer normais, aumentadas ou diminuídas conforme a patologia em causa. Exemplos:

- a) Síndrome nefrótica: diminuição da albumina e gama globulina, aumento da alfa 2 globulina (devido à alfa 2 macroglobulina). Proteínas totais diminuídas.
- b) Infecção aguda: aumento da alfa 1 e alfa 2 globulinas (devido à alfa 1 antitripsina e à haptoglobina). Proteínas totais normais
- c) Deficiência imunitária: baixa da gama globulina (devido às imunoglobulinas). Proteínas totais normais ou diminuídas.
- d) Anemia por baixa de ferro: aumento da beta globulina (devido à transferrina). Proteínas totais normais.

- e) Cirrose hepática: aumento da gama globulina com fusão com a beta globulina. Proteínas totais normais ou aumentadas.
- f) Gamopatia monoclonal: aumento da gama globulina, em pico. Se for uma situação maligna pode tratar-se de Mieloma multiple. Proteínas totais normais ou aumentadas.
- g) Gamopatia oligoclonal: aumento da gama globulina. É frequente nas hepatites.

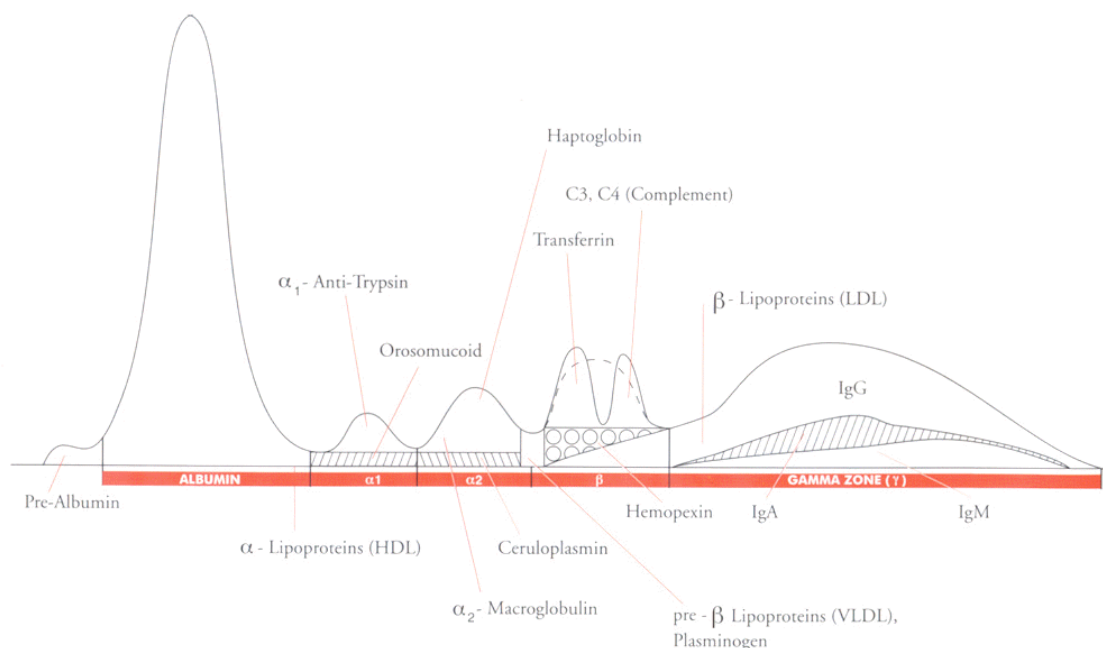


Fig. 10 – Proteinograma

2.8.2 Lipidograma

Metodologia:

As lipoproteínas são separadas nas tiras de gel de agarose de acordo com a sua carga elétrica. A mobilidade eletroforética das frações das lipoproteínas é determinada pelas cargas terminais e laterais das apoproteínas e também pela carga elétrica dos fosfolípidos. As bandas de lipoproteínas são reveladas através da coloração com a solução alcalina que contém negro de Sudão. Na eletroforese das lipoproteínas, feita em gele de agarose aparecem normalmente as seguintes bandas:

- a) Banda beta que corresponde às lipoproteínas de baixa densidade (LDL), caracterizadas pela sua riqueza em colesterol.

- b) Banda pré beta: lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), muito ricas em triglicéridos.
- c) Banda alfa correspondente às lipoproteínas de alta densidade (HDL), relativamente ricas em fosfolípidos.

Nota: Em determinadas dislipidémias pode ainda aparecer no ponto de aplicação, uma banda correspondente aos quilomicra, caracterizada por ter um teor muito elevado em triglicéridos exógenos (84%).

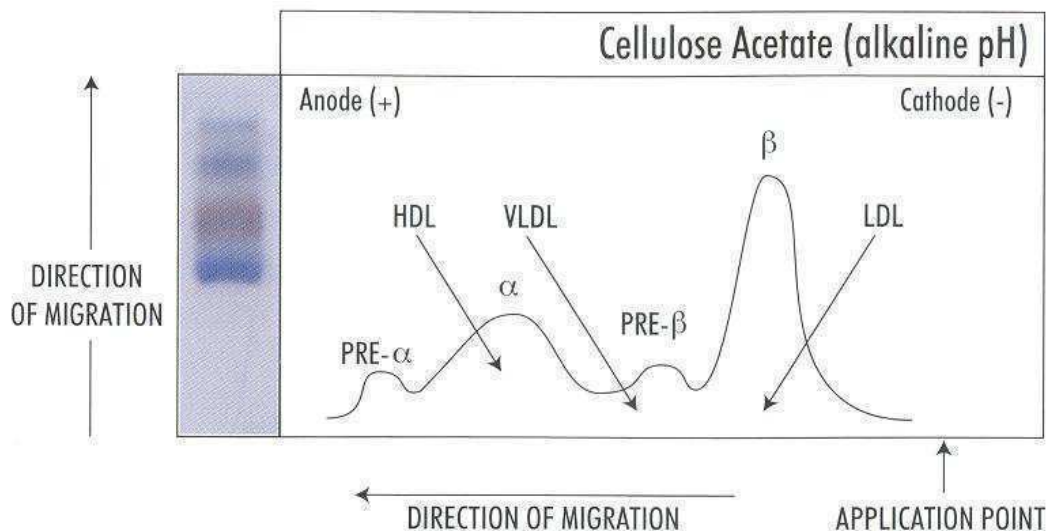


Fig. 9 – Lipidograma

2.9 ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA OU URINA TIPO II

Da análise sumária da urina faz parte a pesquisa da glicose, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos, sangue, proteínas, nitritos, leucócitos, pH e densidade. Apesar de não ser uma análise específica de uma determinada patologia pode, contudo, ajudar no diagnóstico de diversas doenças, sendo, importante a avaliação dos seus resultados.

Glicose: A sua presença na urina, ocorre normalmente quando os níveis sanguíneos são superiores a 180mg/dl. Esta situação aparece, por exemplo, em indivíduos diabéticos não controlados.

Bilirrubina: A sua presença na urina é normal, mas em quantidades não detetadas pelos testes usuais. Quando há obstrução do fluxo biliar, a quantidade de bilirrubina na urina aumenta, dando neste caso, a sua pesquisa, positiva.

Urobilinogénio: Ao nível do cólon, a bilirrubina é reduzida a urobilinogénio estercobilinogénio. Uma pequena parte do urobilinogénio é reabsorvida através da circulação portal, sendo uma pequena porção excretada na urina. A sua presença em concentrações elevadas, poderá ser indicador de processos hemolíticos.

Corpos cetónicos: São o produto do metabolismo das gorduras, e a sua presença pode ser indicador de acidose. Esta situação ocorre frequentemente em diabéticos não controlados. Também pode ocorrer em situações de vómitos e de febre alta.

Sangue: Um resultado positivo poderá significar a presença de eritrócitos intactos (hematúria) ou hemolisados (hemoglobinúria). A hematúria ocorre em situações patológicas de doença ou traumatismo a nível dos rins ou tracto urinário e em indivíduos saudáveis sujeitos a intenso exercício físico. A hemoglobinúria poderá indicar uma significativa hemólise intravascular.

Proteínas: Pode haver uma excreção aumentada em indivíduos saudáveis após exercício físico intenso, e em variadas situações patológicas, essencialmente associadas a doenças do trato urinário. Situações de febre alta também podem ocasionar o aparecimento de proteinúria acima dos valores normais.

Nitritos: Um resultado positivo, indica que existem, em número significativo, bactérias de Gram negativo que reduzem os nitratos urinários a nitritos.

Leucócitos: Aparecem em número significativo nas infecções urinárias ou lesões inflamatórias, infecciosas ou traumáticas a qualquer nível do trato urinário.

pH: Reflete a capacidade do rim para manter a concentração normal do ião hidrogénio no plasma e fluido extracelular. Valores elevados podem ser encontrados na alcalose respiratória, presença de cálculos renais e infecções urinárias por microrganismos como o *Proteus* e *Pseudomonas sp.* Valores diminuídos podem ser encontrados na acidose respiratória, perda de potássio, diarreias e infecções urinárias por *E. Coli.*

Densidade: Avalia a função da filtração e concentração renal. Aparece diminuída por exemplo na administração excessiva de líquidos por via intravenosa e

insuficiência renal crônica. Densidades elevadas podem ser encontradas por exemplo na desidratação, vômitos, febre, diabetes mellitus e uropatias obstrutivas. A amostra utilizada para esta análise deve ser a primeira urina da manhã. As determinações acima referidas, são efetuadas utilizando uma tira reativa, que depois de introduzida na urina é lida em aparelho apropriado. A urina é em seguida centrifugada a 2500 rotações /minuto durante 10 minutos, retira-se o sobrenadante deixando ficar aproximadamente 1 ml no tubo, agita-se e observa-se ao microscópio entre lâmina e lamela ou lâmina apropriada, para análise do sedimento urinário. Os elementos mais frequentemente observados são:

Células epiteliais: São células de descamação do revestimento epitelial do trato urinário. Apresentam-se grandes, planas, com núcleo distinto e grande citoplasma. Não têm significado clínico.



Fig. 11 – Célula epitelial

Células redondas: São geralmente células da zona entre a bexiga e o rim. Podem ser indicadoras de doença renal.



Fig. 12 – Células redondas

Eritrócitos: a sua presença em número superior ao normal (3 a 5 por campo), pode significar lesão inflamatória, infecciosa ou traumática dos rins ou vias urinárias.

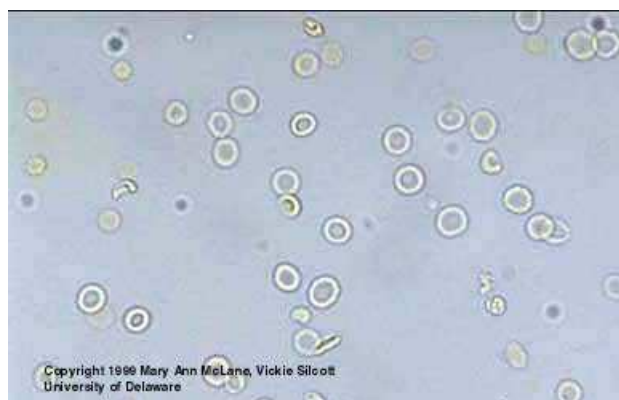


Fig. 13 – Eritrócitos

Leucócitos: quantidades aumentadas (+ de 5 por campo), indicam a presença de lesões inflamatórias, infecciosas ou traumáticas em qualquer nível do trato urinário.



Fig. 14 – Leucócitos

Cilindros: são formados quando as proteínas se acumulam e precipitam nos túbulos renais, aparecendo na urina com o seu formato. Os mais frequentes são os cilindros hialinos granulosos de hemácias e de leucócitos .

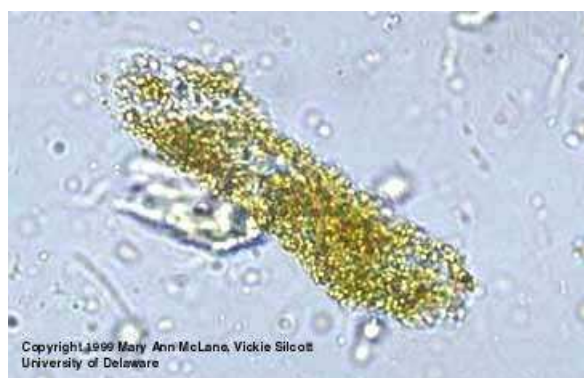


Fig. 15 – Cilindros

Cristais: uma grande variedade pode ser encontrada na urina. A sua formação é influenciada pelo pH, densidade e temperatura da urina. Nas urinas de pH ácido é frequente encontrarem-se cristais de ácido úrico e de oxalato de cálcio.

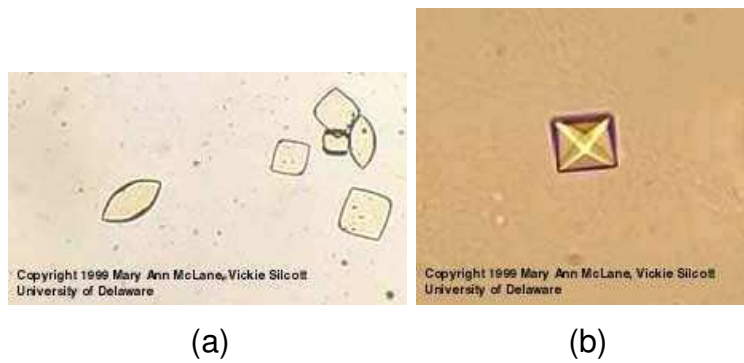


Fig. 16 – (a) Cristais de ácido úrico; (b) Cristal de oxalato de cálcio

Nas urinas de pH alcalino podem aparecer cristais de fosfato triplo de amônio e magnésio. Normalmente não têm significado clínico. Contudo existem alguns cristais como por exemplo os de cistina e leucina, que estão associados a desordens metabólicas.

Tricomonas: a sua presença deve ser referenciada ao médico, para posterior tratamento.



Fig. 17 – Tricomonas

Leveduras: regra geral trata-se de *Candida albicans*. Tal como no caso anterior a sua observação deve ser referenciada.

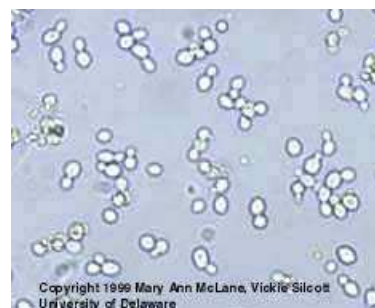


Fig. 18 – Leveduras

2.10 Testes de aglutinação

1- Teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)

É um teste de floculação em lâmina, para o diagnóstico da sífilis, através da pesquisa de anticorpos no soro ou plasma humanos. O antigénio (reagente utilizado) está ligado a partículas de carvão. Quando existem anticorpos no soro, ligam-se ao antigénio, provocando um floculado negro.

2- Reação de Waaler Rose

Teste de hemaglutinação em lâmina para deteção do Fator Reumatóide no soro humano. Pensa-se que este fator é constituído por anticorpos IgM dirigidos contra as próprias imunoglobulinas G dos pacientes. O reagente, é uma suspensão de glóbulos vermelhos de carneiro estabilizados, cobertos de IgG de coelho, anti carneiro. Se a amostra tiver o Fator Reumatóide, produz-se uma aglutinação.

2.11 HCV

As Instruções resumidas abaixo são para usuários experientes do kit ImmunoComb II HCV.

1. Trazer todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente e realizar o teste na temperatura de 22 - 26°C.
2. Dispensar 50 µl de cada amostra e controlo nas cavidades da fileira A da Placa Reveladora e misturar.
3. Inserir o Pente na fileira A e continuar como descrito na Tabela 1.
4. Durante as incubações nas cavidades A e C, retirar e inserir o Pente periodicamente.

Etapa	Fileira	Proceder como a seguir
Reação antigénio-anticorpo	A	Misturar; incubar por 10 minutos; abosrver.
Lavagem	B	Agitar; incubar por 2 minutos; abosrver.
Ligação do conjugado	C	Misturar; incubar por 10 minutos; abosrver.
Lavagem	D	Agitar; incubar por 2 minutos; abosrver.
Lavagem	E	Agitar; incubar por 2 minutos; abosrver.
Reação de cor	F	Misturar; incubar por 10 minutos.
Reação de parada	E	Incubar por 1 minuto; secar ao ar livre.

Tabela 2. Resumo do Procedimento de Teste.

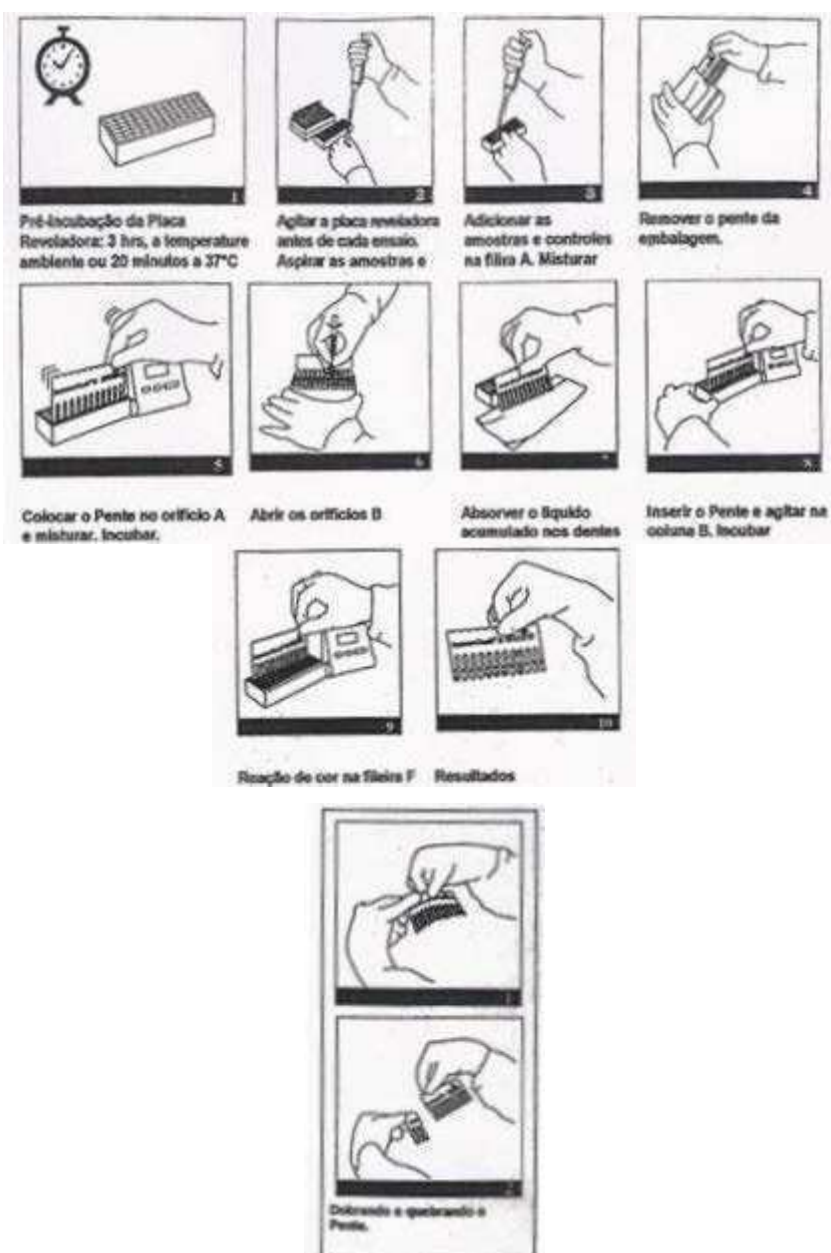


Fig. 19 - Resumo dos principais procedimentos do teste