



SÃO JOÃO

Tomás Sáez Rodes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Emília Patrício e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tomás Sáez Rodes

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dra. Emília Patrício e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMO	5
ABSTRACT	5
1. IDENTIFICAÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	7
2. INTRODUÇÃO	7
3. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATORIO	8
3.1 Organização	9
3.2 Organização da unidade de colheitas	9
3.2.1 Sistema de tubos vácuo utilizado	9
3.2.2 Ordem de colheita	11
3.3 Secretaria	11
3.4 Fundamentos básicos	12
3.5 Recepção, triagem e processamento dos produtos biológicos	13
3.6 Separação	14
3.7 Estação pré-analítica Olympus Laboratory Automation System OLA 2500 System Beckman Coulter Automate 1250	14
3.7.1 Processamento inicial da amostra	15
3.7.2 Vantagens	15
4. BIOQUIMICA	16
4.1 OSMOMETRIA	16
4.1.1 Advanced Instruments, Micro Osmometer Model 3300	16
4.2 GASIMETRIA	17
4.2.1 Siemens Rapidlab 1265	17
4.2.1.1 Potenciometria	17
4.2.1.2 Amperimetria	17
4.3 ESPECTROFOTOMETRIA	18
4.3.1 Tipos de Brancos	19
4.3.1.1 Branco do Reagente (Ajuste Zero)	19
4.3.1.2 Branco da amostra	19
4.3.2 Reacção de ponto final	20
4.3.2.1 Um Ponto	20
4.3.2.2 Dois pontos (Método com Branco automático)	20
4.3.3 Reacção cinética	21

4.3.3.1 Cinética normal	21
4.3.3.2 Cinética dupla	21
4.3.4 Reacção tempo fixo	21
4.3.4.1 Dupla reacção de tempo fixo (branco automático).....	22
4.3.5 OLYMPUS AU5400 BECKMAN COULTER	23
4.3.5.1 Determinações Olympus Au5400 Beckman Coulter	23
4.3.5.2 Parâmetros analisados pelo Olympus Au 5400 Beckman Coulter	24
4.3.5.2.1 Marcadores do metabolismo dos hidratos de carbono.....	24
4.3.5.2.2 Marcadores da função renal	24
4.3.5.2.3 Marcadores da função hepática	25
4.3.5.2.4 Marcadores do metabolismo lipídico	26
4.3.5.2.5 Marcadores inflamatórios	26
4.3.5.2.6 Marcadores do metabolismo ósseo	27
4.3.5.2.7 Marcadores do metabolismo do ferro.....	27
4.3.5.2.8 Marcador de infecção	27
4.3.5.2.9 Outros indicadores	28
4.3.5.2.10 Drogas terapêuticas	28
4.3.5.2.11 Marcadores LIH	28
4.4 POTENCIOMETRIA	29
4.4.1 Electrólitos: sódio (Na ⁺), potássio (K ⁺) e cloro (Cl ⁻)	30
4.5 IMUNOENSAIO DE MICROPARTÍCULAS POR	
QUIMILUMINESCENCIA	30
4.5.1 ARCHITECT I-2000 SR ABBOTT.....	31
4.5.1.1 Determinações Architect i-2000 sr Abbott.....	32
4.5.1.2 Parâmetros analisados pelo Architect i-2000 sr Abbott.....	32
4.5.1.2.1 Marcadores da função cardíaca	32
4.5.1.2.2 Marcadores da função tiroidea	33
4.5.1.2.3 Marcadores da síntese da hemoglobina.....	33
4.5.1.2.4 Drogas terapêuticas	33
4.6 IMUNOENSAIO POR ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA	34
4.6.1 COBAS E411 ROCHE.....	34
4.6.1.1 Determinações Cobas e411.....	35
4.6.1.2 Parâmetros Cobas e411.....	36
4.6.1.2.1 Marcadores endocrinologia	36
4.6.1.2.2 Marcadores fertilidade	37

4.6.1.2.3 Marcadores tumorais	38
4.7 URINAS	39
4.7.1 Equipamentos	39
4.7.2 Exame sumário de urina	39
4.7.3 Aution Ax 4030 Max	39
4.7.4 Uf 1000 I Sysmex.....	40
4.7.5 Sedimento urinário.....	40
4.7.5.1 Sedimax	40
4.7.5.2 Microscopia do sedimento urinário	41
4.7.6 Outras determinações	41
4.7.6.1 Tox/See Drug Sreen Test	41
4.7.7 Controlo de qualidade urinário	41
4.7.7.1 C.Q.I. urinário	42
4.8 CONTROLO DE QUALIDADE.....	42
4.8.1 C.Q.I.	42
4.8.2 A.E.Q.	43
4.8.3 Avaliação da imprecisão e da inexactidão	43
5. IMUNOLOGIA	44
5.1 IMUNOFLUORESCENCIA	45
5.1.1 Imunofluorescência directa	45
5.1.2 Imunofluorescência indirecta	45
5.2 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	46
5.2.1 Elisa competitivo	46
5.2.2 Elisa sanduíche	47
5.2.3 MAGO PLUS DIAMEDIX.....	47
5.2.3.1 Determinações Mago Plus Diamedix	48
5.2.3.2 Parâmetros analisados pelo Mago Plus Diamedix	49
5.2.4 TRITURUS GRIFOLS.....	51
5.2.4.1 Determinações Triturus Grifols.....	52
5.2.4.2 Parâmetros analisados pelo Triturus Grifols.....	52
5.3 WESTERN BLOT OU IMMUNOBLOTTING	52
5.3.1 Dot blot	53
5.3.2 EURO BLOT MASTER EUROINMUN	53
5.3.2.1 Determinações Euro blot Master Euroinmun.....	54
5.3.2.2 Parâmetros analisados pelos Euro blot Master Euroinmun	55

5.4 MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO COM UMA DETECÇÃO FINAL EM FLUORESCÊNCIA	56
5.4.1 MINI VIDAS BIOMERIEUX.....	56
5.4.1.1 Determinações Mini Vidas Biomerieux	56
5.4.1.2 Parâmetros analisados pelo Mini Vidas Biomerieux	57
5.5 AGLUTINAÇÃO	57
5.5.1 Reacções de aglutinação directa.....	57
5.5.2 Reacções de aglutinação indirecta	58
5.5.3 Determinações por técnicas manuais.....	58
5.5.4 Parâmetros analisados por técnicas manuais	59
5.6 NEFELOMETRIA E IMUNOENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO	59
5.6.1 DIMENSION VISTA 500 SIEMENS.....	60
5.6.1.1 Determinações Dimension Vista 500 Siemens	60
5.6.1.2 Parâmetros analisados Dimension Vista 500 Siemens	62
5.6.1.2.1 Proteínas	62
5.6.1.2.2 Estudo do complemento.....	63
5.6.1.2.3 Imunoglobulinas.....	64
5.7 ELECTROFORESIS PROTEINAS	65
5.7.1 Electroforese e densitometria	65
5.7.2 Electroforese capilar	65
5.7.3 Minicap Sebia.....	66
5.8 IMUNOFIXAÇÕES	67
5.8.1 Hydrasis Sebia	67
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ABREVIATURAS

AIAT - Alfa I -Antritipsina
AIMIC - Alfa I -Microglobulina
A2MAC - Alfa2-Macroglobulina
ACA - Anticorpos anti-cardiolipina
ACTH - Hormona adrenocorticotrófica
A.E.Q. - Avaliação Externa de Qualidade
ALP - Fosfatase alcalina
ALT - Alanina aminotransferase
AMA - Anticorpos anti-LKM mitocôndrias
ANA - Anticorpos anti-nucleares
ANCA - Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo
APCA - Anticorpos anti-células parietais do estomago
Apo A I - Apo lipoproteína A I
Apo B - Apolipoproteína B
ASCA - Anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae
ASMA - Anticorpos anti- músculo liso
ASO - Anti-estreptolisina O
AST - Alanina amino transferase
B2MIC - Beta2-Microglobulina
BACT - Bactéria
BNP - Peptídeo natriurético
CA - Antígeno carcinogénico
CAST - Cilindros urinários
CEA -Antígeno carcinoembrionario)
CER - Ceruoplasmina
CHSJ - Centro Hospitalar São João
CIC - Imunocomplexos circulantes
CK - *Creatine Kinase*
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMIA - *Chemiluminescent microparticle immunoassay*
C.Q.I. - Controlo de Qualidade Interno
CRP - Proteína C Reactiva
CRY - Cristais

CYSC - Cistatina C
DHEA - Dehidroepiandrosterona
DO - Densidade óptica
EC - Célula epitelial
ECLIA - Imunoensaio por electroquimioluminiscencia
EDTA - Etilendiaminotetraacético
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELFA - Imunoenzimático com detecção final em fluorescência
ENA - Anticorpos contra antígenos extráveis nucleares
EPI - Células epiteliais
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FSH - Hormona folículo estimulante
GGT - Gama-Glutamil Transferase
hCG - Hormona gonodotrófica humana
HAPT - Haptoglobina
HDL - *High Density Lipoprotein*
HYA - Cilindros hialinos
IF - Imunofluorescência
IFD - Imunofluorescência directa
IFI - Imunofluorescência indirecta
LCR - Líquido céfalo raquidiano
LDH - Lactato Desidrogenase
LDL - *Low Density Lipoprotein*
LH - Hormona luteinizante
LIH - Lipemia, Icterícia e Hemólise
NEC - Células epiteliais de transição
NEQAS - *National External Quality Assessment Service*
NSE - Enolase neuroespecífica
MDMA - Metilendioximetanfetamina
M.O. - Microscopia óptica
MPO - Anticorpos anti-mieloperoxidase
MUC - Muco
PAT - Cilindros patológicos
pCO₂ - Pressão de dióxido de carbono

pO₂ - Pressão de oxigénio
PreAlb - Pré-albumina
PSA - Antígeno prostático específico
PTH - Hormona Paratiróide
RBC - Eritrócitos
RBP - Proteínas de ligação ao retinol
RF - Factores reumatóides
RIQAS - Randox International Quality Assessment Scheme
SAA - Substancia Amilóide A
sALB - Albumina especial
SHGB - *Sex hormone-binding globulin*
SO₂ - Saturação de oxigénio
SPRM - Espermatozóides)
STFR - Receptor solúvel transferrina
T3 - Triiodotironina
T4 - Tiroxina
Tg - Tiroglobulina
TPO - Peroxidase tiróide
TRAb - Anticorpos anti-receptor de TSH
TSH - Hormona estimulante da tiróide
UV - Ultra Violeta
VDRL - Venereal Disease Research Laboratory
WBC - Leucócitos
YEA - Leveduras

RESUMO

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no Centro Hospitalar São João do Porto, no âmbito das análises clínicas. O estágio teve como principal objectivo a minha integração no Serviço de Patologia Clínica do hospital, proporcionando-me a aquisição de habilidades práticas na execução das técnicas laboratoriais, sempre associadas a uma aplicação teórica dos conhecimentos adquiridos durante o mestrado, que me permita fazer a avaliação e interpretação dos resultados.

As áreas aprofundadas neste relatório são a Bioquímica Clínica e a Imunologia.

ABSTRACT

This report refers to the active developer at the Hospitalet Center Sao Joao Porto, in the context of clinical analysis. The main objective was my integration in the hospital's Clinical Pathology Service, giving me the acquisition of practical skills in carrying out laboratory techniques, always associated with a theoretical application of knowledge acquired during the Masters that allow me to do the evaluation and interpretation of results.

The areas in-depth in this report are the Clinical Biochemistry and Immunology.

1. IDENTIFICAÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Tomás Sáez Rodes

Licenciado em Farmácia pela *Facultad de Farmacia de la Universidad Alfonso X El Sabio*, Madrid, Espanha.

Inscrito na Secção Regional do Norte da Ordem dos Farmacêuticos com a carteira profissional número 19234.

Relatório referente ao estágio na área de Química Clínica e Imunologia que teve início a 1 de dezembro de 2014 e finalizou a 30 de abril de 2015.

Local da Formação:

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar São João, Porto, Portugal

Orientadores da Formação Específica

Dra. Emília Patrício Técnica Superior da área de Química Clínica do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ

2. INTRODUÇÃO

Os exames laboratoriais são largamente utilizados na prática da medicina para auferir o estado de saúde de um indivíduo. Os resultados dos parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para diagnóstico, prognóstico, rastreio ou monitorização de doença. Cerca de 60-70% das decisões clínicas baseiam-se em resultados laboratoriais. Contudo, estes exames só devem ser requisitados quando os seus resultados permitam a recolha de informação útil, que vão permitir o diagnóstico e/ou alterar a abordagem clínica ou terapêutica. Para que este objectivo possa ser atingido o rigor é palavra de ordem nas 3 fases que precedem a libertação do resultado analítico: **Fase Pré-Analítica, Fase Analítica e Fase Pós-Analítica** que são da responsabilidade do analista clínico.

A Química Clínica é uma área da Patologia Clínica que quantifica diversos componentes químicos presentes nos fluidos corporais, estando a maior parte da atividade laboratorial automatizada, de forma a responder com qualidade e eficiência às solicitações por parte dos médicos e utentes.

O presente relatório refere-se ao estágio realizado na área da Química Clínica, no centro Hospitalar São João do Porto e procura resumir os diversos testes realizados nesta valência, os equipamentos e as metodologias utilizadas nessas determinações.

3. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATORIO

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de S. João integra o Centro de Medicina Laboratorial (que compreende também o Serviço de Anatomia Patológica e o Serviço de Imunohemoterapia).

3.1 Organização

O Laboratório de Patologia Clínica está organizado em áreas que se localizam nos Pisos 5, 4, -1 e 2.

Dada a dispersão espacial das diversas Áreas do Laboratório é difícil fazer uma explanação descritiva da organização pelo que me pareceu visualmente mais explícito fazê-lo de forma esquemática.

Laboratório central

Áreas de receção de produtos biológicos: PISO 5, PISO 2

Área de hematologia laboratorial: PISO 4

Área de química clínica: PISO 4

Área de microbiologia: PISO 5

Área de biopatologia molecular: PISO 5

Áreas de técnicas especiais: PISOS -1, 4 e 5

Unidade central de colheitas: PISO 2

A receção dos produtos biológicos procedentes do Internamentos e do Serviço de Urgência Geral realiza-se no Piso 5 – SECRETARIA CENTRAL – que funciona até às 20h dos dias úteis. Depois das 20h, durante os fins-de-semana e dias feriados a receção faz-se no LABORATÓRIO CENTRAL.

A receção dos produtos biológicos de doentes em ambulatório realiza-se na UNIDADE CENTRAL DE COLHEITAS, situada no Piso2.

O SERVIÇO DE URGÊNCIA LABORATORIAL está localizado Laboratório Central e funciona ininterruptamente.

O número de colheitas diário são de 500 e o número de doentes que chega ao serviço são 1000 doentes ao dia.

3.2 Organização da unidade de colheitas

Receção da requisição médica: o doente em ambulatório dirige-se ao balcão de entrada fazendo-se acompanhar da respetiva requisição de exames laboratoriais. É-lhe atribuído um N^o de ordem para a realização da colheita (atribui-se a letra P para as colheitas prioritárias – crianças, grávidas, deficientes profundos, diabéticos, determinações de Cortisol e ACTH que devem ser realizadas à 1^a hora da manhã – e a letra N para as restantes). São impressas as etiquetas correspondentes aos pedidos que constam na requisição à qual são anexadas para que o técnico que efectua *a posteriori* a colheita e/ou receba as amostras que o doente colheu previamente (urina, fezes, secreções brônquicas, etc.), as coloque no tubo/recipiente respetivo.

Preparação da colheita de sangue e/ou recepção de amostras trazidas pelo doente: é solicitado um documento de identificação do doente e confirmados os dados identificativos com os que constam na respetiva requisição. Posteriormente, o técnico certifica-se do cumprimento dos requisitos específicos necessários para a colheita (por exemplo, jejum para determinados parâmetros, cuidados inerentes à colheita de amostras realizadas no domicílio, fase do ciclo menstrual para o doseamento de determinados parâmetros hormonais, uso prévio de determinados fármacos que possam ser causa de interferência nos parâmetros analíticos, etc.). Foi registado qualquer irregularidade/discrepância na requisição. Preenchimento do questionário do Rastreamento Bioquímico Pré-Natal.

Preparação do material para a venopunção, selecção dos tubos de colheita de sangue de acordo com os parâmetros requisitados, estudo da ordem de colheita a respeitar e respectiva etiquetagem. Realização da colheita de sangue.

Triagem dos tubos/recipientes de colheita e organização do transporte até ao Laboratório Central/ Secretaria.

3.2.1 Sistema de tubos vácuo utilizado

O sistema utilizado é o Vacutest Kima, trata-se uma empresa certificada pela ISO 9001:2008, e os tubos que produz estão de acordo com as normas europeias ISO 6710 EN 14820 respeitando as guidelines da CLSI para tubos de vácuo.

Os tubos utilizados no serviço de Química Clínica do centro hospitalar São João são:



Figura I-Tubos de colheita.

Soro:

TUBO SEM ANTICOAGULANTE (TUBO Vermelho)

Contem ativador da coagulação, e é utilizado para Bioquímica e Serologia.

GEL SIN ANTICOAGULANTE (TUBO AMARELO)

Contem gel ativador de coágulo permitindo a separação do soro e o coágulo e mais rápido. E utilizado no internamento e nas consultas externas.

Plasma (Anticoagulantes):

HEPARINA LITIO (TUBO VERDE)

A Heparina é utilizada tanto em estudos da rotina como especializados.

EDTA (etilendiaminotetraacético, K3EDTA) (TUBO VIOLETA)

É utilizado sobre tudo nos estudos de hematologia.

CITRATO DE SODIO (TUBO AZUL CLARO)

Contem 3,8 % em Concentração de Citrato de Sódio e é utilizado em estudos da Coagulação (Hemóstase).

FLUORURO DE SODIO (TUBO CIZENTO)

Inibe a glicólise, é utilizado na Bioquímica.

HEPARINA SODIO (TUBO AZUL CELESTE)

Para estudo dos oligoelementos (I).

3.2.2 Ordem de colheita

1. Hemocultura;
2. Tubos de coagulação (Citrato);
3. Tubo sem aditivo;
4. Tubo de Soro com ou sem activador de coágulo, com ou sem gel;
5. Tubo de Heparina Sódio / Lítio, com ou sem gel separador;
6. Tubo de EDTA com ou sem gel separador;
7. Tubo com Inibidor glicolítico (Fluoreto) (2).



Figura2 – Ordem dos tubos de colheita.

3.3 Secretaria

À Secretaria chegam as amostras provenientes dos serviços:

- Serviço de Urgência
- Serviços de Internamento
- Doentes em ambulatório (Hospital de Dia e Unidade Central de Colheitas).
- Pólo de Valongo do CHSJ
- Pedidos de outros Centros (por exemplo, determinações realizadas na Área de Biopatologia Molecular) que se realizam no Laboratório do CHSJ.

De acordo com a procedência, as amostras são triadas, registadas no Sistema informático *Clinidata* e classificadas de acordo com o grau de prioridade de processamento (etiquetagem com uma letra que precede o N° da amostra: U: Urgência; M: Microbiologia; I: Imunologia; B: Biopatologia Molecular). Posteriormente são enviadas às Áreas específicas onde serão processadas.

Funcionalmente, a Secretaria está organizada em cinco postos de trabalho:

- 1) Posto de receção das amostras.
- 2) Posto dedicado exclusivamente ao registo e encaminhamento de amostras urgentes.
- 3) Posto que apoia a urgência, regista e encaminha as amostras provenientes dos Serviços de Internamento e da Unidade Central de Colheitas.
- 4) Posto que regista e encaminha as amostras que se destinam a exames microbiológicos.
- 5) Posto de atendimento telefónico (encaminhamento de chamadas para as Áreas do Laboratório específicas, resolução de questões, acrescento de parâmetros analíticos em pedidos efectuados, etc.).

O sistema de transporte das amostras pode seguir 2 vias: transporte por vácuo (permite o envio de amostras do serviço de urgência do CHSJ directamente à Secretaria e posteriormente o encaminhamento para o Laboratório Central); transporte em mão (proveniente dos Serviços de Internamento, do Hospital de Dia e da Unidade Central de Colheitas).

3.4 Fundamentos básicos

Durante a primeira fase do estágio adquiri conhecimentos sobre as normas de colheita, transporte e conservação de produtos biológicos para Análise Bioquímica. Estudei as características da água utilizada no Laboratório do CHSJ bem como o circuito e processos sequenciais de purificação.

Em seguida estudei os tipos de centrífugas utilizadas em Bioquímica assim como os tempos e velocidades de rotação preconizados para a obtenção de soro/plasma (a partir de amostras de sangue) e do sedimento urinário (a partir de amostras de urina).

Recordei as Unidades de medida do Sistema Internacional e os conceitos subjacentes ao processo de Medida (Análise, Medida, Técnica, Método, Procedimento, Protocolo).

Apreendi os princípios e fundamentos dos principais Métodos Instrumentais de Análise utilizados na Área de Química Clínica.

Relembrei os conhecimentos de Estatística Básica na perspectiva de aplicá-los à Área Laboratorial (estudo do Tipo de Variáveis, estudo da Distribuição Normal ou Gaussiana, estudo das Medidas de Tendência Central, estudo das Medidas de Dispersão).

3.5 Recepção, triagem e processamento dos produtos biológicos

Durante esta fase tive oportunidade de me familiarizar com os diferentes tipos de amostras biológicas que chegam à Área de Química Clínica, observando as características macroscópicas das mesmas.

Depois de triadas, as amostras de sangue e outros líquidos biológicos são centrifugadas a 3500rpm durante 10 minutos. Posteriormente são colocadas na estação pré-analítica Olympus® OLA 2500 onde são distribuídas em sectores específicos de acordo com as determinações bioquímicas solicitadas.

Cada sector corresponderá ao encaminhamento de essas amostras para um equipamento específico. Devido à quantidade elevada de metodologias e equipamentos utilizados nesta área, apenas me foi possível estudar durante este período, o funcionamento dos equipamentos principais:

- **Olympus® AU5400** – permite a determinação de parâmetros no soro, plasma, urina e outros líquidos biológicos utilizando várias metodologias, entre as quais: métodos de Fotometria e Espectrofotometria, Ensaio de Cor Enzimático, Imunoturbidimetria e Potenciometria Indirecta (para a determinação do Ionograma).

- **Architect®i2000sr Abbott, Roche® Cobas E411** – Método de Imunoensaio de Micropartículas por Quimiluminescência (CMIA).

-**Micro-Osmometer®Model 33000** (Método Ponto de congelação).

-**Siemens RAPIDLab® I265.**

Tive particular atenção às características macroscópicas das amostras de soro e plasma no que concerne à presença de LIH (Lipemia, Icterícia e Hemólise), variáveis condicionantes da possível ocorrência de interferências estáticas (porque estão presentes na amostra e não experimentam variação durante o ciclo analítico) com as determinações analíticas.

Participei nas actividades de rotina desta área tendo tido particular enfoque nos procedimentos de manutenção, calibração e controlo de qualidade levados a cabo nos equipamentos supracitados. Assim sendo aprendi a consultar no menu dos equipamentos *Olympus*, *Architect*, *Cobas* as curvas de calibração e os gráficos de controlo de qualidade diário e acumulado (Gráficos de Levey-Jennings).

3.6 Separação

A separação das amostras está incluída na fase pré-analítica, ou seja a fase da preparação das amostras antes de serem processadas. Quando as amostras chegam ao laboratório são triadas e posteriormente centrifugadas 15min a 3500rpm, com o objectivo de obtermos o soro ou plasma. Apenas as gasimetrias não são centrifugadas, pois a gasimetria é feita recorrendo ao sangue total quer venosa, quer arterial. Quando chegam ao laboratório amostras com pedido de renina, aldosterona, ACTH, amónia e lactato estas devem de ser centrífugas numa centrífuga refrigerada.

Após a centrifugação verifica-se se as amostras estão hemolisadas, lipémicas ou ictéricas, pois a sua presença pode alterar alguns parâmetros de análise como a bilirrubina, o ferro, o magnésio, o potássio, entre outros. E também necessário conferir os volumes das amostras, pois caso não chegue para realizar as análises necessárias, é requerido uma nova amostra. De seguida as amostras são colocadas no equipamento Olympus OLA 2500, para posterior separação da amostra em alíquotas, se necessário, para posteriormente serem colocados nos diferentes autoanalisadores, consoante os pedidos.

3.7 Estação pré-analítica Olympus Laboratory Automation System OLA 2500 System Beckman Coulter Automate I250



Figura 3 - Olympus Laboratory Automation System OLA 2500.

Componentes de um sistema otimizado da automatização do laboratório permitindo:

A separação da amostra; Aliquotagem automatizada das amostras; Amostra / alíquotas;

Monitoriza a integridade da amostra; Transporte das amostras; Amostragem automatizada

Armazenamento e arquivamento automatizado das amostras;

Software de controlo de processos que permite: Localização das amostras; Testes reflexos;

Repetição dos testes; A integração dos dados dos pacientes; Validação baseada em regras.

3.7.1 Processamento inicial da amostra

1. Separação da amostra, pelo tamanho do recipiente da amostra, dimensões, forma, conteúdo e outros parâmetros laboratoriais específico;
2. Abertura da tampa;
3. Centrifugação, incluindo a capacidade de centrifugar as amostras a várias temperaturas e a diferentes forças;
4. Preparação das alíquotas, incluindo a produção de uma ou várias amostras do recipiente da amostra original;
5. Voltar tampar o recipiente da amostra original do qual foram preparadas alíquotas;
6. Separação, colocação das amostras em racks para equipamentos específicos ou para armazenar por períodos curtos ou longos.

3.7.2 Vantagens

Diminuição do tempo em amostras urgentes; Diminuição das taxas de erro; Capacidade de maior carga de trabalho; Redução do número de pessoal; Diminuição da área de trabalho;

Diminuição do tempo de entrega dos resultados; Redução do custo por ensaio. (3)

4.BIOQUIMICA

4.1 OSMOMETRIA

4.1.1 Advanced Instruments, Micro Osmometer Model 3300



Figura 4 - Micro Osmometer Model 3300.

Osmómetro Advanced é um dispositivo concebido para determinar concentrações de soluções através da determinação do ponto de congelação.

Utilizando termómetro de elevada precisão para medir a temperatura da amostra, controla o grau de sobreaquecimento e indução da congelação, e medir o ponto de congelação da amostra. Pode determinar diferenças de +/- 1 mosm/Kg.

Osmómetro Advanced Instruments Modelo 3300 Micro-Osmometer determina a osmolaridade de soluções utilizando a diminuição do ponto de congelação (4).

Princípios de OSMOMETRIA (Ponto de Congelação)

Quando um soluto é dissolvido num solvente puro, ocorrem as seguintes alterações nas propriedades da solução:

- O ponto de congelação é diminuído;
- Ponto de ebulição é aumentado;
- A pressão osmótica é aumentada;
- Pressão de vapor de água é diminuída.

Estas são as propriedades chamadas de ligação ou concentradores da solução que, dentro de limites razoáveis, mudar em proporção directa com a concentração de soluto; em outras palavras, o número de partículas na solução (5).

4.2 GASIMETRIA

4.2.1 Siemens Rapidlab I 265



Figura 5 - Siemens Rapidlab I 265.

O Rapidlab I 265 é um autoanalisador utilizado para a realização de gasimetrias, tanto venosas como arteriais as determinações realizadas são em sangue total, e analisa os seguintes parâmetros:

Gás sangue (**pH**, **pCO₂**, **pO₂**)

Electrólitos (**Na⁺**, **K⁺**, **Ca⁺⁺**, Cl⁻)

Metabólitos (glicose, lactato neonatal, bilirrubina Total)

CO-oximetria (THb, HHb, O₂Hb, **SO₂**, COHb, MetHb)

Requisitos de amostra

Todo sangue - recém-colhido para uma seringa heparinizada. Certificar de que a amostra e bem homogeneizada e todo o ar são retirados.

Temos de analisar imediatamente. O volume mínimo necessário é de 0,5 ml de amostra.

4.2.1.1 Potenciometria

O sensor de pCO₂ trata-se de um eléctrodo de pH, revestido por uma solução de bicarbonato de cloro e com uma membrana permeável ao CO₂ gasoso que separa esta solução da amostra. Os parâmetros determinados são (Ag Cl/Ag pH, pCO₂, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺)

4.2.1.2 Amperimetria

Os eléctrodos contem um mecanismo transdutor, que converte o potencial gerado pelo reconhecimento molecular num sinal eléctrico e contém ainda um sistema de

processamento do sinal onde os sinais electrónicos são convertidos nas respectivas concentrações, assim são determinados os parâmetros:

pO₂, glicose, lactato

Valores calculados: (bicarbonato) **pHCO₃** padrão, excesso de base (6).

pH sendo que o eléctrodo de pH é constituído por uma membrana de vidro, sensível e específica para iões de hidrogénio.

Acidose (diminuição do pH) produzida quando ocorre:

Diminuição da pHCO₃, provocada por uma cetoacidose ou acidose láctica.

Aumento da pCO₂, provocada por falha respiratória.

Alcalose (aumento do pH) produzida quando ocorre:

Aumento da pHCO₃,

Diminuição da pCO₂, provocada por uma hiperventilação

pCO₂ (pressão de dióxido de carbono)

CO₂+H₂O = H₂CO₃ (ácido carbónico) = HCO₃⁻ + H⁺

A quantidade de protões que é lido no potenciómetro

pHCO₃

É calculada pela fórmula: pHCO₃ = pH – pCO₂

SO₂ (saturação de oxigénio)

A saturação de oxigénio é a quantidade de oxigénio que a hemoglobina consegue ligar para formar oxi-hemoglobina, e ser transportado, reflecte a quantidade de oxigénio realmente disponível nos tecidos.

É a relação entre o volume de oxigénio transportado / volume máximo de oxigénio que hemoglobina pode transportar.

4.3 ESPECTROFOTOMETRIA

Quando o reagente é adicionado a uma amostra, a reacção resultante faz com que a mistura seja sujeita a uma alteração óptica.

A medição da alteração da densidade óptica desta mistura permite calcular um resultado.

A concentração do analito a ser medido é proporcional a alteração óptica.

A densidade óptica é medida passando um feixe de luz branca através da mistura e medindo a quantidade de absorvância. Este valor é seguidamente utilizado para o cálculo do resultado.

(7)

4.3.1 Tipos de Brancos

4.3.1.1 Branco do Reagente (Ajuste Zero)

Uma vez que os reagentes possuem algumas características ópticas intrínsecas, a Densidade Óptica dos reagentes deve ser sempre medida antes de serem utilizados para análise. Tal é conseguido utilizando o reagente para testar uma amostra sem analito, i.e., água desmineralizada. A densidade óptica resultante chama-se Branco do Reagente. O branco de reagente é usado pelo analisador para compensar qualquer interferência que a cor do reagente possa ter na determinação da densidade óptica final das reacções.

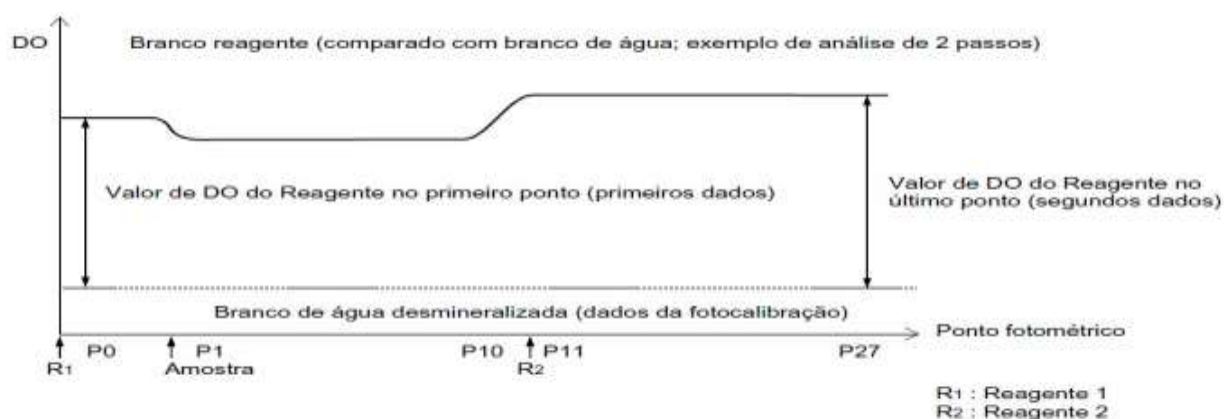


Figura 6 - Branco do reagente.

4.3.1.2 Branco da amostra

$$DO \text{ calculada} = DO \text{ do teste colorimétrico} - [DO \text{ do Branco amostra}]$$

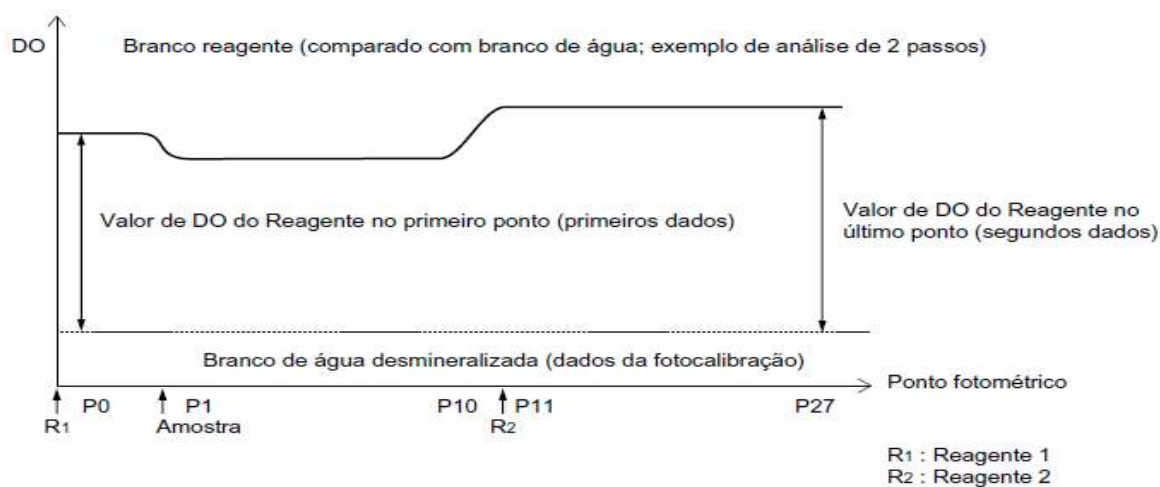


Figura 7 - Branco da amostra.

4.3.2 Reacção de ponto final

Existem três tipos de reacções de ponto final.

4.3.2.1 Um Ponto

É uma reacção de ponto final que permite determinar a densidade óptica duma reacção a partir da DO medida num determinado ponto de leitura.

$$DO \text{ da reacção} = DO \text{ (no ponto de leitura)} - DO0 \text{ (no ponto 0)}$$

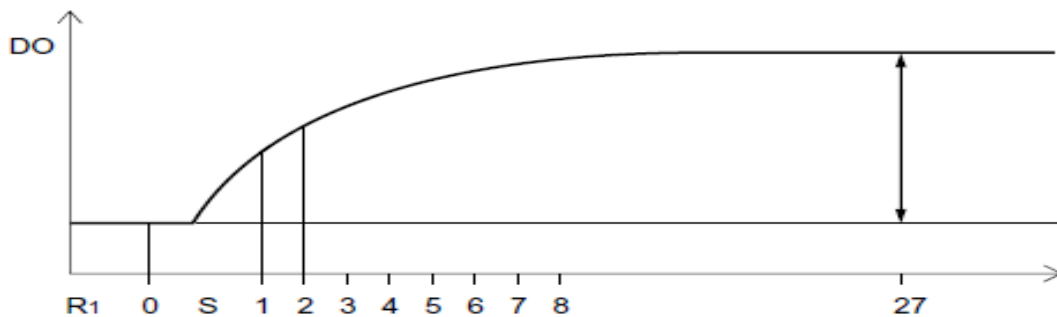


Figura 8 - Reacção de ponto final, um ponto.

4.3.2.2 Dois pontos (Método com Branco automático)

Permitem o ajuste do branco amostra. Os valores da DO (incluindo o branco amostra) antes da adição do reagente 2 são eliminados. Aos valores calculados, após adição do reagente 2, devem ser subtraídos os valores de DO obtidos neste canal de Branco. Qualquer contributo, para a DO final da reacção, da amostra (turvação, icterícia, etc.) é removido no intuito de melhorar a fiabilidade da medição.

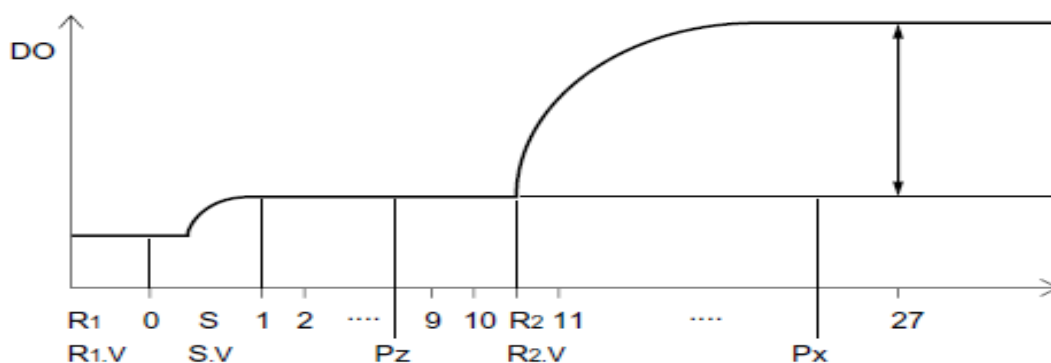


Figura 9 - Reacção de ponto final, dois pontos.

4.3.3 Reacção cinética

Existem dois tipos de reacções cinéticas:

4.3.3.1 Cinética normal

Mede a variação da DO por minuto. Através do método de minimização do quadrado dos desvios é calculada a média da variação da DO entre cada dois pontos fotométricos.

É necessário que pelo menos três pontos consecutivos estejam dentro do limite de DO definido. Se não existe período de instabilidade e a reacção for anormalmente rápida os pontos de leitura anteriores ao ponto inicial definido podem ser utilizados.

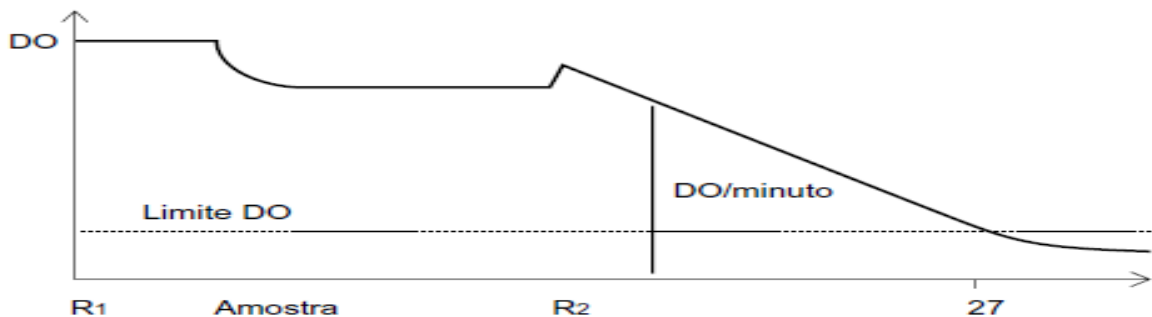


Figura 10 - Cinética normal.

4.3.3.2 Cinética dupla

Mede a variação da DO por minuto. Através do método de minimização do quadrado dos desvios é calculada a média da variação da DO entre cada dois pontos fotométricos. De seguida, o sistema obtém a evolução da densidade óptica por minuto através da seguinte expressão de cálculo.

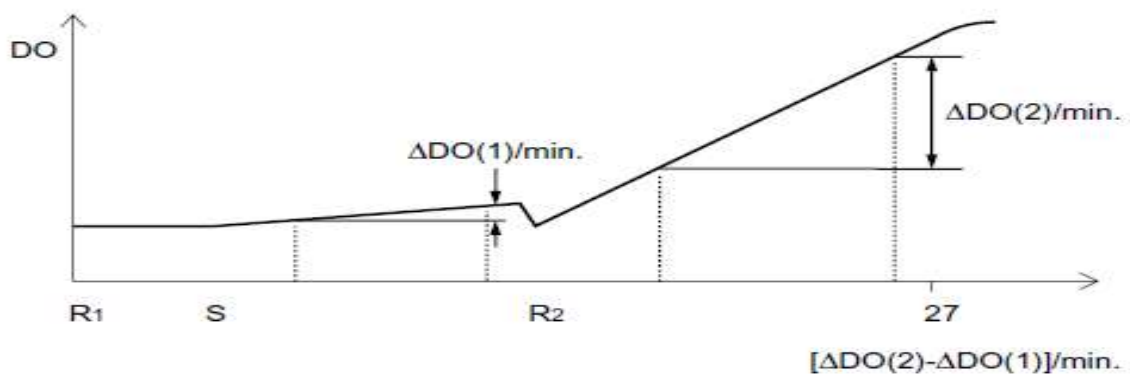


Figura 11 - Cinética dupla.

4.3.4 Reacção tempo fixo

Este método determina a diferença entre as densidades ópticas duma reacção em dois instantes específicos (8).

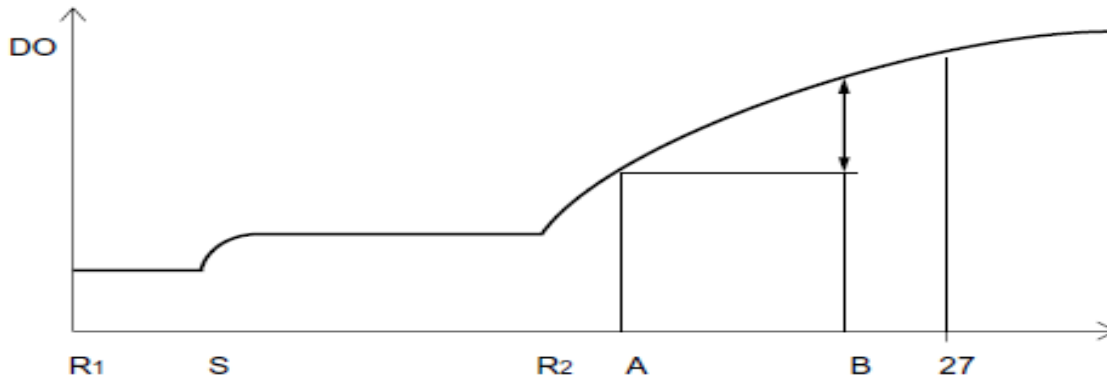


Figura 12 - Reacção tempo fixo.

4.3.4.1 Dupla reacção de tempo fixo (Branco automático)

DO da reacção = DO_b – DO_a

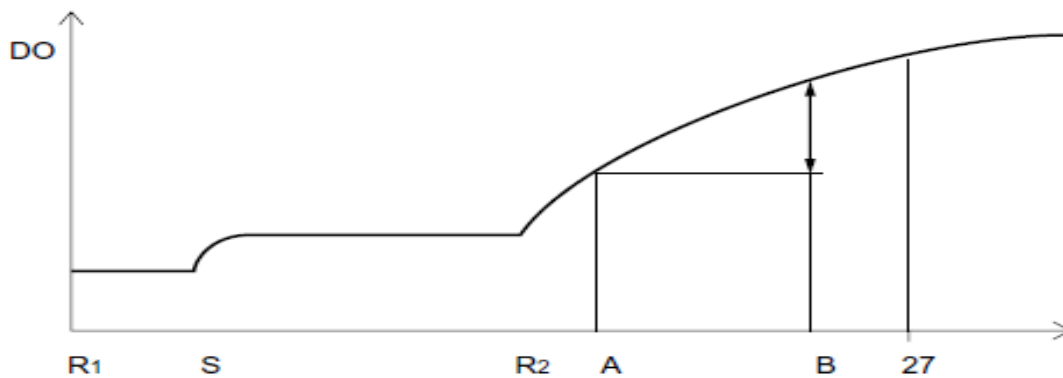


Figura 13 - Dupla reacção de tempo fixo.

4.3.5 OLYMPUS AU5400 BECKMAN COULTER



Figura 14 - OLYMPUS AU5400 BECKMAN COULTER.

Este sistema realiza análises automáticas de amostras de soro, plasma, urina, fluido cérebroespinal e outros fluidos do organismo.

4.3.5.1 Determinações Olympus Au5400 Beckman Coulter

Determinação	Método	Amostra
Glucose	Fotometria (UV), enzimático	Soro/Heparina/EDTA
Creatinina	Colorimetria, cinético	Soro/Heparina/EDTA
Ureia	Fotometria (UV), cinético	Soro/Heparina/EDTA
Acido Úrico	Colorimetria, enzimático	Soro/Heparina/EDTA
Proteínas totais urina	Colorimetria	Urina/LCR
Albumina	Colorimetria	Soro/Heparina/EDTA
Proteínas totais	Colorimetria	Soro/Heparina/EDTA
ALT	Fotometria (UV), cinético	Soro/Heparina/EDTA
AST	Fotometria (UV), cinético	Soro/Heparina
ALP	Colorimetria	Soro/Heparina
Gama-GT	Colorimetria, cinético	Soro/Heparina/EDTA
Bilirrubina directa	Colorimetria	Soro/Heparina
Bilirrubina total	Colorimetria	Soro/Heparina
Amilase	Colorimetria, cinético	Soro/Heparina/Urina
Lípase	Colorimetria, cinético	Soro/Heparina
Colesterol	Colorimetria, enzimático	Soro/Heparina/EDTA
HDL	Colorimetria, enzimático	Soro/Heparina
LDL	Colorimetria, enzimático	Soro/Heparina
Tg	Colorimetria, enzimático	Soro/Heparina/EDTA

Apo A I	Imunoturbidimetria	Soro
Apo B	Imunoturbidimetria	Soro
CRP	Imunoturbidimetria	Soro/Heparina/EDTA
LDH	Fotometria (UV), cinético	Soro/Heparina
CK	Fotometria (UV), cinético	Soro
Cálcio	Colorimetria	Soro/Heparina/EDTA
Fósforo inorgânico	Fotometria (UV)	Soro/Heparina
Mg	Colorimetria	Soro/Heparina
Ferro	Colorimetria	Soro/Heparina
Ferritina	Imunoturbidimetria	Soro/Heparina/EDTA
Transferrina	Imunoturbidimetria	Soro/Heparina/EDTA
ASO	Imunoturbidimetria	Soro
Colinestrase	Colorimetria, cinético	Soro/Heparina
L-Lactato	Colorimetria, enzimático	Fluoreto
Carbamazepina	Imunoenzimático	Soro/Heparina/EDTA
Digoxina	Imunoturbidimetria	Soro
Fenobarbital	Imunoenzimático	Soro/Heparina/EDTA
Fenitoína	Imunoenzimático	Soro/Heparina/EDTA
Teofilina	Imunoenzimático	Soro/Heparina/EDTA
Ac. Valproíco	Imunoenzimático	Soro/Heparina/EDTA

4.3.5.2 Parâmetros analisados pelo Olympus Au 5400 Beckman Coulter

4.3.5.2.1 Marcadores do metabolismo dos hidratos de carbono

Glucose

Diagnóstico e monitorização de Diabetes *Mellitus*

4.3.5.2.2 Marcadores da função renal

Creatinina

Diagnóstico e tratamento de doenças renais; útil na avaliação de função glomerular e monitorização da diálise renal.

Ureia

Auxiliar no diagnóstico de patologias renais, como glomerulonefrite aguda, nefrite crónica, necrose tubular e nefrosclerose.

Ácido úrico

Diagnóstico e tratamento de diversas perturbações renais e metabólicas; tratamento de doentes a receber fármacos citotóxicos.

Proteínas totais na urina e LCR

Detecção da permeabilidade acrescida da barreira hematoencefálica no LCR; diagnóstico e tratamento de patologias renais na urina.

4.3.5.2.3 Marcadores da função hepática

Albumina

Diagnóstico de hiperalbuminemia na desidratação e hipoalbuminemia em patologias do fígado ou do rim.

Proteínas totais

Diagnóstico e tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, rins, medula óssea bem como perturbações metabólicas e nutricionais.

ALT (Alanina amino transferase)

Indicador de doença do parênquima do fígado, hepatite, cirroses e hepatite vírica.

AST (Alanina amino transferase)

Diagnóstico diferenciação e monitorização de doenças hepatobiliares, enfarte do miocárdio e lesão do músculo-esquelético.

ALP (Fosfatase alcalina)

Alterações do metabolismo ósseo e doenças obstrutivas do pâncreas.

Gama-Glutamil Transferase (GGT)

Obstrução biliar intra-hepática ou pós-hepática, hepatite infecciosa, pancreatite aguda e crónica, marcador de alcoolismo.

Bilirrubina directa

Diagnóstico de icterícia hepática e pós-hepática e carcinoma hepatocelular.

Bilirrubina total

Diagnóstico de doença hepática, obstrução das vias biliares e doenças hemolíticas.

Amilase

Diagnóstico de pancreatite aguda e outras doenças pancreáticas.

Lípase

Diagnóstico de pancreatite aguda e crónica.

4.3.5.2.4 Marcadores do metabolismo lipídico

Colesterol total

Avaliação do risco de doenças cardiovasculares e estudo de hiperlipemias.

HDL – Colesterol

Avaliação do risco de doenças cardiovasculares, monitorização de indivíduos durante o tratamento.

LDL-Colesterol

Avaliação do risco de doenças cardiovasculares.

Triglicéridos

Estudo das hiperlipemias e doenças metabólicas.

Apo lipoproteína A I

Estudo das hiperlipemias, doenças das artérias coronárias devido a reduzidas concentrações de HDL colesterol.

Apolipoproteína B

Níveis elevados estão associados a um aumento do risco da doença das artérias coronárias.

4.3.5.2.5 Marcadores inflamatórios

Proteína C Reactiva (CRP)

Associada a lesão, infecção, inflamação cirurgia ou proliferação neoplásica.

Lactato Desidrogenase (LDH)

Auxiliar no diagnóstico e tratamento de acidose láctica e distúrbios metabólicos ou relativos a drogas ou toxinas.

CK (Creatine Kinase)

Diagnóstico e tratamento de enfarte agudo de miocárdio, indicador mais sensível de lesões musculares.

4.3.5.2.6 Marcadores do metabolismo ósseo

Cálcio

Diagnóstico de doenças ósseas ou doença renal crónica.

Fósforo inorgânico

Alteração da função renal ou da paratiróide.

Magnésio

Baixos níveis de magnésio associam-se a insuficiência renal, diabetes, alcoolismo, pancreatite, doenças da tiróide e da paratiróide.

4.3.5.2.7 Marcadores do metabolismo do ferro

Ferro

Importante no estudo de anemias.

Ferritina

Importante na distinção entre deficiência em ferro ou anemia.

Transferrina

Transporte de ferro, diagnóstico diferencial de anemia; verifica-se um aumento da transferrina com a anemia e com a deficiência de ferro.

4.3.5.2.8 Marcador de infecção

Anti-estreptolisina O (ASO)

Determina uma hemolisina produzida pelo *Streptococcus pyogenes*.

4.3.5.2.9 Outros indicadores

Colinesterase

Avaliação no acompanhamento de pacientes com intoxicação por organofosforados.

L-Lactato

Meio auxiliar de diagnóstico e tratamento de acidose láctica e distúrbios metabólicos ou relativos a drogas ou toxinas.

4.3.5.2.10 Drogas terapêuticas

Carbamazepina

Fármaco anticonvulsivo; monitorização terapêutica.

Digoxina

Fármaco glicosídeo cardíaco utilizado no tratamento de doentes com insuficiência cardíaca congestiva.

Fenobarbital

Fármaco anticonvulsivo e sedativo. Utilizado na monitorização de forma a garantir uma terapia adequada.

Fenitoína

Fármaco anticonvulsivo e também antiarrítmico usado no tratamento de epilepsia.

Teofilina

Utilizada no tratamento da asma, doença pulmonar obstrutiva e apneia do recém-nascido.

Acido valpróico

Fármaco anticonvulsivo de largo espectro.

4.3.5.2.11 Marcadores LIH

Lipemia, icterícia e hemólise

Uma série de doenças e condições pré-analíticas podem resultar em concentrações acrescidas de cromogénios como a bilirrubina, hemoglobina e lípidos em fluidos corporais.

Os cromogénios podem interferir nos ensaios fotométricos.

Devemos identificar substâncias potencialmente interferentes nestas amostras.

(LIP: Lipemia/turvação, ICT: Bilirrubina e HEM: Hemoglobina) e a concentração aproximada do interferente (por exemplo: +, ++, ++++).

4.4 POTENCIOMETRIA

Esta unidade mede a diferença de potencial entre os eléctrodos selectivos e um eléctrodo de referência. Este potencial é gerado por iões da amostra que passam através de um eléctrodo selectivo de iões. Cada eléctrodo responde selectivamente a um único tipo de ião.

O objectivo do teste consiste em calcular a concentração de cada tipo de ião presente na amostra. e na solução MID-standard. A concentração de iões é corrigida calculando o desvio obtido na medição da Solução Mid-Standard. A Solução Mid-Standard é medida após todas as amostras.

3 tipos de eléctrodos selectivos:

- Eléctrodo Na
- Eléctrodo K
- Eléctrodo Cl

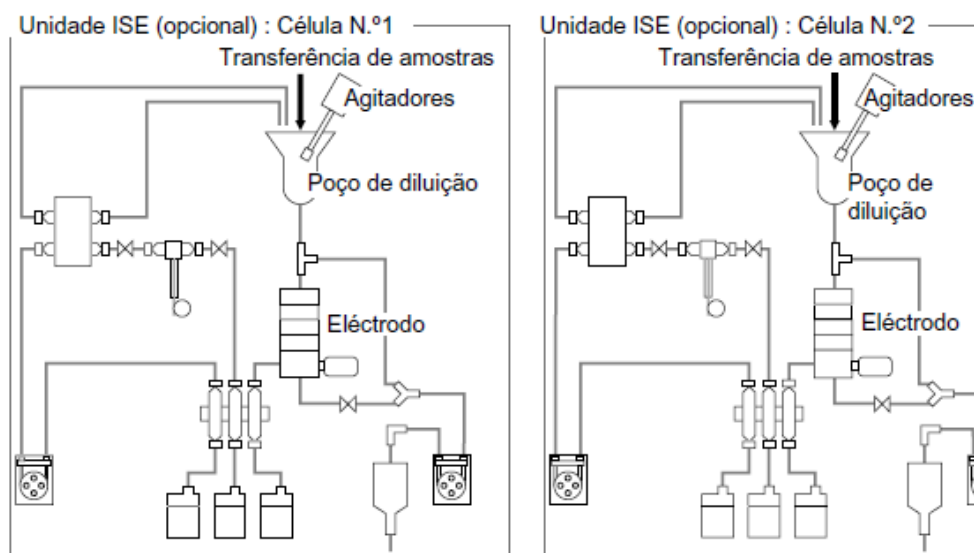


Figura 15 - Esquema de aparelho de potenciometria.

4.4.1 Electrólitos: sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloro (Cl⁻)

Os electrólitos afectam a maioria dos processos metabólicos. Servem para manter a pressão osmótica e a hidratação de vários compartimentos de fluidos corporais, pH adequado do organismo e regulação das funções cardíaca e muscular apropriadas.

Os electrólitos também se encontram envolvidos nas reacções oxidação-redução e participam como partes essenciais ou, cofactores, nas reacções enzimáticas.

A determinação pode ser em soro ou plasma heparinizado (heparina de lítio). Devem ser evitadas amostras hemolisadas e altamente lipémicas. O potássio dos glóbulos vermelhos espalha-se no soro/plasma dando valores incorrectamente elevados.

A metodologia utilizada é potenciometria indirecta, determinação quantitativa (indirecta) de concentrações de sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloro (Cl⁻) no soro, plasma e urina humanos.

O princípio do ensaio para Na⁺, K⁺ e Cl⁻ integra eléctrodos de membrana éter-coroa para sódio e potássio e uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o cloreto específicos para cada ião de interesse na amostra.

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 (9).

4.5 INMUNOENSAIO DE MICROPARTÍCULAS POR QUIMILUMINESCENCIA

O CMIA (imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência) é uma tecnologia utilizada para determinar a presença de antigénios, anticorpos e analitos em amostras.

Este é um método de detecção que tem como finalidade a medição e quantificação da concentração de analitos, assim como, detectar antigénios e anticorpos em amostras.

Os reagentes necessários incluem micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura (antigénio, anticorpo ou partícula viral) específicas para a medição do analito; conjugado marcado com acridinio; solução pre-activadora e solução activadora. (10)

4.5.1 ARCHITECT I-2000 SR ABBOTT



Figura 16 - ARCHITECT I-2000 SR ABBOTT.

Os princípios de funcionamento do ARCHITECT *i* System incluem uma síntese sobre a tecnologia CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay / imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência), o processamento do ensaio e o sistema óptico utilizado para a medição de analitos.

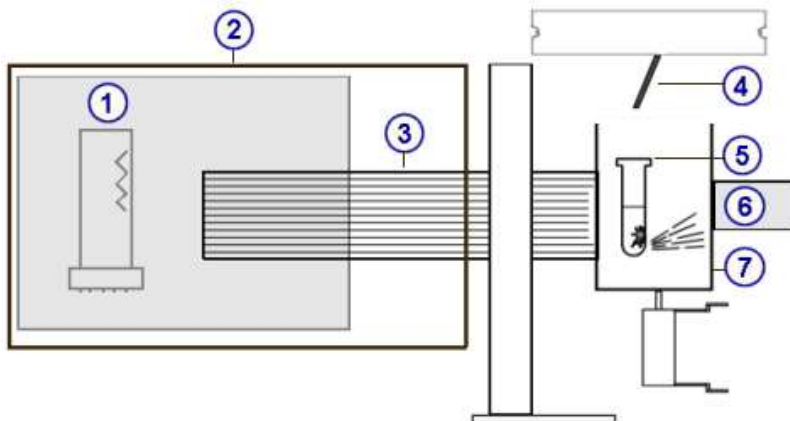


Figura 17 - Esquema do aparelho de quimiluminescência.

4.5.1.1 Determinações Architect i-2000 sr Abbott

Determinação	Método	Amostra
BNP	CMIA	Heparina/EDTA
Troponina I	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
Mioglobina	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
CK-MB	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
TSH	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
T4 total	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
T3 total	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
T4 livre	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
T3 livre	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
Folatos	CMIA	Soro
Vitamina B12	CMIA	Soro
Gentamicina	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
Vancomicina	CMIA	Soro/Heparina/EDTA
Metotrexato	CMIA	Soro/Heparina/EDTA

CMIA - Imunoensaio por quimiluminescência

4.5.1.2 Parâmetros analisados pelo Architect i-2000 sr Abbott

4.5.1.2.1 Marcadores da função cardíaca

Peptídeo natriurético (BNP)

Informação útil para o diagnóstico e tratamento da disfunção do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca.

Troponina I

Papel importante na regulação da contração muscular. É libertada na corrente sanguínea algumas horas após o enfarte agudo do miocárdio ou dano isquémico.

Mioglobina

Presente tanto no músculo cardíaco como no esquelético. Em caso da lesão destes músculos, ocorre a sua libertação na corrente sanguínea.

Creatina quinase (CK-MB)

Na ausência de traumatismo muscular grave, pode indicar danos cardíacos inclusive, enfarte agudo do miocárdio.

4.5.1.2.2 Marcadores da função tireóidea

TSH

Auxilia no diagnóstico do estado da tireóide. Importante no diagnóstico e tratamento de patologias da tireóide.

T4 total

Fornecer indicações fiáveis do estado da tireóide.

T3 total

Regula o estado da tireóide e de doenças provocadas pelo défice de iodo.

T4 Livre

Fornecer indicações fiáveis do estado da tireóide.

T3 Livre

Auxílio para a diferenciação da forma de hipertiroidismo e monitorização de terapêutica anti tireóidea.

4.5.1.2.3 Marcadores da síntese da hemoglobina

Folatos

Níveis baixos no soro estão presentes em casos de anemia megaloblástica e em situações de gravidez normal avançada, devido a uma necessidade excessiva de folhatos.

Vitamina B12

Níveis baixos significam anemia megaloblástica, insuficiência de ferro gravidez, vegetarianismo, gastrectomia. Níveis elevados significam insuficiência renal, doenças hepáticas e doenças mieloproliferativas.

4.5.1.2.4 Drogas terapêuticas

Gentamicina

Monitorização e tratamento de doenças bacterianas.

Vancomicina

Monitorização e tratamento de doenças bacterianas.

Metotrexato

O metotrexato é um fármaco antineoplásico utilizado isoladamente ou em combinação com outros fármacos antineoplásicos no tratamento da leucemia e de outras patologias.

4.6 IMUNOENSAIO POR ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA (ECLIA)

A electroquímiluminiscencia é produzida quando uma reacção química gera uma espécie excitada electronicamente, a qual emite luz ao voltar a um estado de menor energia. A molécula excitada pode ser o produto da reacção entre o analito e um afrente reactivo apropriado.

Usada em combinação com a tecnologia de immunoensaio, a luz produzida pela reacção, dependendo do tipo de immunoensaio utilizado, indica a quantidade de analito presente na amostra. A quantificação do analito a analisar é realizada por um fotomultiplicador que quantifica a quantidade de luz emitida, após indução de uma emissão quimiluminescente por aplicação de corrente eléctrica ao eléctrodo que continha o complexo formado pelo analito e o agente reactivo apropriado.

O princípio do método difere mediante o parâmetro a analisar, podendo ser:

Competitivo - na primeira incubação forma-se um imunocomplexo entre os antigénios presentes na amostra e os anticorpos biotinilados que são acrescentados. Na segunda incubação é adicionado ao imunocomplexo micropartículas revestidas de estreptovidina marcadas com um complexo de reuténio, formando-se assim o conjugado.

Sandwich - na primeira incubação forma-se um imunocomplexo entre os antigénios presentes na amostra e os anticorpos biotinilados e específicos, que são acrescentados. Na segunda incubação são adicionadas ao imunocomplexo micropartículas revestidas de estreptovidina marcadas com um complexo de reuténio, formando-se assim o conjugado.

(11)

4.6.1 COBAS E411 ROCHE



Figura 18 - COBAS E411 ROCHE.

4.6.1.1 Determinações Cobas e411

Determinação	Método	Amostra
Cortisol	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Beta-Crosslaps	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
PTH	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Oste calcina	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Vitamina D	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Insulina	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Peptídeo C	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
ACTH	ECLIA	EDTA
Testosterona	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Estradiol	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
LH	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA / Fluoreto
FSH	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA / Fluoreto
Prolactina	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Progesterona	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA / Fluoreto
SHGB	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
DHEA	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA / Fluoreto
NSE	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
CEA	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Anti-TG/Anti-TPO	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
CA 15-3	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
CA 19-9	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
CA 125	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
CA 72-A	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
Beta-hCG total	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
PSA total	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA
PSA livre	ECLIA	Soro/Heparina/EDTA

ECLIA - Imunoensaio por electroquimioluminiscência.

4.6.1.2 Parâmetros Cobas e411

4.6.1.2.1 Marcadores endocrinologia

Cortisol

Determinação importante para o diagnóstico da função ou da disfunção da supra-renal, da hipófise e do hipotálamo.

Beta-CrossLaps

Ensaio realizado como auxiliar na monitorização de terapêuticas anti-reabsortivas.

Osteocalcina

Utilizada como marcador de reconstituição óssea.

Hormona Paratiróide (PTH)

Juntamente com a calcitonina, a PTH mantém constantes o nível de cálcio no sangue. Uma alteração da secreção da PTH provoca o aumento (hipercalcemia) ou a diminuição (hipocalcemia) do nível de cálcio no sangue.

Vitamina D

Vitamina essencial para a saúde dos ossos, funciona como auxiliar do metabolismo ósseo.

Insulina

Determinação em pacientes com sintomas de hipoglicemia. Utilizada também para determinar quocientes de glicose/insulina e para avaliar problemas relacionados com a secreção de insulina.

Peptídeo C

A sua determinação contribui para o diagnóstico diferencial de hipoglicemia de modo a garantir o tratamento adequado para o paciente.

Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

Determinação útil no diagnóstico diferencial da doença de Cushing da pituitária, tumores da pituitária produtora de ACTH autónoma hipotuitarismo com deficiência de ACTH e síndrome de ACTH ectópico.

4.6.1.2.2 Marcadores fertilidade

Testosterona

A determinação nas mulheres auxilia no diagnóstico de diversas patologias; no homem é realizada esta determinação quando se suspeita de redução da produção de testosterona.

Estradiol

Determinação importante em estudos ou avaliação da fertilidade.

FSH / LH

Determinação importante para reconhecer perturbações funcionais no sistema hipotálamo-hipófise-gónadas e quando estamos na presença de patologias como ovários poliquísticos, menopausa entre outras.

Prolactina

Diagnóstico dos ciclos anovulatórios, a amenorreia, hiperprolactinemia, e da galactorreia, ginecomastia, e azoospermia. Determinação também importante no diagnóstico de cancro da mama e em caso de tumores da hipófise.

Progesterona

A determinação utilizada no diagnóstico de fertilidade para a detecção de ovulação e avaliação da fase lútea.

SHGB

Proteína que transporta a testosterona e o estradiol no sangue. É um importante indicador de uma acção androgénica excessiva/crónica em que os níveis de androgénio estão normais mas em que os sinais clínicos parecem indicar androgénios em excesso.

DHEA

Indicador importante no despiste de hirsutismo e virilismo.

4.6.1.2.3 Marcadores tumorais

NSE (Enolase neuroespecífica)

Monitorização da terapêutica e da evolução de doentes com tumores sobretudo carcinoma brônquico e neuroblastomas.

CEA (Antigénio carciembrionario)

Auxiliar no prognóstico e tratamento de doentes com cancro em que se verifica variação da concentração de CEA.

Anti-TG / Anti-TPO

Auxiliar no diagnóstico de doença tiroideia auto-imune.

CA 15-3

Tratamento de cancro da mama nos estádios II e III.

CA 19-9

Diagnóstico e tratamento de adenocarcinoma do pâncreas.

CA 125

Monitorização da resposta terapêutica do cancro do ovário.

CA 72-A

Monitorização da terapêutica de carcinomas do estomago e dos ovários.

Beta-hCG total

Diagnóstico de carcinoma.

PSA total

Deteção e tratamento do cancro da próstata.

PSA livre

Diferenciação entre cancro da próstata e uma patologia benigna.

4.7 URINAS

4.7.1 Equipamentos

Aution Max AX 4030

Sysmex UF 1000 i

SediMax

Centrifuga

Microscópio Óptico

4.7.2 Exame sumário de urina

As urinas são triados, e avaliam-se os critérios de aceitabilidade.

No laboratório do CHSJ, este exame compreende dois métodos distintos realizados sequencialmente nos equipamentos Aution Max™ - AX – 4030 e Sysmex UF – 1000 i.

4.7.3 Aution Ax 4030 Max

Análise físico-química da urina:

Tonalidade da cor: análise da reflexão de luz

Turvação: análise por dispersão de luz

Densidade: refractometria por reflexão

Tira de teste: análise semi-quantitativa de glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, sangue, cetonas, nitritos, leucócitos mediante a utilização de uma tira de plástico, com áreas de reagentes para as determinações pretendidas e por uma base de calibração.

O método baseia-se na análise da refletância por comprimento de onda duplo excepto para a determinação do sangue no que se utiliza um comprimento de onda único:

- Glicose: a detecção baseia-se na reacção glicose oxidase – peroxidase – cromogénio.
- Proteínas: este teste baseia-se na reacção de erro da proteína do indicador de pH.
- Bilirrubina: obtém-se uma cor azo castanho-avermelhada através do acoplamento da bilirrubina com um sal de diazónio.
- Urobilinogénio: *idem*.
- pH: o papel de teste contém indicadores que alteram a cor entre pH 4,5 e pH 9.
- Sangue: a detecção baseia-se na actividade da pseudoperoxidase da hemoglobina.
- Cetonas: o teste baseia-se no princípio da reacção legal.
- Nitritos: o teste baseia-se no princípio da reacção de Griess.
- Leucócitos: a detecção baseia-se na actividade da esterase nos leucócitos. (12)

4.7.4 Uf 1000 I Sysmex

Este equipamento usa as tecnologias de Citometria de Fluxo e Impedância Eléctrica para obter dados celulares que permitem a classificação e quantificação dos cinco elementos organizados da amostra de urina:

- RBC (eritrócitos)
- WBC (leucócitos)
- EC (célula epitelial)
- CAST (cilindro)
- BACT (bactérias)

Este analisador discrimina e classifica cada partícula da amostra utilizando os princípios segundo os quais a passagem de cada partícula corada no fluxo laminar é iluminada com luz laser para que cada partícula dê origem a luz dispersada frontal, luz dispersada lateral e fluorescência lateral, cujos sinais são convertidos em sinais eléctricos posteriormente detectados.

Em caso de discrepância entre os resultados obtidos por métodos distintos ou, nos casos em que a informação clínica o justifique, procedemos ao estudo do Sedimento Urinário.

4.7.5 Sedimento urinário

4.7.5.1 Sedimax

É um analisador totalmente automatizado que homogeneiza e centrifuga um volume de 0,2 ml de amostra durante 10 segundos a 2000 rpm. Depois da centrifugação a câmara através do microscópio incorporado fotografa imagens do sedimento (15 campos visuais do SediMax™ correspondem a 10 campos visuais do M.O.) que são projectadas num ecrã incorporado. O *software* do equipamento permite detectar as seguintes partículas da urina:

- RBC (glóbulos vermelhos)
- WBC (glóbulos brancos)
- HYA (cilindros hialinos)
- PAT (cilindros patológicos)
- EPI (células epiteliais)
- NEC (células epiteliais de transição e células epiteliais tubulares renais)
- BAC (bactérias)
- YEA (leveduras)

- CRY (cristais): oxalato de cálcio monohidratado, oxalato de cálcio dihidratado, cristais de ácido úrico, trifosfatos
- MUC (muco)
- SPRM (espermatozóides) (13)

4.7.5.2 Microscopia do sedimento urinário

Após centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos.

Utilização do Sistema Uriglass para a visualização e contagem de elementos figurados da urina ao M.O.

4.7.6 Outras determinações

4.7.6.1 Tox/See Drug Screen Test

Teste rápido de detecção simultânea e qualitativa de drogas múltiplas e dos seus metabolitos na urina humana (em determinadas concentrações). A detecção baseia-se na Imunocromatografia de fluxo lateral. Pode ser detectada a presença de:

- Anfetamina
- Barbitúricos
- Benzodiazepinas
- Cocaína
- Maconha
- Metadona
- Metanfetamina
- Metilenedioximetanfetamina (MDMA)
- Opiáceos
- Oxiconona
- Fenciclidina
- Antidepressivos Tricíclicos

○ **Teste de despiste de gravidez:** utiliza o método Imunocromatográfico.

○ **Determinação do pH urinário com tiras indicadoras de pH**

○ **Determinação da Densidade Urinária com refractómetro**

4.7.7 Controlo de qualidade urinário

O Sector das Urinas do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ realiza Programas de Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.).

4.7.7.1 C.Q.I. urinário

Realiza-se diariamente no início do turno da manhã.

Equipamento Aution Max™ - AX – 4030:

- Processamento de dois níveis de controlo comerciais cujos resultados são impressos em papel e arquivados.

Equipamento Sysmex™ UF – 1000 i:

- Processamento de dois controlos comerciais de nível baixo e de nível alto.

Os dados obtidos são associados a uma Carta de C.Q. e podemos facilmente consultar os Gráficos de Levey-Jennings e os Gráficos de Radar no ecrã incorporado ao equipamento.

4.8 CONTROLO DE QUALIDADE

A Área de Química Clínica do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ participa em Programas de Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.) e de Avaliação Externa de Qualidade (A.E.Q.).

4.8.1 C.Q.I.

Realiza-se diariamente no início do turno da manhã.

Equipamentos Olympus AU 5600

-Processamento de um, dois ou três níveis de controlo comerciais consoante o parâmetro analisado.

Os dados obtidos são associados a uma Carta de C.Q. e podemos facilmente consultar os Gráficos de Levey-Jennings incorporados no ecrã do equipamento.

Equipamentos Architect Plus i2000 / Cobas E41 I

Processamento de controlos comerciais de diferentes níveis (baixo, médio e alto)

C.Q.I. tem por objectivo monitorizar a variabilidade analítica intralaboratorial, avaliando a precisão dos métodos analíticos de forma a garantir a sua reprodutibilidade.

Graças a estes programas é possível detectar a ocorrência de erros aleatórios e de forma precoce corrigi-los ou minimizá-los.

Alguns exemplos são: Interferências no equipamento automatizado, nos reagentes ou na própria amostra ou erro do operador.

4.8.2 A.E.Q.

Realiza-se com base na participação nos Programas do RIQAS para a maioria das determinações realizadas na Área de Química Clínica.

A A.E.Q. tem por objectivo avaliar a variabilidade analítica interlaboratorial, analisando a exactidão dos resultados. Graças a estes programas é possível detectar a ocorrência de erros sistemáticos e, de forma atempada, corrigi-los ou minimizá-los. Alguns exemplos são:

-Alteração dos volumes de amostra ou reagentes utilizados nos equipamentos automatizados por mau funcionamento do sistema de pipetagem

-Deterioração dos reagentes

-Uso de um novo lote de calibrador ou reagente

-Alteração dos valores do calibrador

-Má preparação dos reagentes ou calibrador

-Deterioração dos reagentes ou calibrador

-Alteração da temperatura de incubação

-Alteração da temperatura de armazenamento dos reagentes

-Deterioração da fonte luminosa

-Alterações no procedimento de um operador para outro.

4.8.3 Avaliação da imprecisão e da inexactidão

A prática dos Análises Clínicas no CHSJ está associada à participação em Programas de Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.) e de Avaliação Externa de Qualidade (A.E.Q.).

Estes programas constam da execução de determinados procedimentos cujo objectivo é a detecção de possíveis erros e consequentemente a adoção de medidas que visam eliminá-los, ou pelo menos minimizá-los, antes da libertação dos resultados analíticos.

Cada Área específica tem procedimentos próprios de avaliação da Qualidade.

A participação do Laboratório nos Programas de C.Q.I. e A.E.Q. tem por objectivo assegurar a credibilidade do Laboratório, gerando confiança nos resultados laboratoriais.

O C.Q.I. tem por fim medir a PRECISÃO (medida do grau de dispersão dos valores) do método em estudo, o que significa que visa obter sempre o mesmo resultado ao longo do tempo. Assim sendo, o C.Q.I. detecta o ERRO ALEATÓRIO. Estes programas de avaliação são realizados pelo próprio laboratório.

A A.E.Q. tem por fim medir a EXATIDÃO (medida do afastamento dos valores para o valor verdadeiro) do método em estudo, o que significa que visa obter um resultado igual ao obtido pelo método de referência podendo dar indicações sobre a estabilidade do método ao longo do tempo. Assim sendo, a A.E.Q. detecta o ERRO SISTEMÁTICO. Estes programas de avaliação são realizados pela Entidade Organizadora (p.e. NEQAS, RIQAS).

Para a detecção da IMPRECISÃO e da INEXATIDÃO dos métodos instrumentais de análise utilizados no Laboratório aplicamos as REGRAS DE WESTGARD.

5.IMUNOLOGIA

O presente relatório refere-se ao estágio realizado na valência de Imunologia. A maioria dos parâmetros são realizados automaticamente, recorrendo a vários aparelhos: Mago Plus-Diamedix, Triturus-Grifols, Mini-Vidas-Biomerieux, Dimension Vista500-Siemens, Minicap- Sebia, e Hydrasis- Sebia.

Os sectores da imunologia são a autoimunidade, a serologia, a electroforese de proteínas e as imunofixações. Os aparelhos estão dispostos nas várias salas de trabalho do Departamento de Imunologia. Incluída neste sector, existe uma sala onde se encontra o microscópio de fluorescência.

As técnicas imunoquímicas e os imunoensaios estão baseados em reacções imunológicas antígeno-anticorpo. Estas reacções podem ser detectadas, por efeitos que produzem, tais como precipitação ou aglutinação.

No imunoensaio, com reagentes marcado são utilizados átomo ou moléculas chamadas indicadores ou marcadores, juntamente com o antígeno reactivo ou anticorpo mostram que ocorreu a reacção antígeno-anticorpo.

Os principais marcadores são isótopos radioactivos, enzimas, compostos fluorescentes e compostos luminescentes (14).

5.1 IMUNOFLUORESCENCIA

A Imunofluorescência (IF) tem sido e continua a ser uma técnica fundamental no laboratório clínico de auto-imunidade. O IF utiliza anticorpos que tem ligados fluorocromos ou compostos fluorescentes. Os principais fluorocromos utilizado em técnicas de imunofluorescência são o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a rodamina B.

Conjugados FITC emitem fluorescência verde maçã, e os de rodamina B, laranja brilhante. A fluorescência emitida a partir das secções de tecido ou células em cultura é observada com um microscópio de fluorescência. No caso das células, a fluorescência também pode ser medido com um citometro de fluxo.

Os testes de fluorescência podem ser directa ou indirecta.

5.1.1 Imunofluorescência direta

Na imunofluorescência direta (IFD) anticorpos marcados são aplicados numa secção de tecido ou é incubado com a preparação de células. Esta técnica é usada para localizar morfologicamente antígenos, e nos laboratórios de autoimunidade. É usado principalmente em dermatologia.

5.1.2 Imunofluorescência indirecta

Imunofluorescência indirecta (IFI) tem sido a técnica mais utilizada para detectar a maioria dos auto-anticorpos. Aqui, o soro é aplicado a um fatia de tecido ou cultura de células, e os auto-anticorpos presentes nos soros ligam-se aos antigénios das células correspondente.

Depois e lavado para remover os anticorpos que não tinham reagido. Em seguida, um anti-soro marcado com o composto fluorescente que se liga aos auto-anticorpos formando uma ligação tipo sanduíche. O excesso que não reagiu é removido por lavagem. A preparação e observada no microscópio de fluorescência e indica a presença de auto-anticorpos.

O padrão e a intensidade de fluorescência, é avaliada as amostras positivas devem ter um padrão de fluorescência e uma intensidade de fluorescência maior que o valor de limiar. Além disso, quanto maior é a intensidade da fluorescência, maior é a possibilidade de que tenha um significado clínico positivo. A intensidade da fluorescência e geralmente expressa sobre a forma de título, que é a diluição mais alta à qual se observa fluorescência.

Em ensaios de IF eles são utilizados como substratos de secções de tecidos animais ou humanos (15).

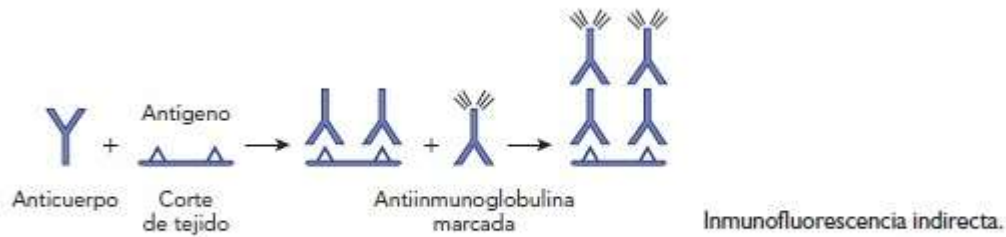


Figura 19 - Esquema imunofluorescência indirecta.

5.2 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) em que um dos componentes de reacção é fixo na superfície de uma fase sólida. Nesta técnica, uma alíquota de amostra é deixada para interagir com o anticorpo em fase sólida. Após a lavagem, um segundo anticorpo marcado com enzima é adicionado para formar uma Ac-Ag-Ac-enzima complexa. O excesso de anticorpo marcado com enzima livre é então removido por lavagem e o substrato é adicionado; a conversão de substrato é proporcional à quantidade de antigénio. Em imunoenaios, não é a especificidade de enzimas que é importante mas a sua sensibilidade. (16)

5.2.1 Elisa competitivo

Os anticorpos ligados à fase sólida podem unir-se tanto o antigénio na amostra ou com o analito marcado com enzima reagente.

À medida que a concentração do anticorpo ligado é pequena, o antigénio da amostra pode competir para sítios com o reagente de ligação antigénio marcado.

Quanto mais baixa for a concentração do analito na amostra, tanto maior a quantidade de antigénio marcado com enzima que se liga.

Após a incubação, as substâncias não ligadas são removidas por lavagem.

A actividade da enzima é inversamente proporcional à concentração da substância a analisar na amostra.

5.2.2 Elisa sanduíche

Pode ser realizada em um ou dois passos.

No sistema de uma etapa, a amostra é incubada conjuntamente com o segundo anticorpo marcado com enzima.

Enquanto no sistema de duas etapas, na primeira etapa se junta à quantidade total da substância na amostra com o anticorpo está em excesso e, no segundo, o segundo anticorpo marcado com a enzima que se liga a um segundo determinante é adicionada o analito antigénico ligado ao primeiro anticorpo.

Em ambos os casos, é formada uma sanduíche, e a actividade da enzima ligada ao complexo antigénio-anticorpo é directamente proporcional a concentração da substância a ser quantificado. (17)

5.2.3 MAGO PLUS DIAMEDIX



Figura 20 - MAGO PLUS DIAMEDIX.

Neste sistema são preparadas as lamínas para microscopia fluorescente automaticamente além de analisados a maioria dos parâmetros de autoimunidade.

Alem dos parametros analisados na autoimunidade este aparelho é utilizado tambem na serologia para a determinação de alguns virus e bacterias, mediante a utilização da reacção de imunofluorescência indireta, com antigenios específicos.

5.2.3.1 Determinações Mago Plus Diamedix

Autoimunidade

Parâmetro	Método	Equipamiento	Tipo de Amostra
Anticorpos anti-nucleares (ANA) (IgG)	IFI Laminas com substrato combinado de células Hep20-10 e fígado de primata, semi-quantitativo	Mago Plus-Diamedix; (Coloração automática de laminas)	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8° 14dias
Anticorpos contra antígenos extráveis nucleares (ENA): nRNP/Sm, SM, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1 (IgG)	ELISA Confirmação "++" Imunoblot (ANA Profile3 Euroline) qualitativo	Mago Plus-Diamedix; EuroBlot Master-Euroimmun	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8°, 14dias
Anticorpos anti DNA genómico (dsDNA) (IgG)	ELISA (Euroimmun), quantitativo	Mago Plus-Diamedix	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8° 14dias
Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA); Anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO) (IgG)	ELISA (Euroimmun), quantitativo	Mago Plus -Diamedix	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA); Anticorpos anti-PR3-hn-hr (IgG)	ELISA (Euroimmun), quantitativo	Mago Plus -Diamedix	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
Anticorpos anti-células parietais do estomago (APCA)	IFI Lâminas com substrato triplo (Euroimmun), qualitativo	Mago Plus – Diademix, (Coloração automática de laminas)	Soro
Anticorpos anti-LKM mitocôndrias (AMA) e anticorpos anti- músculo liso (ASMA)	IFI Lâminas com substrato triplo (Euroimmun),	Mago Plus – Diademix, (Coloração automática de laminas)	Soro

	qualitativo	AMA (+): Imunoblot em lâmina: anti-M2, M4, M9	
Anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (IgA e IgG)	ELISA (Euroimmun), qualitativo	Mago Plus - Diademix	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
Anticorpos anti-factor intrínseco (IgG)	ELISA (Euroimmun), qualitativo	Mago Plus - Diademix	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
CH100 (capacidade hemolítica)	ELISA, quantitativo	Mago Plus - Diademix	Soro
Imunocomplexos circulantes (CIC)	ELISA (Quanta Lite – CIq CIC), qualitativo	Mago Plus - Diademix	Soro Estabilidade: 2-8°, 1 semana 20°, períodos mais prolongados

Serologia

Atc. Herpes simplex 1 (IgM,IgG)	Mago
Atc. Herpes simplex 2 (IgM,IgG)	Mago
Atc.Virus Epstein Barr (EA IgG) (EBNA IgG)(CA IgM,IgG)	Mago
Atc.Parvovirus B19 (IgM)	Mago
Atc. Mycoplasma pneumoniae(IgM,IgG)	Mago
Atc.Chlamydia pneumoniae(IgM,IgG)	Mago
Atc.Coxiella burnetti(IgM,IgG)	Mago
Atc.Rickettsia conorii (IgM,IgG)	Mago

5.2.3.2 Parâmetros analisados pelo Mago Plus Diamedix

Autoimunidade

Anticorpos anti-nucleares (ANA)

Diagnóstico de muitas doenças auto-ímmunes, especialmente de forma reumática.

Anticorpos contra antígenos extrínsecos nucleares (ENA):

nRNP/Sm, SM, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1 (IgG)

Diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico, síndrome Sharp, síndrome de Sjogren, esclerose sistémica progressiva, polidermatomiosite.

Anticorpos anti DNA genómico (dsDNA) (IgG)

Diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico.

Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA);

Anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO) (IgG)

Diagnóstico de Arterite microscópica, poliartrite nodular e síndrome Churg-Strauss.

Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA);

Anticorpos anti-PR3-hn-hr (IgG)

Diagnóstico de granulomatose de Wegener.

Anticorpos anti-células parietais do estômago (APCA)

Diagnóstico da anemia perniciososa.

Anticorpos anti-LKM mitocôndrias (AMA) e músculo liso (ASMA)

Diagnóstica hepatite auto-imune, cirrose biliar primária e doenças reumáticas.

Anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (IgA e IgG)

Diagnóstico da Doença de Crohn.

Anticorpos anti-factor intrínseco (IgG)

Diagnóstico da anemia perniciososa.

CHI00 (capacidade hemolítica)

Anemias hemolíticas auto-imunes por activação do complemento.

Imunocomplexos circulantes (CIC)

Monitorização de Lupus eritematoso sistémico.

Serologia

Atc. Herpes simplex 1 (IgM, IgG) / Atc. Herpes simplex 2 (IgM, IgG)

Em mulheres grávidas, é transmitido para o feto, o que pode levar a morte intra-uterina, malformações e parto prematuro.

Atc. Virus Epstein Barr (EA IgG) (EBNA IgG) (CA IgM, IgG)

(EA) Early antigen; (EBNA) Nuclear antigens; (CA) Capsid antigen;

Provoca mononucleose e pode provocar danos no coração, olhos e fígado do feto.

Atc. Parvovirus B19 (IgM)

Em crianças provoca eritema com forma de borboleta, provocando extensão do exantema nos braços e as pernas.

Atc. Mycoplasma pneumoniae (IgM, IgG)

Infecção aguda respiratória, bronquite e pneumonia.

Atc. Chlamydia pneumoniae (IgM, IgG)

Doenças crônicas como asma brônquica, doenças coronárias e arteriosclerose.

Atc. Coxiella burnetti (IgM, IgG)

Diagnóstico Febre Q.

Atc. Rickettsia conorii (IgM, IgG)

Diagnóstico da febre escarionodular.

5.2.4 TRITURUS GRIFOLS



Figura 21 - TRITURUS GRIFOLS.

Neste equipamento são realizadas algumas determinações de autoimunidade por o método de ELISA. Ainda que são poucas determinações o número de amostras de cada uma de elas justifica o uso do aparelho.

5.2.4.1 Determinações Triturus Grifols

Anticorpos anti-Beta2 glicoproteína I (IgM e IgG)	ELISA (Aeskulisa), quantitativo	Triturus-Grifols	Soro Estabilidade: 2-8°, 3dias 20°, períodos prolongados
Anticorpos anti-cardiolipina (ACA) (IgM e IgG)	ELISA (Aeskulisa), quantitativo	Triturus-Grifols	Soro Estabilidade: 2-8°, 3dias 20°, períodos prolongados
Anticorpos anti-receptor de TSH (TRAb) (IgG)	ELISA (Euroimmun), qualitativo	Triturus - Grifols	Soro Estabilidade: 2-8, 14dias

5.2.4.2 Parâmetros analisados pelo Triturus Grifols

Anticorpos anti-Beta2 glicoproteína I (IgM e IgG)

Diagnóstico e pronóstico de síndrome anti-fosfolipídico primário e secundário.

Anticorpos anti-cardiolipina (ACA) (IgM e IgG)

Diagnóstico e avaliação de risco de trombose em doentes com Lupus eritematoso sistémico.

Anticorpos anti-receptor de TSH (TRAb) (IgG)

Diagnóstico e monitorização do tratamento da Doença de Graves.

5.3 WESTERN BLOT OU IMMUNOBLOTTING

É uma ferramenta essencial para caracterizar muitos tipos de auto-anticorpos. As proteínas de um extracto de células em cultura são separadas por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com sulfato de dodecil de sódio.

As proteínas separadas no gel são passadas para uma membrana de nylon por electrotransferência, e a membrana é incubada com o soro. As são utilizados vários métodos. Para detectar a reacção específica antigénio-anticorpo como as sondas marcadas radioactivamente, com enzimas tais como a peroxidase ou a reacção de quimiluminescência e auto-radiografia são utilizadas. Em cada análise, os marcadores de peso molecular, e os controlos positivos e negativos devem ser realizados.

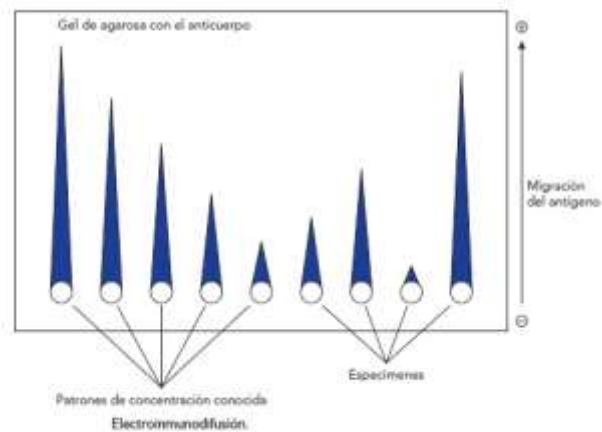


Figura 22 - Esquema western blot.

5.3.1 Dot blot

No dot blot, a electroforese não é praticada e antigénios purificados são imobilizadas na membrana, aplicando-as directamente. Esta técnica requer pequenas quantidades de imunorreagente, a capacidade de ligação é quase 100%, e é muito estável e pode ligar vários antigénios separados, permitindo detectar simultaneamente muitos anticorpos específicos numa amostra de soro na mesma análise.

Para a sua realização, o soro é adicionado à membrana e a reacção antigénio-anticorpo é detectado pelos mesmos métodos indicados no Western blot. (18)

5.3.2 EURO BLOT MASTER EUROINMUN



Figura 23 - EURO BLOT MASTER EUROINMUN.

São utilizados na autoimunidade tanto no despiste de várias doenças como para confirmação das proteínas específicas de amostras positivas. Na área da serologia são utilizados nas confirmações de resultados positivos e o despiste de proteínas específicas.

5.3.2.1 Determinações Euro blot Master Euroimmun

Autoimunidade

Antígenos anti-histonas (IgG)	Imunoblot (ANA Profile3 Euroline), qualitativo	EuroBlot Master-Euroimmun	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8°, 14dias
Anticorpos anti-substancia P ribossómica (IgG)	Imunoblot (ANA Profile3 Euroline), qualitativo	EuroBlot Master-Euroimmun	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8° 14dias
Anticorpos anti-nucleossomas (IgG)	Imunoblot (ANA Profile3 Euroline), qualitativo	EuroBlot Master-Euroimmun	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade:2-8° 14dias
Anticorpos anti-hepáticos: AMA-M2, LKM-I, LC-I, SLA/LP (IgG)	Imunoblot (Liver Profile Euroassay), qualitativo	Manual: Imunoblot em lamina	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
Anticorpos anti-neuronais: Anfifisina I, CV2/CRMP5, PNMA-2 (Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu (IgG)	Imunoblot (Neuronal Antigens Profile 2 Euroline), qualitativo	Euroblot Master - Euroimmun	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias
Anticorpos anti-gangliosídeos (IgM e IgG)	Imunoblot (Ganglioside Profile 2 Euroline), qualitativo	Manual	Soro ou plasma (heparina,EDTA,citrato) Estabilidade: 2-8°, 14 dias

Serología

Atc. Citomegalovirus (IgM, Avidéz IgG)	Blot
Treponema pallidum(IgM,IgG)	Blot
FTA/ABS (soro) (LCR)	Wester Blot

5.3.2.2 Parâmetros analisados pelos Euro blot Master Euroimmun

Autoimunidade

Antígenos anti-histonas (IgG)

Diagnóstico de Lupus eritematoso sistêmico especialmente *drug-induced*, e Artrite reumatoide.

Anticorpos anti-substancia P ribossômica (IgG)

Diagnóstico de Lupus eritematoso sistêmico e síndrome Sharp.

Anticorpos anti-nucleossomas (IgG)

Diagnóstico de Lupus eritematoso sistêmico.

Anticorpos anti-hepáticos:

AMA-M2, LKM-I, LC-I, SLA/LP (IgG)

Diagnóstico de hepatite auto-imune e cirrose biliar primária.

Anticorpos anti-neuronais:

Anfifisina I, CV2/CRMP5, PNMA-2(Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu (IgG)

Diagnóstico de síndrome neurológico para neoplásico.

Anticorpos anti-gangliosídeos (IgM e IgG)

Diagnóstico de síndrome Guillian-Barre, neuropatia motora multifocal, neuropatia sensora, síndrome Miller-Fisher.

Serologia

Atc. Citomegalovirus (IgM, Aidez IgG)

Confirmação de resultados positivos em amostras positivas em screening e determinação da proteína específica.

Treponema pallidum (IgM,IgG)

Confirmação de resultados positivos em amostras positivas em screening e determinação da proteína específica.

FTA/ABS (absorção de anticorpos treponema fluorescente) (soro) (LCR)

Utilizado para medir os anticorpos específicos para *T. pallidum* para o diagnóstico de neurosífilis. Este teste é útil após as primeiras 3-4 semanas após a exposição.

5.4 MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO COM UMA DETECÇÃO FINAL EM FLUORESCÊNCIA (ELFA)

E utilizada uma fase sólida, e uma diluição do soro é feita. As Ig são capturadas pelo Ac policlonal presente na parede da fase sólida. E as Ig específicas são detectadas pelo antígeno específico inativado, este mesmo é revelado por um anticorpo monoclonal anti-antígeno, conjugado com fosfatase alcalina. O substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) catalisa a reação de hidrólise num produto (4-metil-umbeliferil) cuja fluorescência é medida.

5.4.1 MINI VIDAS BIOMERIEUX



Figura 24 - MINI VIDAS BIOMERIEUX.

E o método mais fiável para a confirmação das doenças que são diagnosticadas às grávidas, como a Rubéola, a Toxoplasmose e o Citomegalovirus, devido à sua alta especificidade.

5.4.1.1 Determinações Mini Vidas Biomerieux

Atc. Rubéola (IgM,IgG)	Vidas
Atc. Toxoplasmose (IgM,IgG, Avidéz IgG)	Vidas
Atc.Citomegalovirus (IgG)	Vidas
Atc. Varicella-Zoster (IgG)	Vidas
Toxina Clostridium difficile (A,B)	Vidas
Atc. Borrelia (IgM,IgG) (LCR) (IgG)	Vidas

5.4.1.2 Parâmetros analisados pelo Mini Vidas Biomerieux

Atc. Rubéola (IgM,IgG)

Infecção congénita muito grave para o feto em mulheres no primeiro trimestre da gravidez

Atc. Toxoplasmose (IgM,IgG, Aidez IgG)

Infecção congénita muito grave para o feto em mulheres grávidas.

Atc. Citomegalovirus (IgG)

Infecção severa em imunodeprimidos e feto provocando parto prematuro, hidrocefalia, hepatoesplenomegalia e a morte do feto.

Atc. Varicella-Zoster (IgG)

Provoca varicela, que na idade adulta tem sintomas mais graves e zona que pode ser mortal em imunodeprimidos.

Toxina Clostridium difficile (A,B)

Agente maior das colites pseudomembranosas.

Atc. Borrelia (IgM,IgG) (LCR) (IgG)

Agente provoca a borreliose de Lyme.

5.5 AGLUTINAÇÃO

Quando o antígeno é ligado a uma partícula, tal como bactérias, células sanguíneas ou partículas inertes, ocorre a reacção antígeno-anticorpo. O título de um teste de aglutinação é a diluição máximas de soro produzindo a reacção, de modo que quanto maior é a concentração da substância a ser determinada o maior é o grau no soro.

5.5.1 Reacções de aglutinação direta

Reacções de aglutinação são aqueles em que o antígeno é encontrado na superfície de elementos naturais, como microorganismos e eritrócitos. Este tipo de teste é utilizado para detecção de anticorpos em soro contra os antígenos das membranas das células e

pode ser feita em tubo ou placa; nestes testes suspensão e misturada com as células, e se faz oscilar a placa durante alguns minutos e é observada a aparência de aglutinação.

Testes de aglutinação directos são usados para diagnosticar infeções bacterianas. Detecção de anticorpos contra Brucella, Salmonella e Proteus. Reacções de aglutinação directa também são usados em bancos de sangue para determinar os grupos sanguíneos. Existem diferentes métodos para detectar anticorpos que se ligam a eritrócitos.

5.5.2 Reacções de aglutinação indirecta

Reacções de aglutinação indirecta através de células tratadas ou partículas inerte revestida com antígeno que actuam como transportadores passivos, tal como eritrócitos humanos, ovelhas ou peru, e partículas de látex inertes. Estes são adsorvida ou covalentemente acoplados a superfície. Testes de aglutinação indirectos se realizam em placa (19).

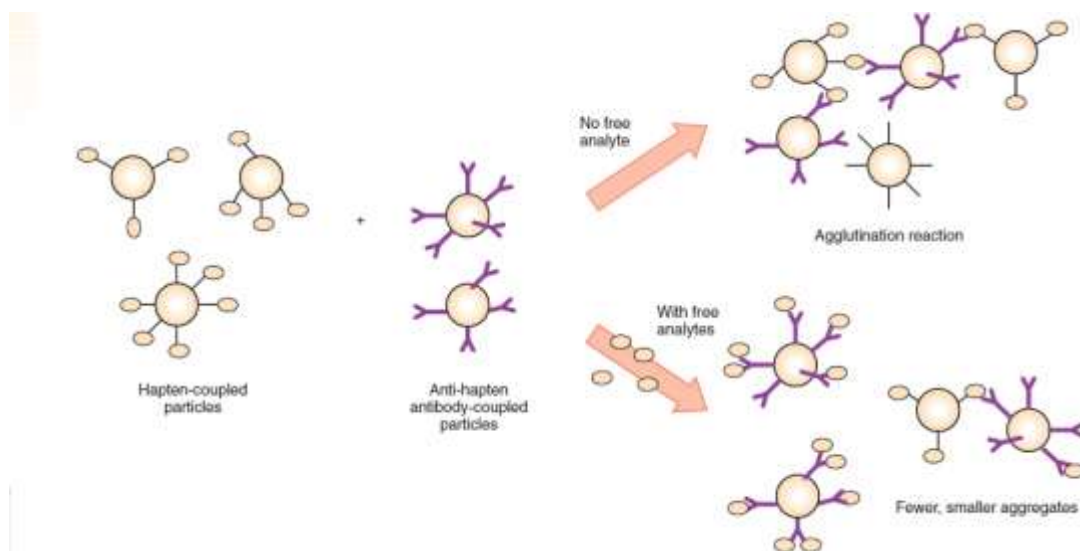


Figura 25 - Esquema aglutinação indirecta.

5.5.3 Determinações por técnicas manuais

Atg. Criptococico(soro) (LCR) látex	Manual
Atc. Heterófilos	Manual imunocromatografico
VDRL (soro) (LCR)	Manual

5.5.4 Parâmetros analisados por técnicas manuais

Atg. Criptocócico(soro) (LCR) látex

Cryptococcosis em doentes imunodeprimidos.

Atc. Heterófilos

Deteção na primeira semana da infecção por mononucleose, EBV, Toxoplasma, CMV ou HIV.

VDRL (soro) (LCR)

Deteção de reaginas (cardiolipinas), contra antígenos não treponémicos causados por *Treponema pallidum*, agente causal da sífilis.

5.6 NEFELOMETRIA E IMUNOENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO

O precipitado que se forma quando grandes complexos de antígeno e anticorpo se combinam para formar um reticulado insolúvel tem sido amplamente utilizada para identificar e quantificar reacções imunoprecipitação.

Os modos de aplicação de técnicas de precipitação têm as vantagens de sensibilidade, especificidade, e simplicidade. A alta sensibilidade destes ensaios é uma consideração importante. Mesmo sobre as melhores condições de maior sensibilidade oferecidas pela mais recentes técnicas de dispersão da luz, o limite inferior de sensibilidade em ensaios de imunoprecipitação permanece na gama de 0,1-0,5 mg / dl. Este limite de sensibilidade parece ser suficiente para a quantificação de muitas das principais proteínas do soro. A nefelometria forma a base para muitas técnicas imunoquímicas quantitativos e qualitativos agora utilizados no laboratório clínico.

A ocorrência de a formação do complexo imune tem sido relacionada com a quantidade da luz espalhada, e tem sido utilizado como base para a quantificação de antígeno. Sofisticados instrumentos foram concebidos para medir rapidamente espalhamento de luz. As medições de luz dispersa são geralmente referidos como turbidimetria ou nefelometria (20).

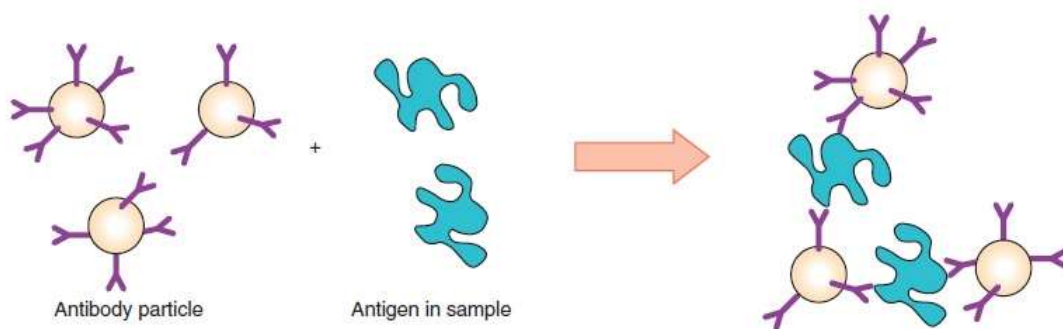


Figura 26 - Esquema imunoensaios de precipitação.

5.6.1 DIMENSION VISTA 500 SIEMENS



Figura 27 - DIMENSION VISTA 500 SIEMENS.

Aparelho utilizado para a determinações de nefelometria para a análise de proteínas, estudo de complemento e imunoglobulinas.

5.6.1.1 Determinações Dimension Vista 500 Siemens

PROTEINAS		
sALB	Albúmina especial	Soro Plasma (EDTA, heparina) LCR
PreAlb	Pré-albumina (transtiretina)	Soro Plasma (Heparina)
A2MAC	Alfa2-Macroglobulina	Soro Plasma (EDTA, heparina)
AIAT	Alfa 1-Antritipsina	Soro Plasma (EDTA, heparina)
STFR	Receptor solúvel transferrina	Soro Plasma (EDTA, heparina)
RBP	Proteínas de ligação ao retinol	Soro Plasma (EDTA, heparina)
HAPT	Haptoglobina	Soro Plasma (EDTA, heparina)

AlMIC	Alfa I-Microglobulina	Urina
B2MIC	Beta2-Microglobulina	Soro Plasma (EDTA, heparina) Urina
asPCR	Proteína C Reactiva de alta sensibilidade	Soro Plasma (heparina)
CER	Ceruroplasmina	Soro Plasma (heparina)
CYSC	Cistatina C	Soro Plasma (heparina)
RF	Factores reumatóides	Soro Plasma (heparina)
SAA	Substancia Amiloide A	Soro Plasma (heparina)
ESTUDO DO COMPLEMENTO		
C3	Factor 3 do complemento	Soro Plasma (EDTA, heparina)
C4	Factor 4 do complemento	Soro Plasma (EDTA, heparina)
C5	Factor 5 do complemento	Soro Plasma (EDTA, heparina)
CIq	Complemento CIq	Soro Plasma (EDTA, heparina)
CIin	Complemento CI inibidor	Soro Plasma (citrato)
INMUNOGLOBULINAS		
IgA	Inmonoglobulina A	Soro Plasma (heparina)
IgM	Inmunoglobulina M	Soro Plasma (heparina)
IgG	Imunoglobulina G	Soro Plasma (heparina) LCR Urina
IgG2, IgG 3, IgG 4	Imunoglobulina G classe 2, classe 3, classe 4	Soro Plasma (EDTA, heparina)
Kappa	Cadenas ligeiras de Ig, tipo Kappa	Soro Plasma (EDTA, heparina)

Lambda	Cadenas ligeiras de Ig, tipo Lambda	Soro Plasma (EDTA, heparina)
Kappa/Lamba livres	Cadeias leves livres Kappa/Lamba	Soro Urina

5.6.1.2 Parâmetros analisados Dimension Vista 500 Siemens

5.6.1.2.1 Proteínas

Albumina especial (sALB)

Insuficiência hepática, síndrome nefrítico, gastroenteropatias, queimaduras graves.

Pré-albumina (PreAlb)

Monitorização do estado nutricional e suporte nutricional.

Alfa2-Macroglobulina (A2MAC)

Diminuição em estados hiperfibrinolíticos, septicemia, insuficiência hepática grave, pancreatite aguda

Aumento na cirrose hepática e diabetes

Aumento com aumento na albumina na hematúria pos-renal.

Alfa I-Antripsina (AIAT)

Diminuição em doenças genéticas hepáticas e pulmonares

Aumento na fase aguda de infecções ou inflamação, gravidez e contraceptivos orais.

Receptor solúvel transferrina (STFR)

Diagnóstico de anemia por deficiência de ferro, má nutrição, inflamação aguda e infecção.

Proteínas de ligação ao retinol (RBP)

Diagnóstico de doenças renais e monitorização de doentes submetidos a transplantes renais.

Haptoglobina (HAPT)

Diminuição na hemólise intravascular.

Alfa I-Microglobulina (AIMIC)

Defeitos tubulares como a nefrite, nefropatia diabética avançada, exposição a metais pesados ou administração de medicamentos nefrotóxicos.

Beta2-Microglobulina (B2MIC)

Diagnóstico da artrite reumatóide, infecções e doenças renais.

Aumento no soro na diminuição de filtração glomerular.

Aumento na urina nos danos tubulares.

Proteína C Reactiva de alta sensibilidade (asPCR)

Avaliação de risco cardíaco e de prognóstico em doenças cardíacas.

Ceruplasmina (CER)

Diminuição na Doença de Wilson, síndrome de Menke, insuficiência hepática e síndrome de perda de proteínas.

Aumento na reações de fase aguda, colestase e contraceptivos orais.

Cistatina C (CYSC)

Caracterização da taxa de filtração glomerular.

Factores reumatóides (RF)

Diagnostico artrite reumatoide.

Substancia Amilóide A (SAA)

Diagnóstico e monitorização de doenças inflamatórias como artrite inflamatória, infecções viricas em situações de imunossupressão.

5.6.1.2.2 Estudo do complemento

C3

Diagnóstico de lúpus sistémico eritematoso, glomerulonefrite membrano-proliferativa e glomerulonefrite aguda.

C4

Diagnóstico de Lupus sistémico eritematoso, glomerulonefrite membrano proliferativo, doenças inflamatórias angioderma hereditário, anemia hemolítica auto-imune.

C5

Diagnóstico de Lupus sistémico eritematoso e infecções repetidas.

CIq

Doenças por imunocomplexos e infeções repetidas.

Clin

Diagnóstico de edema angioneurótica hereditária, angiodema associada com linfomas e doenças de células B.

5.6.1.2.3 Imunoglobulinas

IgM, IgA

Aumento no soro na multiplicação oligoclonal ou policlonal nas hepatopatias, doenças auto-imunes, infeções agudas ou crónicas, monoclonal-plasmocitomas e afecções das cadeias pesadas.

IgG

Aumento no soro na multiplicação oligoclonal ou policlonal nas hepatopatias, doenças auto-imunes, infeções agudas ou crónicas, monoclonal-plasmocitomas e afecções das cadeias pesadas. Aumento no LCR nas reacções imunitárias locais no SNC. Aumento urina na proteinúria glomerular não selectiva. Diminuição na deficiência imunológica primária ou secundária no tumor maligno avançado, leucemia linfática e mieloma múltiplo.

IgG2, IgG 3, IgG 4

Diagnóstico em doentes com susceptibilidade aumentada a infecção; aumento de IgG monoclonal.

Cadenas ligeiras de Ig tipo Kappa / tipo Lambda

Diagnóstico de mieloma múltiplo, neoplasias linfocíticas, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistémico.

Cadenas leves livres de Ig tipo Kappa / tipo Lambda

Diagnóstico e monitorização de gammapatia monoclonal.

5.7 ELECTROFORESIS PROTEINAS

5.7.1 Electroforese e densitometria

A electroforese é a separação de compostos carregados com base na sua carga eléctrica. Quando uma tensão é aplicada a uma solução de sal, usualmente cloreto de sódio, uma corrente eléctrica é produzida pelo fluxo de iões:

Quanto maior for a rede acusações de um composto dissolvido, mais rápido ele se move através da solução em direcção ao eléctrodo de carga oposta. A carga líquida de um composto, por sua vez, depende do pH da solução.

Separações, muitas vezes de electroforese exigem altas voltagens (50-200 V DC); portanto, a fonte de alimentação deve fornecer uma tensão de CC constante a estes níveis. A solução-tampão deve ter uma força iónica cuidadosamente controlada.

Meios de suporte comum para o electroforese em clínica incluem acetato de celulose, agarose, e géis de poliacrilamida. Uma vez a electroforese é completada, o meio de suporte é tratado com um corante para identificar as fracções separadas.

5.7.2 Electroforese capilar

A electroforese capilar representa uma outra alternativa nas técnicas de separação. Um sistema de electroforese capilar típica, consiste de um capilar de sílica fundida, dois tampões de electrólitos, uma fonte de alimentação de alta tensão, e um detector ligado a uma unidade de aquisição de dados.

A amostra é introduzida no capilar de entrada. Quando uma elevada tensão é aplicada entre as extremidades dos capilares, as moléculas da amostra são separados por fluxo electro-osmótico. À medida que os iões da amostra migram em direcção à saída capilar, diferentes tipos de detectores, incluindo óptica, a condutividade, electroquímico, de massa espectroscopia, ou radioactividade detectores, são usados para detetar e medir eles.

As vantagens de electroforese capilar, em relação a electroforese mais convencional e HPLC, são o tempo de análise curto, melhor poder de resolução e volumes pequenos de amostra. Usando quantidades de nanolitros de espécime. Complexas misturas de moléculas podem ser separadas em menos de 10 minutos através da aplicação de alta tensão. Aplicações de electroforese capilar incluem a separação de proteínas do soro e variantes da hemoglobina. (21)

5.7.3 Minicap Sebia



Figura 28 - Minicap Sebia.

É utilizado para a separação das proteínas do soro e da urina, para a procura de aumento de alguma das fracções o que refere a estados patológicos.

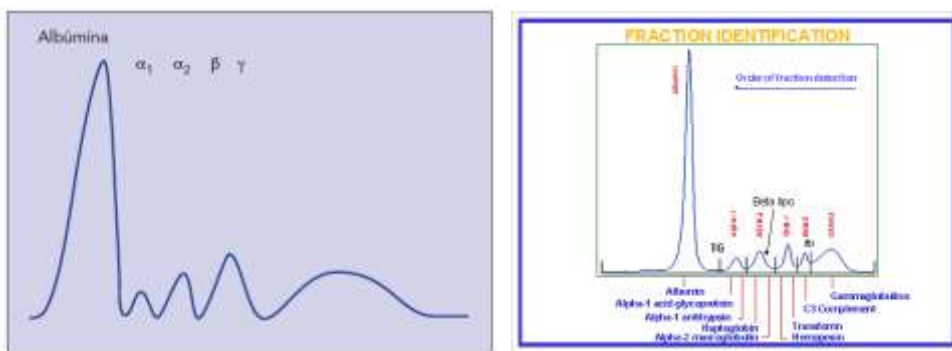


Figura 29 – Electroforese de proteínas.

As proteínas são detectadas pela seguinte ordem: gama globulinas, globulinas beta-2, globulinas beta-1, globulinas alpha-2, globulinas alpha-1 e albuminas, com cada zona contendo uma ou mais proteínas.

5.8 INMUNOFIXAÇÕES

A imunofixação efectuada com a ajuda de anticorpos permite a identificação das bandas monoclonais despistadas por electroforese.

A técnica é feita por uma separação das proteínas por electroforese em gel de agarose. Depois uma fixação e imunoprecipitação das proteínas despistadas por electroforese com uma aplicação do fixador e dos antisoros directamente sobre o gel, ao nível das pistas de migração. Estes últimos difundem-se no gel e o fixador precipita todas as proteínas e os anticorpos precipitam os antígenos correspondentes. As proteínas solúveis, não precipitadas, são removidas do gel por lavagem e absorção. As proteínas precipitadas ficam retidas no interior da matriz do gel. Por último há coloração das proteínas e comparação da posição das bandas imunoprecipitadas com as bandas anómalas observadas no perfil electroforetico das amostras.

5.8.1 Hydrasis Sebia



Figura 30 - Hydrasis Sebia.

As proteínas do soro são separadas por electroforese em tampão alcalino e depois imunoprecipitadas com antisoros trivalente: anti-cadeias pesadas gama (Ig G), alfa (Ig A) e mu (Ig M), anti-cadeias leves kapa e lambda (livres e ligadas), anti-cadeias leves livres kapa e anti-cadeias leves livres lambda.

Apos imunofixação, as proteínas precipitadas são coradas com violeta ácido.

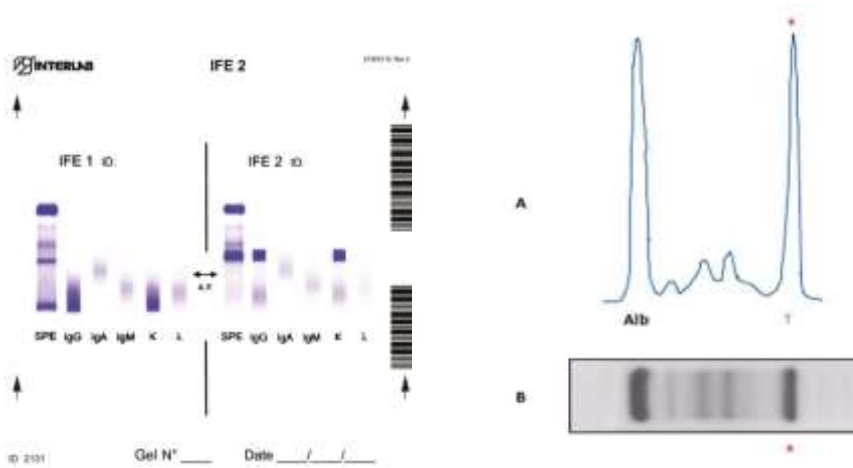


Figura 30 – Electroforese de proteínas por imunofixação.

Detecção qualitativa e identificação da proteína de Bence Jones (cadeias leves livres monoclonais kappa ou lambda) na urina, LCR, ou soro humanos.

6. CONCLUSÃO

Esta experiência no hospital deu-me uma visão geral das diferentes técnicas e metodologias utilizadas em diversos campos das Análises Clínicas. Permitiu-me aplicar os conhecimentos e habilidades adquiridas durante a minha formação, o que foi uma mais-valia para lidar com o trabalho diário no laboratório.

Fazer parte de uma grande equipa, com profissionais qualificados e experientes que se mostraram sempre disponíveis a me ajudar, transformou este estágio na parte mais importante da minha formação académica e futura carreira profissional, além de uma experiência pessoal inesquecível.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 51-55
2. C. INDEVUYST, W. SCHUERMANS, E. BAILLEUL, P. MEEUS – The order of draw: much ado about nothing? 2014 John Wiley & Sons Ltd, Int. Jnl. Lab. Hem. 2015, 37, 50–55
3. HENRY, John Bernard – Henry el laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Sanford & Davidsohn, Volumen 2, Marbán, 2005, Capitulo 4 ISBN 83–91
4. The Advanced Instruments ® Micro-Osmometer Model 3300 User's Guide, Massachusetts, USA
5. Henry's Clinical Diagnosis and Managements by Laboratory Methods, Richard A. McPherson, Matthew R. Picnus, 22th Edition Saunders, 2011, ISBN 171–172
6. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry , Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Burns, 6th Edition W.B. Saunders, 2007 ISBN 85-94
7. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 133
8. Manual do utilizador Olympus AU5400. 2003 Olympus Diagnostica , Shinjuku-ku, Tokyo 163-0914, Japan 23 – 30
9. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry , Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Burns, 6th Edition W.B. Saunders, 2007 ISBN 85-91
10. Manual de Operação Architect System 1998, 2013 Abbott Laboratories
11. cobas e 411 analyzer COBAS, COBAS E and LIFE NEEDS ANSWERS ©2009 Roche ,Roche Diagnostics GmbH ,D-68298 Mannheim,Germany
12. González Buitrago JM. La orina y su análisis. Aspectos físico químicos de la orina. Madrid. Bayer Diagnóstico 1993
13. Alvarez Moreno C. Estudio microscópico del sedimento urinario. Madrid. Bayer Diagnóstico 1993
14. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 387
15. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 422-424
16. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry , Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Burns, 6th Edition W.B. Saunders, 2007 ISBN 153
17. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 413
18. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 422
19. BUITRAGO, Jose Maria – Técnica y métodos de Laboratorio Clínico 3ª Ed. España : Elsevier Masson, 2010 , ISBN 389-390
20. Henry's Clinical Diagnosis and Managements by Laboratory Methods, Richard A. McPherson, Matthew R. Picnus, 22th Edition Saunders, 2011, ISBN 854-855
21. Henry's Clinical Diagnosis and Managements by Laboratory Methods, Richard A. McPherson, Matthew R. Picnus, 22th Edition Saunders, 2011, ISBN 51-57