

Cátia Sofia Oliveira Santos

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, sob orientação da Dr.^a Ana Domingos Dias e da Professora Doutora Paula Cristina Luxo, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Aquilo que tornamos capazes de fazer através da aprendizagem, aprendemo-lo fazendo-o: é construindo que nos formamos mestres-de-obra.”

Aristóteles

Agradecimentos

A experiência de adaptação à realidade profissional e a escrita do presente relatório, constituíram um desafio marcante na minha vida profissional e pessoal, sendo que, este espaço é dedicado a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta etapa.

À Dr.^a Ana Domingos Dias, pela orientação e pela ajuda incessante no meu percurso enquanto estagiária no Centro Hospitalar de Leiria. A sua orientação, foi fundamental na coordenação do meu estágio e na minha aprendizagem no Laboratório da Imunologia.

Ao Dr. Ricardo Castro, a possibilidade de integração no Serviço de Patologia Clínica, permitindo-me adquirir experiência profissional, fundamental para a minha vida.

Ao Dr. Jorge Pinheiro, à Dr.^a Ana Paquim, à Dr.^a Gina Marrão e à Dr.^a Sandrine Mendes, por terem acompanhado o meu percurso e, partilhado comigo, os seus sábios conhecimentos nos Laboratórios da Bioquímica, da Microbiologia e da Hematologia.

A toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica que me recebeu alegremente e que conviveu comigo diariamente, tornando esta experiência gratificante.

À Professora Doutora Cristina Luxo pela disponibilidade prestada ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pela possibilidade de expansão dos meus conhecimentos com o ingresso no Mestrado de Análises Clínicas, bem como à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que me recebeu enquanto aluna do presente mestrado.

Aos Meus Pais que são fundamentais na minha vida, que me ensinaram valores e que sempre acompanharam o meu percurso académico, apoiando-me incondicionalmente em todas as etapas por mim vivenciadas.

Por fim, aos Meus Amigos que marcam a minha vida com a sua presença constante, incentivando-me sempre a continuar a minha caminhada.

Índice

Abreviaturas.....	XIII
Resumo/Abstract	XV
I. Introdução.....	1
II. Caracterização do Laboratório de Estágio	3
III. Imunologia	5
3.1. Avaliação do Metabolismo das Catecolaminas	5
3.1.1. Doseamento do Ácido Vanilmandélico e das Metanefrinas Urinárias	5
3.2. Proteinograma	6
3.2.1. Determinação do Perfil Electroforético.....	7
3.3. Imunofixação	9
3.3.1. Imunofixação Sérica.....	9
3.3.2. Imunofixação Urinária	9
3.3.3. Metodologia	10
3.4. Pesquisa de Bandas Oligoclonais da IgG no Líquido Cefalorraquidiano.....	12
3.5. Serologia	13
3.5.1. Serologia Automatizada	14
3.5.1.1. Grupo <i>TORCH</i> e EBV	14
3.5.1.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Borrelia spp</i> <i>Legionella pneumophila</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
3.5.2. Serologia Manual	16
3.5.2.1. Testes de Aglutinação.....	16
3.5.2.2. Lâminas de <i>Coxiella burnetii</i> e <i>Rickettsia conorii</i>	17
3.5.2.3. FTA-ABS	18
3.5.2.4. Testes Imunocromatográficos	18
3.6. Autoimunidade.....	18
3.6.1. ANA – anticorpos antinucleares	19
3.6.2. ANCA – anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos	20
3.6.3. <i>Imunoblotting</i> – testes confirmatórios.....	21
3.6.4. Anticorpos anti-tiroideus.....	22
3.7. Alergologia	23
IV. Bioquímica	25
4.1. Equipamentos e Metodologias de Funcionamento	25

4.1.1.	AU 2700 TM	25
4.1.2.	DXi 800 TM	26
4.1.3.	COBAS [®] e411	26
4.1.4.	AUTION MAX TM AX-4030.....	27
4.1.5.	Teste múltiplo Triage [®] Cardiac - Alere TM	27
4.2.	Avaliação da Função Cardíaca	27
4.2.1.	Creatina Cinase e Creatina Cinase Isoenzima MB	28
4.2.2.	Mioglobina.....	29
4.2.3.	Peptídeo Natriurético Cerebral	29
4.2.4.	Troponina I	29
4.2.5.	Proteína C Reativa (PCR).....	29
4.2.6.	Relação da atividade muscular com a atividade cardíaca.....	30
4.3.	Avaliação da Função Hepática	30
4.3.1.	Albumina	31
4.3.2.	Bilirrubina.....	31
4.3.3.	Fosfatase Alcalina.....	32
4.3.4.	Gama-glutamyltransferase.....	33
4.3.5.	Transaminases	33
4.4.	Avaliação da Função Tiroideia.....	33
4.5.	Avaliação da Função Renal	34
4.5.1.	Creatinina e Microalbuminúria.....	35
4.5.2.	Ureia	35
4.5.3.	Urina Tipo II.....	35
4.5.4.	Avaliação do Sedimento Urinário	36
4.6.	Avaliação dos Marcadores Tumoriais	38
4.7.	Avaliação do Metabolismo dos Lípidos.....	39
4.7.1.	Colesterol Total, Colesterol HDL e Colesterol LDL.....	40
4.7.2.	Triglicéridos.....	41
4.8.	Avaliação dos Eletrólitos.....	41
4.8.1.	Sódio	42
4.8.2.	Potássio	42
4.8.3.	Cloro	42
4.8.4.	Osmolalidade	43
4.8.4.1.	Glucose.....	43
4.8.5.	Estudo dos íons Cálcio, Magnésio e Fosfato	44

4.9. Doseamento de Fármacos	45
4.10. <i>Screening</i> das Drogas de Abuso	45
V. Microbiologia.....	47
VI. Hematologia	49
VII. Controlo de Qualidade no Serviço de Patologia Clínica	51
7.1. Controlo de Qualidade Interna.....	51
7.2. Avaliação Externa da Qualidade.....	53
VIII. Conclusões.....	55
IX. Bibliografia	57
X. Anexo I – Valores de Referência usados no CHL nos Parâmetros Bioquímicos	61

Índice de Figuras

Figura 1. Perfil electroforético normal e respetivo espetro numa amostra de soro	7
Figura 2. Proteinograma de amostras de soro	8
Figura 3. Imunofixação sérica	10
Figura 4. Imunofixação urinária	11
Figura 5. Perfil electroforético no LCR e no Soro	12
Figura 6. Diagrama de Reiber.....	13
Figura 7. Exemplos de padrões dos ANA	19
Figura 8. Padrões dos ANCA	20
Figura 9. Evolução temporal da libertação dos biomarcadores cardíacos perante uma lesão cardíaca	28
Figura 10. Elementos figurados encontrados no sedimento urinário	37

Índice de Tabelas

Tabela I. Equipamentos existentes no Serviço de Patologia Clínica do CHL	4
Tabela II. Principais proteínas plasmáticas e significado clínico das suas alterações	8
Tabela III. Grupo <i>TORCH</i> e EBV, e respetivos limites de referência.....	15
Tabela IV. Intervalo de referência para os microrganismos e seu significado clínico.	16
Tabela V. Testes de aglutinação.....	17
Tabela VI. Antígenos específicos contra os quais são pesquisados anticorpos específicos no CHL.	21
Tabela VII. Patologias autoimunes mais frequentes e autoanticorpos associados	22
Tabela VIII. Limite de referência para os anticorpos anti-tiroideus.....	23
Tabela IX. Princípios de ensaio no AU 2700 TM	25
Tabela X. Diferenciação dos tipos de icterícia	32
Tabela XI. Parâmetros determinados em Urina Tipo II.....	36
Tabela XII. Caraterização dos marcadores tumorais	38
Tabela XIII. Caraterização dos iões cálcio, magnésio e fosfato.....	44
Tabela XIV. Caraterização dos fármacos doseados no CHL.....	45

Abreviaturas

AAT	Anticorpos Anti-tiroideus
ADP	Adenosina Difosfato
AFP	Alfa-fetoproteína
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
APCR	Resistência à Proteína C ativada
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
CA 15-3	Antigénio Carbohidrato 15-3
CA 19-9	Antigénio Carbohidrato 19-9
CA 72-4	Antigénio Carbohidrato 72-4
CA 125	Antigénio Carbohidrato 125
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CHL	Centro Hospitalar de Leiria, EPE
CLL	Cadeias Leves Livres
CMHG	Concentração Média da Hemoglobina Globular
CMV	Citomegalovírus
CK	Creatina Cinase
CK-MB	Creatina Cinase Isoenzima MB
CK-MM	Creatina Cinase Isoenzima MM
EBV	Vírus Epstein-Barr
EM	Esclerose Múltipla
FTA-ABS	<i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption</i>
γ-GT	Gama-glutamyltransferase
Hb A₁C	Hemoglobina Glicada
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	<i>High-density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Elevada Densidade)
HGM	Hemoglobina Globular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1/2	Vírus Herpes Simplex 1 e 2
IDL	<i>Intermediate-density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Densidade

	Intermédia)
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INR	<i>International Normalised Ratio</i> (Índice Internacional Normalizado)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	<i>Low-density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
MGUS	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
MM	Mieloma Múltiplo
NSE	Neuroenolase Específica
PCR	Proteína C Reativa
PSA	Antigénio Específico da Próstata
RDW	Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos
RPR	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Serviço de Patologia Clínica
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TG	Tiroglobulina
TORC	<i>Toxoplasma gondii</i> , Outras Infeções e Citomegalovírus
TORCH	<i>Toxoplasma gondii</i> , Outras Infeções, Citomegalovírus e Vírus Herpes Simplex 2
TPO	Peroxidase da Tiróide
TPPA	<i>Treponema Pallidum Particle Agglutination</i>
TRH	Hormona Libertadora de Tirotropina
TSH	Hormona Estimuladora da Tiróide
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
VLDL	<i>Very-low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
VMA	Ácido Vanilmandélico
VGM	Volume Globular Médio
VS	Velocidade de Sedimentação

Resumo

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, o presente relatório reporta o estágio decorrido no Centro Hospitalar de Leiria, EPE.

O Serviço de Patologia Clínica responde a diversas áreas do hospital, auxiliando no diagnóstico clínico. Desse modo, o Serviço desenvolve as suas atividades em todas as áreas, respeitando uma política de qualidade ao longo de todo o processo analítico (fase pré-analítica, analítica e pós-analítica). O diagnóstico laboratorial é sempre efetuado num sentido crítico, pelo que, a comunicação entre o laboratório e o médico vem sendo construída, não apenas perante resultados críticos, mas de forma a prestar um serviço de qualidade ao doente.

No presente relatório, pretendo referenciar o trabalho desenvolvido ao longo do estágio e evidenciar a utilidade das análises efetuadas no diagnóstico clínico, centrando-me essencialmente nas áreas da Imunologia e da Bioquímica, que serão abordadas detalhadamente.

Abstract

In the context of the Master degree in Clinical Analysis, this report refers to the training that took place at Centro Hospitalar de Leiria, EPE.

The Service of Clinical Pathology replies a several areas of the hospital, helping in the clinical diagnosis. In this way, the Service develops its activities in all areas, respecting a quality policy along the entire analytic process (pre-analytic, analytic and post-analytic phase). Laboratory diagnosis is always done with critical sense, so that, the communication between laboratory and doctor is being constructed, not only to notify critical results, but in order to provide a quality service to the patient.

In this report, I want to refer the work developed during the training and show the usefulness of the clinical analysis for the clinical diagnosis, focusing on the Immunology and Biochemistry areas, which will be discussed in detail.

I. Introdução

No âmbito do estágio curricular em Análises Clínicas promovido pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o Centro Hospitalar de Leiria (CHL) foi o escolhido para a realização do mesmo.

Decorrido entre Dezembro de 2013 e Maio de 2014, o estágio abrangeu a passagem pelos Laboratórios da Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Hematologia.

Ao longo de seis meses (equivalente a oitocentas horas), a permanência no Serviço de Patologia Clínica (SPC) permitiu a integração e a perceção do trabalho diário executado num laboratório de análises clínicas, em ambiente hospitalar.

Fatores fundamentais como a centralização do SPC e o rececionamento de um elevado número de amostras, possibilitaram o contacto com um diversificado número de patologias e numerosas técnicas de diagnóstico que, são essenciais, no auxílio do diagnóstico clínico. A proximidade e a integração nessa diversidade de fatores, permitiu a aquisição de competências técnicas e a expansão de conhecimentos, todos eles encarados como uma mais-valia para o enriquecimento profissional e pessoal.

No processo de validação final dos resultados, a capacidade crítica na interpretação dos mesmos foi sempre incentivada, o que proporcionou continuamente a aplicação e a consolidação dos conhecimentos obtidos ao longo do mestrado.

Reportando ao plano de estágio, a passagem por cada setor decorreu num período de seis semanas, existindo abertura constante ao contacto com todas as áreas, sempre que se verificassem situações que contribuíssem para a aprendizagem.

Porém, a escolha sobre as áreas selecionadas para aprofundamento, incidiu sobre a Imunologia e a Bioquímica, de forma a abordar detalhadamente as técnicas de diagnóstico disponíveis, a metodologia utilizada e a sua importância no diagnóstico laboratorial.

II. Caracterização do Laboratório de Estágio

O Serviço de Patologia Clínica, onde decorreu o presente estágio, localiza-se no Hospital de Santo de André, em Leiria. O hospital encontra-se integrado, juntamente com outras duas unidades hospitalares, Hospital Distrital de Pombal e Hospital Bernardino Lopes de Oliveira, no Centro Hospitalar de Leiria, EPE. O SPC encontra-se sob orientação do Diretor de Serviço Dr. Ricardo Castro, Médico Patologista e a Técnica Coordenadora, Teresa Cruz. O laboratório inclui ainda cinco Técnicos Superiores de Saúde – Ramo Laboratório. A equipa é constituída por dezasseis Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica – Análises Clínicas e Saúde Pública, três Assistentes Operacionais e dois Assistentes Técnicos.

O Serviço de Patologia Clínica é constituído por secretaria, sala de espera, gabinetes de colheita e áreas laboratoriais para processamento das amostras, como o Laboratório de Bioquímica, de Imunologia, de Hematologia, de Microbiologia e o Serviço de Urgência 24h. O Serviço responde a diversas áreas do hospital, pedidos de análises provenientes do Serviço de Consulta Externa e assegura o apoio ao Serviço de Urgência, Internamento, Ambulatório e Hospital de Dia. Este serviço conta ainda com o apoio de laboratórios externos para onde são enviadas as amostras dos utentes, cujo estudo não é efetuado no CHL.

O Serviço de Patologia Clínica trabalha com o objetivo de melhorar continuamente e de prestar um serviço de qualidade aos seus utentes, participando nos Programas de Avaliação Externa da Qualidade que abrangem diversas provas em todos os laboratórios.

A automatização do SPC é uma realidade necessária que permite dar resposta ao volume de amostras rececionadas. Em 2013, foram realizadas 1.785.188 provas, em resposta a 174.458 pedidos num total de 58.435 utentes. Para fazer face a estes números, o SPC dispõe de um abrangente número de aparelhos automatizados em cada laboratório (Tabela I).

Tabela I. Equipamentos existentes no Serviço de Patologia Clínica do CHL.

Laboratório	Equipamento	Metodologia
Bioquímica	Automate™ 2500 – BECKMAN COULTER	Sistema Automático – Pré-analítica
	DXi 800™ – BECKMAN COULTER	Quimioluminescência
	AU 2700™ – BECKMAN COULTER	Fotometria
	COBAS® e411 – Roche Diagnostics	Eletroquimioluminescência – ECL
	AUTION MAX™ AX-4030 – A.MENARINI diagnostics	Refletância, Refratometria por Reflexão e Reflexão da Luz
	ABL800 FLEX – RADIOMETER	Princípio de Medição Potenciométrico, Amperométrico e ótico
	Teste múltiplo Triage® Cardiac – Alere™	Imunoensaio de Fluorescência
Imunologia	LIAISON® analyzer – DiaSorin	Quimioluminescência – CLIA
	TRITURUS – ELISA ANALYZER – GRIFOLS	Ensaio imunoenzimático – ELISA
	ZENIT SP – A.MENARINI diagnostics	Imunofluorescência Indireta – IFI
	ImmunoCAP 250 – Phadia	Imunoensaio fluoroenzimático
	HYDRASYS® 2 ^{SCAN} – Sebia®	Isofocalização/Electroforese em gel de agarose
	EUROBlotMaster – EUROIMMUN	Ensaio Imunoenzimático – <i>Imunoblotting</i>
	IMAGE® 800 – BECKMAN COULTER	Nefelometria e Turbidimetria
	CL-770 – SHIMADZU	Turbidimetria
Hematologia	UniCel® DXH 800 COULTER® – BECKMAN COULTER	Citometria de Fluxo
	ACLTOP 500 CTS – IZASA	Turbidimetria, Colorimetria e Imunoensaios
	CAPILLARYS 2 FLEX Piercing – Sebia®	Electroforese por Capilaridade
	Ves Matic 30 Plus – A.MENARINI diagnostics	Sistema Automático – Comparação com o Método de Referência de Westergren
	BD FACSCalibur™ – BD Biosciences	Citometria de Fluxo
	BD FACS™ Lyse Wash Assistant – BD Biosciences	Sistema Automático de Lavagem das Células
	Aerospray Hematology Pro™ 7151 – WESCOR® BIOMEDICAL SYSTEMS	Sistema Automático de Coloração May-Grünwald-Giemsa
Microbiologia	VITEK® 2 – BIOMÉRIEUX	Fluorescência
	Smart Carrier Station™ – BIOMÉRIEUX	Densitômetro
	BacT/ALERT® 3D – BIOMÉRIEUX	Alterações no pH
	PREVI COLOR GRAM – BIOMÉRIEUX	Sistema Automático de Coloração de Gram
	ATB Expression – BIOMÉRIEUX	Turbidimetria

III. Imunologia

3.1. Avaliação do Metabolismo das Catecolaminas

O ácido vanilmandélico (VMA) e as metanefrinas urinárias são os produtos resultantes do metabolismo das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina. O seu doseamento permite avaliar os níveis de produção das catecolaminas que são sintetizadas na glândula suprarrenal e nas terminações nervosas das fibras do sistema nervoso periférico.

A eliminação dos produtos resultantes do metabolismo das catecolaminas ocorre na urina.^[1] Por isso, o seu doseamento é realizado em amostras de urina de 24 horas acidificada, recolhidas em contentores apropriados que contenham 10 a 15mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado para a sua conservação. As amostras são guardadas a -20°C, num período máximo de 30 dias, ou refrigeradas entre 2 e 8°C, num período de 6 a 7 dias, até se efetuar a determinação.^[2]

3.1.1. Doseamento do Ácido Vanilmandélico e das Metanefrinas Urinárias

Na determinação do VMA e das metanefrinas utiliza-se, como metodologia, a cromatografia de troca iónica da **BioSystem** que é, uma técnica cromatográfica sólido-líquido na qual ocorre uma troca reversível de iões entre a fase móvel e a fase estacionária. A separação dos componentes depende da sua carga e da carga da resina. A resina usada é de intercâmbio aniónico na determinação do VMA, e de intercâmbio catiónico, no doseamento das metanefrinas urinárias. Após a eluição dos componentes por variação do pH ou da força iónica, a quantificação é realizada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 360nm.^[3]

O cálculo da concentração de VMA e metanefrinas urinárias é feito, tendo em conta amostras padrão e branco das amostras que são processadas juntamente com as amostras de urina. Para além disso, é sempre processada uma amostra controlo que nos garante a veracidade dos resultados. Para o cálculo da concentração VMA e metanefrinas urinárias utilizam-se as Equações 1 e 2.

$$(1) \frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco Amostra}}}{A_{\text{Padrão}}} \times 0,676 = C_{\text{VMA}} \times V_{\text{urina}/24\text{h}} = C_{\text{VMA}/24\text{h}}$$

A_{amostra} – absorvância da amostra

$A_{\text{Branco amostra}}$ – absorvância do branco da amostra

$A_{\text{Padrão}}$ – absorvância do padrão

C_{VMA} – concentração do VMA urinário (mg/L)

$V_{\text{urina/24h}}$ – volume de urina de 24h

$C_{\text{VMA/24h}}$ – concentração do VMA urinário em 24h (mg/24h)

$$(2) \quad \frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco Amostra}}}{A_{\text{Padrão}} - A_{\text{Branco Padrão}}} \times 42,1 = C_{\text{metanefrinas}} \times V_{\text{urina/24h}} = C_{\text{metanefrinas/24h}}$$

A_{amostra} – absorvância da amostra

$A_{\text{Branco amostra}}$ – absorvância do branco da amostra

$A_{\text{Padrão}}$ – absorvância do padrão

$A_{\text{Branco do Padrão}}$ – absorvância do branco do padrão

$C_{\text{metanefrinas}}$ – concentração das metanefrinas urinárias (mg/L)

$V_{\text{urina/24h}}$ – volume de urina de 24h

$C_{\text{metanefrinas/24h}}$ – concentração das metanefrinas urinárias em 24h (mg/24h)

Os valores de referência para as metanefrinas e VMA na urina, correspondem a <1,00. mg/24h e <13,60 mg/24h, respectivamente. A obtenção de valores superiores ao estabelecido poderá estar associado a situações patológicas como feocromocitomas, neuroblastomas ou paragangliomas. Contudo, poderão ser observados valores elevados em situações não patológicas nas quais a preparação para a colheita não foi a adequada, como por exemplo, uma dieta adequada e/ou a interferência da terapêutica.^[1]

3.2. Proteinograma

O proteinograma permite avaliar qualitativamente as proteínas séricas: albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β_2 -globulinas e as γ -globulinas, através do perfil electroforético de acordo com a sua carga (Figura 1).

Em cada uma das regiões identificadas no perfil eletroforético, migram diferentes proteínas de acordo com a sua carga: **i) albumina;** **ii) α_1 -globulinas:** orosomucóide e α_1 -antitripsina; **iii) α_2 -globulinas:** α_1 -antiquimiotripsina, ceruloplasmina, GC globulina, α_2 -macroglobulina, haptoglobulina e n-lipoproteína; **iv) β_2 -globulinas:** transferrina, hemopexina, plasminogéneo, fibronectina e complemento C3; **v) γ -globulinas:** imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina D (IgD).^[4]

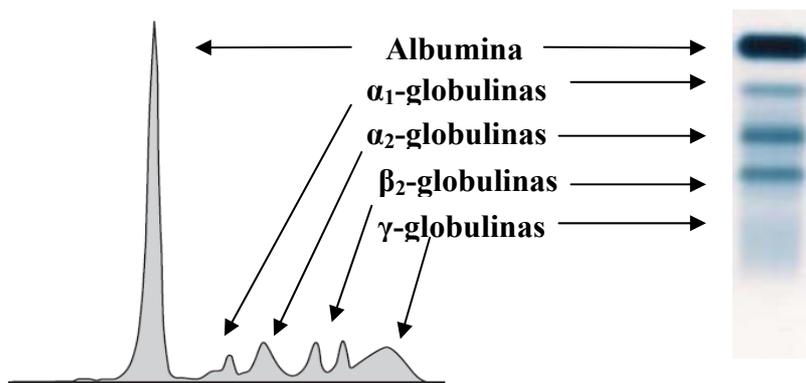


Figura 1. Perfil electroforético normal e respetivo espectro numa amostra de soro. (Espectro Keren et al; Perfil electroforético cedido pelo CHL)

3.2.1. Determinação do Perfil Electroforético

O perfil electroforético é determinado em amostras de soro que, são recolhidas em tubo apropriado sem a adição de anticoagulante. As amostras são processadas no aparelho semiautomático **HYDRASIS (Sebia)** por electroforese em gel de agarose, juntamente com uma amostra controlo. A electroforese permite separar as proteínas séricas de acordo com a sua carga e a um determinado pH. A coloração do proteinograma é realizada com negro de amido.^[4]

Na interpretação dos resultados, é necessário ter em consideração o perfil electroforético bem como o respetivo espectro, de forma a detetar anomalias que possam estar presentes. Na maior parte das situações, verifica-se um perfil electroforético normal. Contudo, poderão ser observadas variações em todas as regiões, ou seja, a intensidade das regiões poderá estar aumentada ou diminuída, sendo que, estas alterações poderão estar associadas a diversas situações patológicas (Tabela II).

No caso de se observar o aumento de intensidade na zona das imunoglobulinas (Figura 2), este aumento poderá ser policlonal quando existe um aumento generalizado das γ -globulinas, situação comum nas doenças autoimunes, infeções pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e infeções hepáticas. Pelo contrário, poderão ser observadas bandas homogéneas nesta região, o que poderá indicar uma gamapatia monoclonal, sendo a sua investigação recomendada por imunofixação sérica. Em determinadas situações, poderá surgir uma ou mais bandas homogéneas perto da região das β_2 -globulinas, sendo importante o despiste de uma gamapatia monoclonal, uma vez que, a IgA migra essencialmente nesta zona.^[5] Nos casos em que as bandas observadas na região das γ -globulinas estejam bem demarcadas, é ainda determinada a percentagem e a concentração do pico monoclonal (g/L) a partir do espectro.

Tabela II. Principais proteínas plasmáticas e significado clínico das suas alterações.^[3,4]

Proteína Plasmática	Significado Clínico	
Albumina	Aumento Desidratação	Diminuição Patologias inflamatórias agudas e crónicas Desnutrição Patologias hepáticas Síndrome nefrótica Perdas gastrointestinais
α_1-antitripsina	Aumento Aumento dos níveis de estrogénios	Diminuição Patologias hepáticas Enfisema pulmonar
Haptoglobina	Aumento Corticosteróides Síndrome nefrótica Aumento dos níveis de estrogénios	Diminuição Hemólise Patologias hepáticas
α_2-macroglobulina	Aumento Aumento dos níveis de estrogénios Síndrome nefrótica	Diminuição Pancreatite aguda
Ceruplasmina	Aumento Terapia com hormonas esteroides	Diminuição Doença de Wilson
Transferrina	Aumento Anemia ferropénica	Diminuição Cirrose alcoólica Síndromes inflamatórias Síndrome nefrótica

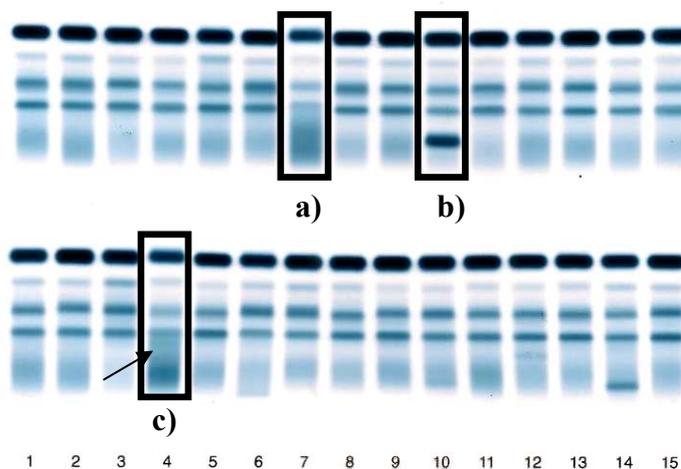


Figura 2. Proteinograma de amostras de soro; a)Perfil policlonal; b)Presença de uma banda na zona das γ -globulinas; c)Possível banda junto da zona das β_2 -globulinas. (Proteinograma cedido pelo CHL)

3.3. Imunofixação

A imunofixação permite detetar e identificar proteínas monoclonais no soro ou urina.

As imunoglobulinas são anticorpos produzidos pelos plasmócitos após a estimulação dos linfócitos B, as quais pertencem a diferentes classes: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Apresentam na sua constituição cadeias pesadas e cadeias leves, que podem ser do tipo kappa (κ) ou lambda (λ).^[3]

Os componentes monoclonais surgem devido à hiperestimulação das células B ou por proliferação de um clone maligno destas mesmas células, o que leva à produção excessiva de um tipo de imunoglobulinas. As razões que levam à proliferação anormal das imunoglobulinas não é consensual, no entanto, são vários os fatores apontados: i) viral; ii) cancerígena; iii) estimulação antigénica contínua; iv) genético; v) fatores externos (ambientais).^[5]

3.3.1. Imunofixação Sérica

Na imunofixação sérica realizada no CHL, a pesquisa de proteínas monoclonais incide inicialmente nas imunoglobulinas do tipo IgG, IgM e IgA, assim como a respetiva correlação nas cadeias κ e λ . Dependendo do perfil electroforético observado, poderá ainda ser realizada uma pesquisa adicional de IgD, IgE e de cadeias leves livres (CLL) no soro, quando é detetada a presença de uma banda nas cadeias κ ou λ mas sem correspondência nas imunoglobulinas. Com a realização deste teste, pretende-se detetar a presença de componentes monoclonais no soro e atribuir, caso possível, a classe da imunoglobulina correspondente.^[5]

3.3.2. Imunofixação Urinária

Na imunofixação urinária pretende-se pesquisar a proteína Bence-Jones, ou seja, a pesquisa de CLL na urina que são produzidas por clones malignos da células B. Desta forma, a pesquisa incide sobre as cadeias κ e as cadeias λ , pesquisando também as cadeias leves κ livres κ (κ_L) e as cadeias leves livres λ (λ_L).^[6]

3.3.3. Metodologia

Na realização de imunofixações séricas e urinárias, são utilizadas amostras de soro recolhidas em tubo apropriado sem anticoagulante e, amostras de urina de 24h recolhidas em contentores apropriados sem a adição de ácido clorídrico, respetivamente. Em ambos os casos, o processamento das amostras é sempre acompanhado de um controlo que aparece referenciado no gel como EPL.

A deteção de imunoglobulinas monoclonais nas amostras de urina e soro, é realizada através de um sistema semiautomático por imunofixação, no equipamento **HYDRASYS (Sebia)**.

As imunoglobulinas são separadas por electroforese em gel de agarose, seguida da adição dos antisoros que, permitem a fixação e a precipitação dos imunocomplexos das proteínas separadas. As proteínas que não precipitam, são removidas do gel por contacto com papel de filtro, permitindo que apenas os imunocomplexos que ficam retidos na matriz do gel, sejam submetidos a coloração, com corante violeta ácido.^[7]

A pesquisa de componentes monoclonais no soro, poderá apresentar diversos perfis electroforéticos (Figura 3).

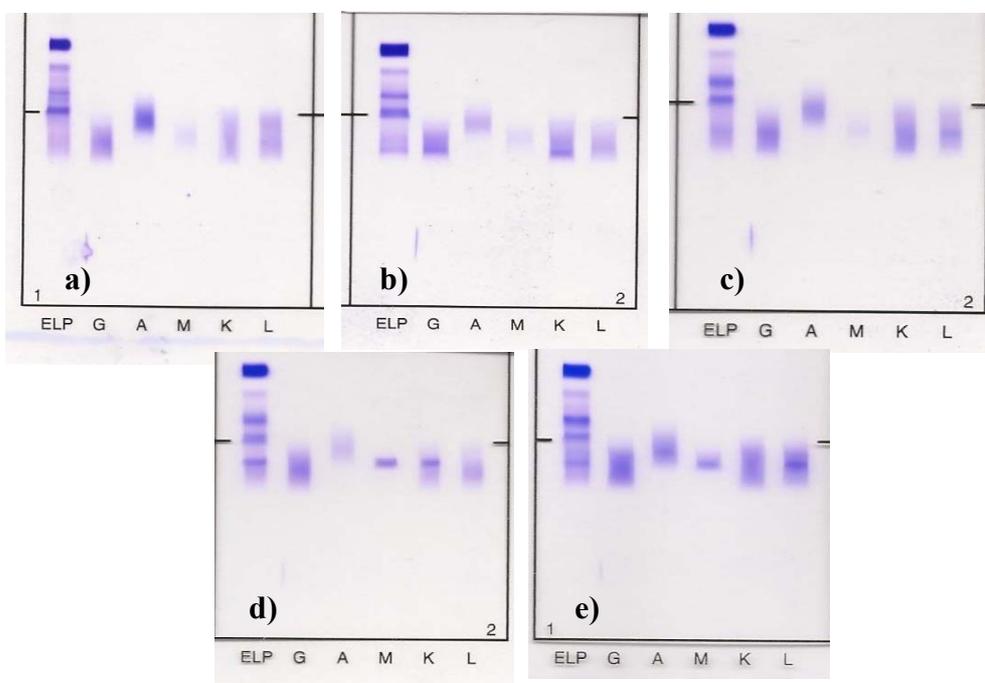


Figura 3. Imunofixação sérica; a) Perfil policlonal; b) Perfil monoclonal IgG k; c) Perfil monoclonal IgG λ; d) Perfil monoclonal IgM k; e) Perfil monoclonal IgM λ. (Cedido pelo CHL)

A presença de componentes monoclonais no soro, poderá estar associada ao Mieloma Múltiplo (MM). No entanto, nem sempre a presença de bandas monoclonais indica uma situação patológica maligna. A classificação das gamopatias monoclonais segue determinados critérios, por isso, deverá ser feita a distinção entre Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) e gamopatias monoclonais malignas. A MGUS corresponde a uma situação benigna com a presença de bandas da IgG, IgD, IgA IgM ou IgE, raramente com presença de bandas nas cadeias leves livres. Pelo contrário, nas gamopatias monoclonais malignas, onde se inclui o MM, são observadas bandas da IgG, IgA, IgD ou IgE com ou sem a presença de bandas nas cadeias leves livres. Para além disso, existem outras situações patológicas onde se pode observar o aparecimento de componentes monoclonais, como a IgM na macroglobulinemia, na doença de Waldenström.^[8]

O despiste de patologias como o MM, não deve ser feito tendo em conta apenas a análise da imunofixação sérica, pelo que, deverão ser realizados exames auxiliares de diagnóstico, como o medulograma.^[9]

Na avaliação da imunofixação urinária poderão ser observadas cinco situações possíveis: i) perfil policlonal; ii) presença de uma banda correspondente à albumina, o que indica um comprometimento do sistema renal; iii) presença de banda nas cadeias k ou λ sem CLL; iv) presença de banda nas cadeias k ou λ com CLL; v) presença de paraproteína GAM (Figura 4).^[5]

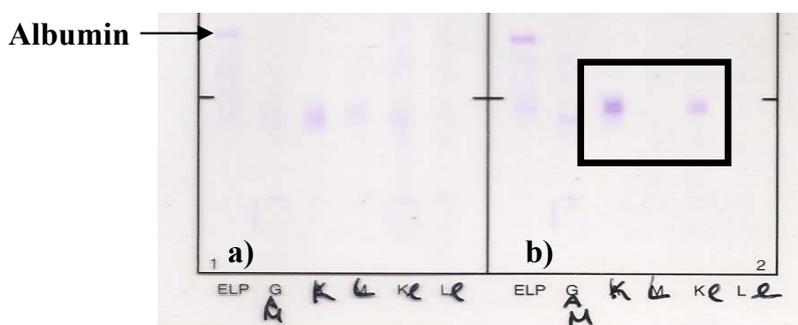


Figura 4. Imunofixação urinária; a) Perfil policlonal com um ligeiro comprometimento renal; b) Presença de uma banda nas cadeias k com correspondência nas CLL k com comprometimento renal. (Cedido pelo CHL)

Excepcionalmente, poderão ser observadas na imunofixação sérica e urinária, mais de duas bandas com correspondência a classes de imunoglobulinas diferentes nas cadeias k ou λ , devido à polimerização da proteína ou à presença de uma gamapatia biclonal. Esta situação patológica, poderá ocorrer quando existem dois clones celulares diferentes ou um clone celular monoclonal numa gamapatia monoclonal, com produção de uma ou mais classes de imunoglobulinas.^[10]

3.4. Pesquisa de Bandas Oligoclonais da IgG no Líquido Cefalorraquidiano

A pesquisa de bandas oligoclonais da IgG no líquido cefalorraquidiano (LCR), é realizada em conjunto com amostras de soro, colhidas em simultâneo e com a mesma concentração de IgG. As amostras são processadas juntamente com um controlo no aparelho semiautomático, **HYDRASYS (Sebia)**, por isofocalização em duas fases distintas. Numa primeira fase, as proteínas são separadas por electroforese em gel de agarose de alta resolução, enquanto que, numa segunda etapa, recorre-se à imunofixação das amostras por utilização de antisoros anti-IgG.^[11]

A interpretação dos resultados poderá ter cinco vertentes possíveis: i) Perfil policlonal (ausência de bandas no LCR e no soro); ii) Perfil oligoclonal (presença de bandas no LCR e ausência de bandas no soro); iii) Perfil oligoclonal em que existe maior número de bandas no LCR do que no soro; iv) Perfil oligoclonal em espelho (igual número de bandas no LCR e no soro); v) Perfil monoclonal (três a cinco bandas com espaçamento curto entre si no LCR e no soro); vi) Perfil monoclonal com a presença de bandas no soro e ausência no LCR (Figura 5).^[12]

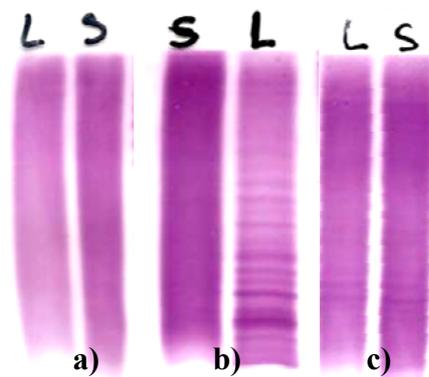


Figura 5. Perfil electroforético no LCR (L) e no soro (S); a) Perfil policlonal; b) Perfil oligoclonal; c) Perfil oligoclonal em espelho. (Cedido pelo CHL)

A pesquisa de bandas oligoclonais no LCR é utilizada para despiste de esclerose múltipla. No entanto, a presença de bandas oligoclonais não é específica de esclerose múltipla (EM), sendo que, estas bandas, também se encontram presentes noutras patologias do sistema nervoso central (SNC).^[12] Por isso, um diagnóstico de EM deverá assentar sempre num complemento entre a clínica, ressonância magnética e os testes laboratoriais.^[13]

Para além disso, poderão ser observados perfis em que existe maior número de bandas no LCR e perfis em que estão presentes bandas oligoclonais em espelho, devido a patologias sistémicas com o envolvimento do SNC.^[14]

De forma a avaliar a integridade da barreira hematoencefálica e a síntese intratecal de IgG, determina-se a fração de Reiber através do diagrama de Reiber (Figura 6.), após a determinação quantitativa de IgG e de albumina, no LCR e no soro, através do **IMAGE® 800 (BECKMAN COULTER)** por nefelometria.^[3] A partir dos valores obtidos de IgG e de albumina, é calculado o quociente entre a concentração no soro e no LCR em ambas as análises, deduzindo-se assim os índices de IgG e albumina. Estes parâmetros permitem avaliar a integridade da barreira hematoencefálica e a síntese intratecal de IgG, através da extrapolação da percentagem de Reiber: i) zona 1 – zona de referência; ii) zona 2 – barreira hematoencefálica comprometida sem síntese adicional de IgG; iii) zona 3 – barreira hematoencefálica comprometida com síntese adicional de IgG; iv) zona 4 – síntese de IgG com barreira hematoencefálica íntegra; v) zona 5 – sem interpretação científica.^[15]

O diagrama de Reiber permite complementar a pesquisa de bandas oligoclonais num diagnóstico de EM.

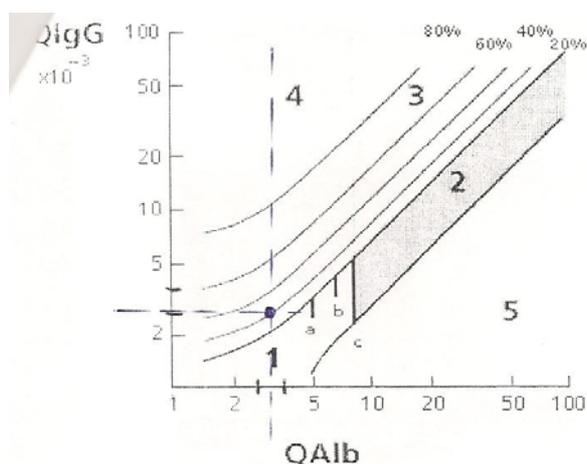


Figura 6. Diagrama de Reiber que indica que a relação entre o índice de albumina e de IgG é de 30%, revelando comprometimento da barreira hematoencefálica com síntese intratecal de IgG. (Cedido pelo CHL)

3.5. Serologia

A serologia é uma área importante na imunologia, na qual se estudam as infecções causadas por determinados microrganismos, através da sua deteção e/ou quantificação de anticorpos. No CHL, pesquisam-se infecções causadas por vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV), vírus Herpes Simplex 1 e 2 (HSV-1/2), *Toxoplasma gondii*, vírus da Rubéola, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Borrelia spp* (*Borrelia burgdorferi* – subespécies *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. sensu strictu*), *Legionella pneumophila* (serotipo 1), *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum pallidum*, *Rickettsia conorii* e *Coxiella burnetii*.

3.5.1. Serologia Automatizada

3.5.1.1. Grupo *TORCH* e EBV

A pesquisa de anticorpos contra os microrganismos pertencentes ao grupo *TORCH*, (*Toxoplasma gondii*, Outras infecções, Citomegalovírus e vírus Herpes Simplex 2), é realizada no **LIAISON[®] (DiaSorin)**, que utiliza como metodologia a quimioluminescência - CLIA. A quimioluminescência tem, como particularidade, a utilização de uma matriz sólida com antígenos revestidos de micropartículas magnéticas. A ligação dos anticorpos presentes na amostra do tipo IgG ou IgM, é detetada após a adição do anticorpo conjugado, anti-IgG ou anti-IgM, que origina um sinal quimioluminescente diretamente proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra.^[16]

O soro, é a amostra frequentemente utilizada para pesquisa dos anticorpos do tipo IgG ou IgM. No entanto, poderão ser pesquisados anticorpos do tipo IgG em amostras de LCR, de forma a verificar se existe passagem da barreira hematoencefálica e/ou produção de anticorpos.

A pesquisa do grupo *TORC*, (*Toxoplasma gondii*, Outras infecções, Citomegalovírus), é particularmente importante no caso das grávidas, as quais realizam estes testes laboratoriais de três em três meses, caso não sejam imunes, de forma a controlar a transmissão vertical que poderá originar problemas congênitos.^[17]

A avaliação do curso serológico é equivalente para todos os microrganismos, por isso, os resultados obtidos, deverão ser sempre interpretados em conjunto, anticorpos IgG e IgM (Tabela 3). Para além disso, uma única análise não permite interpretar o curso serológico de uma infecção, pelo que, deverão ser realizadas serologias seriadas num período de três semanas. No caso de uma infecção por *Toxoplasma gondii*, a interpretação será a seguinte:

- i) IgM negativa e IgG negativa – Ausência de infecção e ausência de imunidade;
- ii) IgM negativa e IgG positiva – Infecção antiga e imunidade;
- iii) IgM positiva e IgG negativa – Infecção aguda ou falso positivo da IgM;
- iv) IgM positiva e IgG positiva – Infecção recente ou falso positivo da IgM.

Nas situações em que se obtenham resultados duvidosos, deverão ser repetidos os doseamentos da IgG e da IgM e/ou realizado o teste de avidéz, de forma a diferenciar uma infecção recente (avidéz fraca) de uma infecção antiga (avidéz forte).^[18]

Na avaliação serológica do EBV, são avaliados o VCA IgG e IgM (antígeno da cápside) que, aparece numa fase aguda da doença e, o EBNA IgG (antígeno nuclear) que surge numa

fase mais tardia. A avaliação destes três parâmetros auxilia na distinção de uma infecção recente ou passada.^[19]

Tabela III. Grupo TORCH e EBV, e respectivos limites de referência.

Microrganismo		Intervalo de referência		
		Negativo	Duvidoso	Positivo
EBV	IgG	<10 U/mL	10 – 40 U/mL	≥40 U/mL
	EBNA IgG	<5 U/mL	5 – 20 U/mL	≥20 U/mL
	VCA IgG	<20 U/mL	–	≥20 U/mL
	IgM	<20 U/mL	20 – 40 U/mL	≥40 U/mL
<i>Toxoplasma gondii</i>	IgG	<7,2 UI/mL	7,2 – 8,8 UI/mL	≥8,8 UI/mL
	IgM	<6 UA/mL	6 – 8 UA/mL	≥8 UA/mL
CMV	IgG	<12 U/mL	12 – 14 U/mL	≥14 U/mL
	IgM	<18 U/mL	18 – 22 U/mL	≥22 U/mL
HSV-1/2	IgG	<0,9 index	0,9 – 1,1 index	≥1,1 index
	IgM	<0,9 index	0,9 – 1,1 index	≥1,1 index
Vírus da Rubéola	IgG	<5 UI/mL	5 – 10 UI/mL	≥10 UI/mL
	IgM	<20 UA/mL	20 – 25 UA/mL	≥25 UA/mL
Avidez IgG		Baixa	Moderada	Elevada
	CMV	<0,150 index	0,150 – 0,250 index	≥0,250 index
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<0,3 index	0,3 – 0,4 index	≥0,4 index

3.5.1.2. *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Borrelia spp*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia trachomatis*.

A pesquisa de anticorpos contra os microrganismos como o *Mycoplasma pneumoniae*, a *Chlamydophila pneumoniae*, a *Borrelia spp*, a *Legionella pneumophila* e da *Chlamydia trachomatis*, é importante no estudo de diversas patologias (Tabela IV). A determinação dos anticorpos IgM e IgG produzidos pelo organismo humano contra estes microrganismos, são determinados no equipamento TRITURUS (GRIFOLS) por ELISA, que é um ensaio imunoenzimático de fase sólida do tipo *sandwich*. Neste ensaio, a matriz encontra-se revestida com antígenos que formam imunocomplexos com os anticorpos presentes na amostra de soro. A adição de um anticorpo secundário do tipo anti-IgG e anti-IgM, marcado com uma

enzima, origina um composto corado. A intensidade de cor medida, é proporcional à concentração dos anticorpos IgG e IgM presentes.^[3]

Tabela IV. Intervalo de referência para os microrganismos e seu significado clínico.^[20]

Microrganismo		Intervalo de Referência			Significado Clínico
		Negativo	Duvidoso	Positivo	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	IgM	<1,1 IUE	1,1 – 2,0 IUE	≥2,0 IUE	Pneumonia
	IgG	<45 IUE	45 – 350 IUE	>350 IUE	
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	IgM	<9 NTU	9 – 11 NTU	>11 NTU	Pneumonia
	IgG	<9 NTU	9 – 11 NTU	>11 NTU	
<i>Borrelia spp</i>	IgM	<9 U/mL	9 – 11 U/mL	>11 U/mL	Doença de Lyme
	IgG	<9 U/mL	9 – 11 U/mL	>11 U/mL	
<i>Legionella pneumophila (Serotipo 1)</i>	IgM	<9 index	9 – 11 index	>11 index	Doença do Legionário
	IgG	<9 index	9 – 11 index	>11 index	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	IgM	<9 NTU	9 – 11 NTU	>11 NTU	Tracoma Conjuntivites de inclusão do adulto e recém-nascidos
	IgG	<9 NTU	9 – 11 NTU	>11 NTU	Linfogranuloma venéreo (LGV)

Os resultados obtidos deverão ser sempre interpretados em conjunto, anticorpos IgG e IgM, tal como referenciado na secção 3.5.1.1.

3.5.2. Serologia Manual

3.5.2.1. Testes de Aglutinação

Os testes de aglutinação realizados no CHL, são testes rápidos que permitem o despiste de infeções por diversos microrganismos (Tabela V). Estes testes imunológicos, baseiam-se na aglutinação entre os antígenos específicos de cada microrganismo e os anticorpos do tipo IgM e/ou IgG, presentes nas amostras de soro.

Na presença de um teste positivo, são feitas diluições sucessivas de forma a determinar os títulos de anticorpos. Apesar da positividade de um teste indicar uma infeção por um dos microrganismos enumerados, será de considerar a existência de reações cruzadas que tornam

este teste pouco específico. Por isso, um resultado positivo deverá ser confirmado por outra análise mais específica. É o caso do *Rapid Plasma Reagin* (RPR) que é um teste não treponémico e que, em caso de positividade, é sempre confirmado por FTA – ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*) e pelo TPPA (*Treponema Pallidum Particle Agglutination*), que são testes treponémicos. O TPPA é um teste serológico para a deteção de anticorpos contra o *Treponema pallidum pallidum*, utilizando partículas sensibilizadas com este microrganismo e que, na presença dos anticorpos, ocorre aglutinação.^[20]

Tabela V. Testes de aglutinação.^[20]

Teste de aglutinação		Microrganismo	Significado Clínico
Rosa de Bengala		<i>Brucella abortus</i>	Brucelose
Widal	PTA	<i>Salmonella paratyphi A</i>	Salmonelose
	PTB	<i>Salmonella paratyphi B</i>	
	TH	<i>Salmonella typhi</i> antígeno capsular H	
	TO	<i>Salmonella typhi</i> antígeno flagelar O	
Weil-Félix	OxK, Ox2 e Ox19 (antígenos de <i>Proteus sp</i>)	<i>Rickettsia conorii</i>	Febres exantemáticas
		<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	
		<i>Rickettsia prowasekii</i>	
		<i>Rickettsia typhi</i>	
		<i>Rickettsia rickettsii</i>	
RPR		<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis

3.5.2.2. Lâminas de *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii*

Os microrganismos, *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii*, são responsáveis pela Febre Q e pela Febre escaro nodular, respetivamente. O diagnóstico serológico é realizado com o kit da **Vircell** com base numa reação antígeno – anticorpo, por deteção com um anticorpo secundário, anti-imunoglobulinas humanas, marcado com fluoresceína. Baseada na imunofluorescência indireta (IFI), a observação de fluorescência ao microscópio de fluorescência **Labophot 2 (Nikon)**, revela a positividade do ensaio.

A pesquisa de *Coxiella burnetii*, incide, inicialmente, num *screening* dos anticorpos IgM e IgG presentes no soro contra os antígenos de fase I e fase II que, estão presentes, na fase crónica e na fase aguda da doença, respetivamente. Perante um resultado positivo nos anticorpos contra a fase I e/ou fase II, a pesquisa é direcionada para a deteção de

imunoglobulinas do tipo IgM e IgG, numa ou em ambas as fases e, a quantificação dos títulos de anticorpos através de preparações a diluições diferentes, (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800), até serem determinados os títulos. Para a investigação da *Rickettsia conorii*, são pesquisados anticorpos do tipo IgM e IgG. Num *screening* inicial, são efetuadas diluições para a mesma amostra de 1:40 e 1:80. No caso de a positividade se manter, são realizadas mais diluições até se obter o título de anticorpos correspondente, para a *Rickettsia conorii*.^[21,22]

3.5.2.3. FTA-ABS

A pesquisa de *Treponema pallidum pallidum* através de um teste treponémico, é efetuada por IFI como teste confirmatório. Para isso, é utilizado o kit da **BIOMÉRIEUX**, o qual inclui lâminas revestidas com *Treponema pallidum* que, reagem na presença de anticorpos IgM e IgG anti-*Treponema* no soro e no LCR. A formação dos imunocomplexos é detetada pela adição de um anticorpo secundário marcado com fluoresceína, anti-IgM e anti-IgG humanas. A avaliação dos resultados é realizada pela observação da fluorescência das espiroquetas ao microscópio de fluorescência, **Labophot 2 (Nikon)**.

A confirmação da positividade evidencia uma possível situação patológica, a sífilis, causada por este microrganismo.^[23]

3.5.2.4. Testes Imunocromatográficos

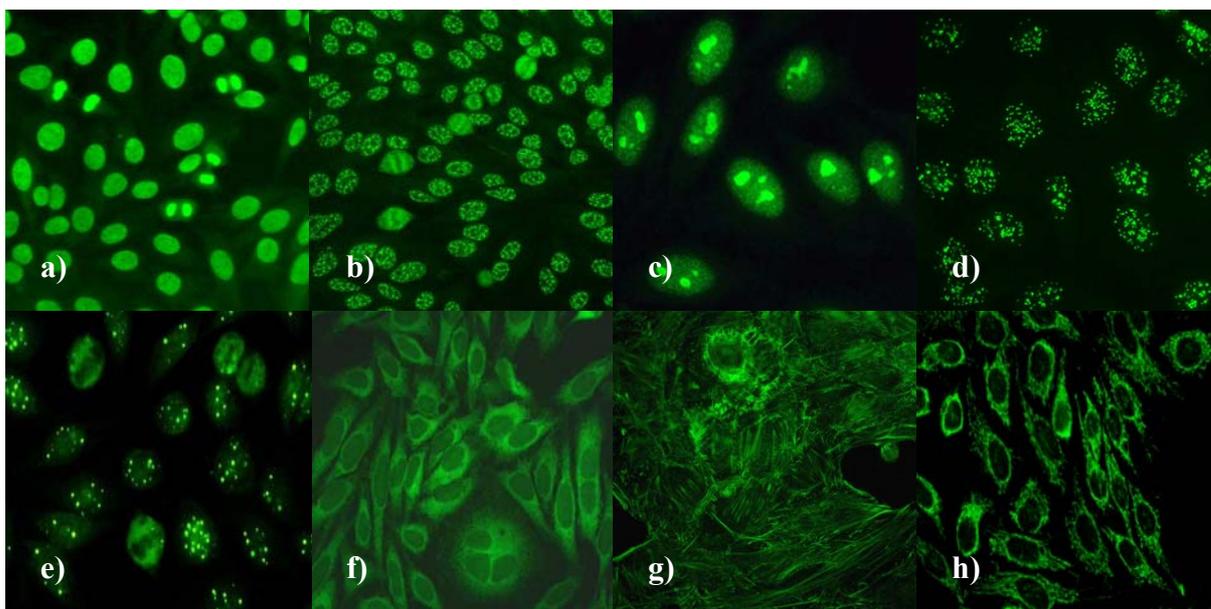
Os testes imunocromatográficos baseiam-se na interação entre o antígeno específico, fixado na membrana que, em contacto com o anticorpo específico no soro, revela o aparecimento de uma banda na zona positiva. A pesquisa de *Leptospira sp* e a reação de Paul-Bunnell, é realizada a partir deste tipo de teste. Contudo, a pesquisa de *Leptospira sp* incide sobre a pesquisa de anticorpos anti-IgM, como auxílio da deteção de leptospirose. Enquanto, na Paul-Bunnell, pesquisam-se os anticorpos heterófilos do tipo IgM, no diagnóstico laboratorial de mononucleose infecciosa.^[20,24]

3.6. Autoimunidade

A autoimunidade é uma área em contínua expansão que engloba diversas patologias autoimunes. Nesta secção, pretendo abordar de forma abreviada o que se faz no CHL e, de que forma, é direcionada a pesquisa aquando do aparecimento de indícios de uma patologia autoimune.

3.6.1. ANA – anticorpos antinucleares

A pesquisa dos ANA é realizada em amostras de soro numa proporção de 1:160, no aparelho **ZENIT SP (A.MENARINI diagnostics)**, por IFI em substrato de células epiteliais humanas Hep-2. As células Hep-2 apresentam elevada capacidade apresentadora de diversos antígenos sendo altamente sensível na detecção de autoanticorpos. A IFI baseia-se numa reação antígeno – anticorpo em lâmina, por detecção dos imunocomplexos através de um anticorpo secundário, anti-IgG, marcado com um fluorocromo (fluoresceína). A observação das lâminas é feita ao microscópio de fluorescência, **Labophot 2 (Nikon)**, e podem ser observados alguns exemplos de padrões: i) homogêneo; ii) mosqueado; iii) nucleolar; iv) dots nucleares; v) centrómero; vi) citoplasmático; vii) fibras de F-actina; viii) anticorpos anti-mitocondriais (Figura 7).^[25,26]



¹Figura 7. Exemplos de padrões dos ANA: a) homogêneo; b) mosqueado; c) nucleolar; d) dots nucleares; e) centrómero; f) citoplasmático; g) F-actina; h) Anticorpos anti-mitocondriais.

Para além da identificação do padrão, é realizada uma avaliação qualitativa das intensidades observadas em cada padrão: i) fluorescência 1+; ii) fluorescência 2+; iii) fluorescência 3+; iv) fluorescência 4+.^[27]

Os ANA estão presentes em diversas patologias autoimunes como o lúpus eritematoso sistémico, diversas patologias do tecido conectivo, artrite reumatoide, esclerose sistémica, cirrose biliar primária, síndrome de Sjögren, hepatite autoimune, polimiosite e

¹ Imagens retiradas de: a) b) http://pathlabs.rlbuht.nhs.uk/antinuclearantigen_i.htm; c) e) g) <http://pierre.kaminsky.pagesperso-orange.fr/LUPUS/ANA.htm>; d) f) EUROIMMUN; h) http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/25/orgentec/grafik/ama_hep2.jpg

dermatomiosite. Os padrões observados não fazem diagnóstico mas, um resultado positivo, permite direcionar o estudo para pesquisa de autoanticorpos específicos por outras técnicas, como *Imunoblotting*.^[27]

3.6.2. ANCA – anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos

A pesquisa dos ANCA é realizada em amostras de soro na proporção de 1:40, no aparelho **ZENIT SP (A.MENARINI diagnostics)**, por imunofluorescência indireta, em preparações otimizadas de neutrófilos humanos, fixadas em etanol e em formol. A metodologia é baseada na explicação efetuada na secção 3.6.1. Os padrões observados ao microscópio de fluorescência, **Labophot 2 (Nikon)**, em lâminas fixadas com etanol: i) cANCA (coloração citoplasmática difusa); ii) pANCA (padrão de reação perinuclear); e em lâminas fixadas em formol; iii) cANCA. (Figura 8).

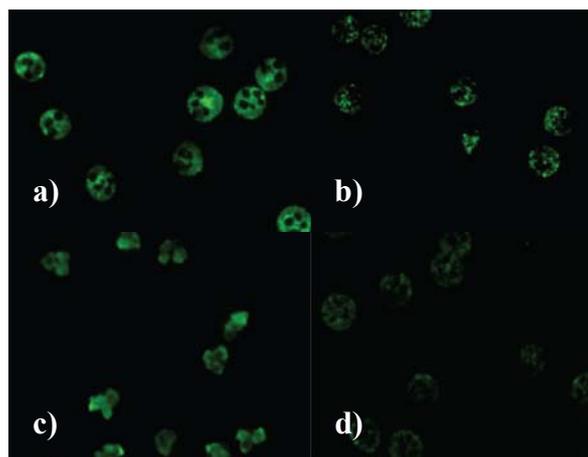


Figura 8. Padrões dos ANCA: Amostra 1 - a) cANCA (etanol); b) cANCA (formol); Amostra 2 - c) pANCA (etanol) d) cANCA (formol). (Damoiseaux et al)

O processamento das amostras em lâminas fixadas em etanol e formol, permite distinguir os padrões observados, uma vez que, o padrão pANCA em etanol adquire o padrão cANCA em formol, e o padrão cANCA em etanol mantém o mesmo padrão em formol. Os padrões observados nos ANCA estão frequentemente associados a patologias vasculíticas, incluindo a granulomatose de Wegener.^[28]

3.6.3. *Imunoblotting* – testes confirmatórios

Os testes confirmatórios são efetuados no **EUROBlotMaster (EUROIMMUN)**, através de um ensaio imunoenzimático, no qual são usadas tiras, compostas por uma membrana que está incorporada com vários antígenos específicos. Em contacto com o soro e na presença dos anticorpos específicos de cada antígeno, ocorre a ligação entre ambos, sendo que, a sua deteção, é efetuada pela adição de um anticorpo conjugado anti-IgG, marcado com uma enzima. A atividade enzimática origina uma reação colorimétrica, evidenciada pela presença de bandas.^[3]

No CHL, são pesquisados vários autoanticorpos (Tabela VI).^[29]

Tabela VI. Antígenos específicos contra os quais são pesquisados anticorpos específicos no CHL.

Dots Gástricos	Dots Hepáticos	Dots Citoplasmáticos	ANA
<ul style="list-style-type: none"> • Fator Intrínseco (IF) • Antígenos Células Parietais (PCA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorpos mitocondriais-AMA-M2, M2-3E(BPO) e M2 /nPDC • Dots nucleares - Sp100 e PML • Microsomas hepáticos/renais - LKM-1e LC-1 • Antígeno Solúvel Hepático e antígeno Fígado-Pâncreas (SLA/LP) • RNP do nucleoplasma - Ro-52 • Complexo poro-nuclear - GP₂₁₀ 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorpos mitocondriais (M2/nPDC) • Anticorpos anti-histidil tRNA sintetase - Jo-1, PL-7 e PL-12 • Partícula Reconhedora de Sinal (SRP-54) • Ribossomas (P0) 	<ul style="list-style-type: none"> • RNP do nucleoplasma - nRNP/Sm, SS-A, Ro-52 e SS-B • Topoisomerase I (Scl-70) • Nucléolo - PM-Scl e Ku • Anticorpos anti- histidil tRNA sintetase - Jo-1 • Centrômero A e B (CENP-A/B) • Antígeno Nuclear Celular de Proliferação (PCNA) • Cromatina (dsDNA) • Nucleossomas • Histonas • Proteína Ribossomal P e Ribossomas (P0) • Anticorpos mitocondriais (AMA-M2)

Os autoanticorpos pesquisados, podem estar presentes em diversas patologias autoimunes, pelo que, é possível obter um resultado positivo para os mesmos, em patologias diferentes. Por isso, um conjunto de anticorpos contra antígenos específicos, será um melhor indicador de uma possível patologia autoimune. A Tabela VII, resume as patologias autoimunes mais frequentes e os autoanticorpos associados.^[29]

Tabela VII. Patologias autoimunes mais frequentes e autoanticorpos associados.^[29]

Patologia Autoimune	Anticorpos
Lúpus Eritematoso Sistémico	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-Nucleares (ANA) • Ac. Anti-dsDNA • Ac. Anti-Sm • Ac. Anti-RNP • Ac. Anti-SSA • Ac. Anti-SSB • Ac. Anti-Proteína Ribossomal P • Ac. Anti-Ku • Ac. Anti-Histonas
Síndrome Sjögren	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-Nucleares (ANA) • Ac. Anti-SSA/SSB
Polimiosite/Dermatomiosite	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-Nucleares (ANA) • Ac. Anti-PM-Scl • Ac. Anti-Jo-1 • Ac. Anti-Ku • Ac. Anti-PL-7 • Ac. Anti-PL-12
Cirrose Biliar Primária	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-AMA-M2 • Ac. Anti-M2-3E(BPO) • Ac. Anti-Sp100 • Ac. Anti-PML
Hepatite Autoimune	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-Nucleares (ANA) • Ac. Anti-F-actina • Ac. Anti-SLA/LP • Ac. Anti-LKM-1 • Ac. Anti-LC-1
Gastrite Autoimune	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-PCA
Anemia Perniciosa	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. Anti-FI

3.6.4. Anticorpos anti-tiroideus

A pesquisa dos anticorpos anti-tiroideus, abrange a pesquisa de anticorpos contra a Peroxidase da Tiróide (TPO) e da tiroglobulina (TG) em amostras de soro no **ImmunoCAP 250 (Phadia)**, através da metodologia EliA, imunoensaio fluoroenzimático do tipo *sandwich*. É uma reação antigénio – anticorpo, a qual é detetada pela adição de um anticorpo secundário, marcado com uma enzima. Os imunocomplexos serão detetados por

fluorescência, devido à presença do substrato da enzima. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração dos anticorpos presentes na amostra.^[3]

A peroxidase da tiróide catalisa a oxidação do iodo e incorpora o iodo oxidado na tiroglobulina através da iodação dos resíduos de tirosina, enquanto a TG, apresenta um papel importante na biossíntese das hormonas da tiróide, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). A pesquisa dos anticorpos anti-tiroideos (ATT) é importante, uma vez que estão presentes em patologias autoimunes da tiróide, como a tiroidite de Hashimoto e doença de Graves.^[1]

Os limites de deteção no CHL para os anticorpos anti-TPO e anti-TG, encontram-se na Tabela VIII.

Tabela VIII. Limite de referência para os anticorpos anti-tiroideos.

Anticorpos	Negativo (IU/mL)	Duvidoso (IU/mL)	Positivo (IU/mL)
Anti-TPO	<280	280-344	>344
Anti-TG	<60	60-100	>100

3.7. Alergologia

Na avaliação das doenças alérgicas são utilizadas amostras de soro, as quais são processadas no **ImmunoCAP 250 (Phadia)**, através de um imunoensaio fluoroenzimático, do tipo *sandwich*. A metodologia baseia-se no mesmo princípio explicado na secção 3.6.4., contudo, a pesquisa incide sobre os anticorpos específicos da IgE.^[2,30]

No CHL, é realizado inicialmente um *screening* através do *Phadiatop* que, inclui a pesquisa da IgE específica dos principais alérgenos inalantes (gramíneas, árvores, ervas daninhas, fungos, ácaros, pêlo de gato e caspa de cão) e o Fx5 dos alérgenos alimentares (clara de ovo, bacalhau, leite, trigo, amendoim e soja). Se o resultado for positivo, são determinados os alérgenos específicos em causa e as respetivas classes: i) Classe 0 - <0,35 kU/L; ii) Classe 1- 0,35 a 0,70 kU/L; iii) Classe 2 - 0,70 a 3,50 kU/L; iv) Classe 3 - 3,50 a 17,50 kU/L; v) Classe 4 - 17,50 a 50,00 kU/L; vi) Classe 5 - 50,00 a 100 kU/L; vii) Classe 6 - >100 kU/L.^[30,31]

IV. Bioquímica

4.1. Equipamentos e Metodologias de Funcionamento

4.1.1. AU 2700™

A maioria dos parâmetros bioquímicos são doseados em amostras de soro e urina, no equipamento AU 2700™ (BECKMAN COULTER), que utiliza como metodologia a fotometria por medição da absorvância, que é diretamente proporcional ao que se pretende dosear. Esta medição é baseada em diferentes princípios: i) ensaio de cor enzimático; ii) ensaio de cor fotométrico; iii) ensaio UV cinético; iv) ensaio de cor cinético; v) ensaio de imunoinibição enzimática; vi) ensaio UV fotométrico; vii) ensaio UV enzimático; viii) ensaio imunoturbidimétrico; ix) ensaio imunoenzimático homogêneo (Tabela IX).^[3]

Tabela IX. Princípios de ensaio do AU 2700™.^[3]

Ensaio	Princípio do Ensaio
Ensaio de cor enzimático	A conversão do substrato, através da atividade enzimática, num produto corado sendo a coloração medida.
Ensaio de cor fotométrico	A formação de um produto corado, leva à medição da coloração.
Ensaio UV cinético	A conversão do NADH em NAD ⁺ ou NADP ⁺ em NADPH é medida a 340nm e a 340/660nm respetivamente.
Ensaio de cor cinético	Na presença de um substrato enzimático forma-se um produto corado, no qual é medida a absorvância a 410 e/ou 480nm.
Ensaio de imunoinibição enzimática	A absorvância a 340nm é medida após conversão de NADP ⁺ em NADPH através da inibição da atividade enzimática por ligação de um anticorpo.
Ensaio UV fotométrico	A absorvância de um complexo formado é medida a 340/380nm.
Ensaio UV enzimático	Na presença de uma enzima existe a desfosforilação do ATP a ADP, assim como a redução de NAD ⁺ a NADH. A absorvância a 340nm é medida.
Ensaio imunoturbidimétrico	O composto a dosear reage especificamente com autoanticorpos anti-humanos formando-se agregados insolúveis. A absorvância dos agregados é medida.
Ensaio imunoenzimático homogêneo	O analito liga-se a anticorpos específicos presentes na amostra. Devido a esta associação, a enzima no estado inativo passa ao estado ativo. A quantidade de enzima ativa é medida por absorvância.

Na quantificação dos principais eletrólitos – sódio, potássio e cloro – o autoanalisador possui o módulo de ISE, que através de elétrodos de membrana específicos para os iões,

medem o potencial elétrico de acordo com a Equação de Nernst. Contudo, é necessária a conversão do potencial elétrico para unidades de concentração, por isso, este sistema recorre à comparação dos valores com uma referência interna.^[3]

As amostras que chegam ao laboratório são submetidas a um processo que inclui o seu registo e a avaliação das suas condições. Contudo, o elevado número de amostras e a necessidade de resposta em tempo útil, poderá condicionar este processo sendo que o autoanalisador poderá ter um papel fundamental nesta questão. O autoanalisador tem a particularidade de determinar os índices de lipémia, de icténcia e de hemólise das amostras por fotometria. Esta análise semi-quantitativa é de grande utilidade no Laboratório de Bioquímica, uma vez que, durante o processo de validação dos resultados alerta para a qualidade da amostra. A qualidade da amostra é essencial para a boa qualidade dos resultados emitidos pelo laboratório, evitando fatores como os referidos anteriormente, que poderão interferir nos doseamentos dos parâmetros bioquímicos, em proporções diferentes.

4.1.2. DXi 800™

O equipamento **DXi 800™ (BECKMAN COULTER)** utiliza como metodologia a quimioluminescência, que tem como particularidade a utilização de partículas paramagnéticas revestidas com um anticorpo monoclonal. Baseada na interação antigénio – anticorpo, o anticorpo monoclonal irá ligar-se ao antigénio específico. A deteção do complexo ocorre após a ligação de um anticorpo conjugado marcado com uma enzima e, pela adição do substrato quimioluminescente, que gera luz que será medida por um luminómetro. Contudo, na quantificação de cada um dos parâmetros utiliza diferentes princípios de ensaio: i) imunoenzimático competitivo; ii) imunoenzimático sequencial de duas fases - tipo *sandwich*; iii) imunoenzimático de local duplo - tipo *sandwich*; iv) imunoenzimático simultâneo de fase única - tipo *sandwich*. As suas funcionalidades recaem essencialmente no doseamento em amostras de soro dos parâmetros endócrinos das supra-renais/hipófise, do metabolismo ósseo, da monitorização da diabetes, do sistema reprodutivo e da tiróide. Contudo, doseia ainda, os marcadores tumorais, os parâmetros do metabolismo do ferro e do sistema cardiovascular.^[3,16]

4.1.3. COBAS® e411

O equipamento **COBAS® e411 (Roche Diagnostics)** é utilizado no CHL para a determinação de marcadores tumorais específicos, em amostras de soro, utilizando como metodologia a eletroquimioluminescência – ECL. A eletroquimioluminescência tem como

particularidade a utilização de microesferas magnéticas revestidas com estreptavidina, e ainda, anticorpos monoclonais específicos de cada analito, que se encontram marcados com o complexo rutênio. Assim são geradas espécies altamente reativas aquando da formação dos complexos imunológicos, que ao reagirem entre si levam à ativação elétrica do complexo de rutênio, gerando de luz que é diretamente proporcional à concentração do analito.^[3]

4.1.4. AUTION MAX™ AX-4030

O AUTION MAX™ AX-4030 (A.MENARINI diagnostics) é um equipamento usado para analisar amostras de urina através de tiras de teste AUTION MAX, para a determinação de vários parâmetros bioquímicos, utilizando diferentes métodos de análise.

Os parâmetros bioquímicos - bilirrubina, eritrócitos, glucose, leucócitos, nitritos, pH, proteínas e urobilinogénio - são quantificados através de refletância por comprimento de onda duplo. Enquanto os parâmetros como a densidade e a cor utilizam métodos diferentes, como a refratometria por reflexão e a análise de reflexão da luz, respetivamente.^[3]

4.1.5. Teste múltiplo Triage® Cardiac - Alere™

O equipamento Teste múltiplo Triage® Cardiac (Alere™) é utilizado no CHL na determinação quantitativa do peptídeo natriurético cerebral (BNP) e mioglobina. Para a realização do teste são usadas amostras de sangue total, as quais são analisadas recorrendo a imunoensaios de fluorescência, por reação com os anticorpos conjugados presentes no dispositivo de teste. A formação de imunocomplexos é detetada por fluorescência, que é diretamente proporcional à concentração dos componentes pesquisados.^[3]

4.2. Avaliação da Função Cardíaca

O sistema cardiovascular é fundamental no bombeamento do fluxo sanguíneo, garantindo a irrigação permanente de todo o organismo humano. As alterações neste bombeamento contínuo, conduzem a determinadas situações patológicas cardíacas com consequências graves, como é o caso dos síndromes coronários agudos, que incluem as doenças isquémicas cardíacas desde o desenvolvimento de angina instável até à sua evolução num enfarte do miocárdio. Por isso, no estudo do sistema cardiovascular deverão ser determinados um conjunto de biomarcadores, que se encontram usualmente alterados perante estas situações: i) creatina cinase (CK); ii) creatina cinase isoenzima MB (CK-MB); iii) mioglobina; iv)

peptídeo natriurético cerebral; v) troponina I. Assim, a avaliação médica dos biomarcadores cardíacos deverá ser realizada em conjunto, devido à sua liberação temporal após uma lesão cardíaca, tendo em conta a sintomatologia clínica descrita pelo doente, assim como outros exames auxiliares de diagnóstico, como um eletrocardiograma (Figura 9). Os intervalos de referência para estes parâmetros podem ser encontrados no Anexo I.^[32]

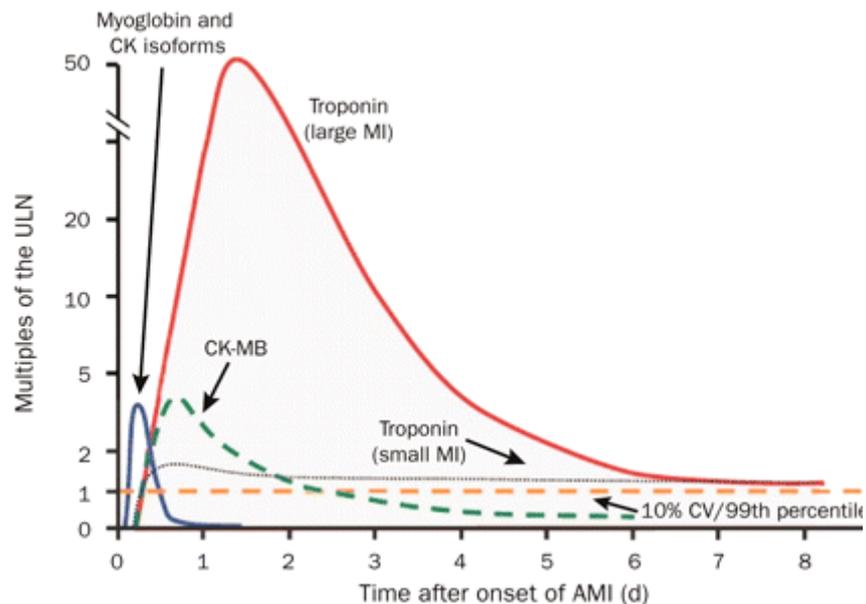


Figura 9. Evolução temporal da liberação dos biomarcadores cardíacos perante uma lesão cardíaca. (Peela et al)

4.2.1. Creatina Cinase e Creatina Cinase Isoenzima MB

A creatina cinase é uma enzima que catalisa a fosforilação da creatina através do consumo de adenosina trifosfato (ATP), formando-se fosfocreatina e adenosina difosfato (ADP).^[3] Esta enzima apresenta três isoenzimas (MM, MB e BB), que se encontram distribuídas em quantidades diferentes pelo músculo-esquelético, músculo cardíaco e cérebro. A creatina cinase isoenzima MM (CK-MM) é a isoenzima em maior quantidade no músculo-esquelético e no músculo cardíaco. Contudo, a CK-MB é mais específica do miocárdio devido à sua percentagem significativa neste músculo.^[3,33]

Laboratorialmente estes parâmetros são determinados no equipamento AU 2700TM (BECKMAN COULTER), a CK é medida através de um ensaio UV cinético enquanto a CK-MB é doseada através de um ensaio de imunoinibição enzimática. Assim, poderão ser obtidos valores elevados de CK e CK-MB, sugestivos de lesão das células do miocárdio (Figura 9). No entanto, a CK é um parâmetro cardíaco pouco específico, estando alterado tal como a CK-MB em patologias de nível muscular, como ocorre nas miopatias crónicas.^[33]

4.2.2. Mioglobina

A mioglobina é uma proteína transportadora de oxigênio no organismo humano, que se encontra presente no músculo-esquelético e no músculo cardíaco. Apesar de ser um biomarcador com baixa especificidade, é libertado precocemente relativamente a outros biomarcadores da função cardíaca, sendo que, um resultado negativo exclui a lesão muscular, ao invés de um resultado positivo, auxiliando no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio (Figura 9).^[33]

4.2.3. Peptídeo Natriurético Cerebral

O BNP é uma neuro hormona cardíaca sintetizada pelos ventrículos cardíacos. A sua libertação ocorre perante situações de hipóxia, isquémia, atividade física, aquando do aumento da resistência vascular cardíaca e da dilatação dos ventrículos. Por isso, é um marcador com elevado prognóstico perante estados patológicos cardíacos.^[33,34]

4.2.4. Troponina I

As troponinas são proteínas regulatórias consideradas os biomarcadores cardíacos de eleição para a deteção de lesão cardíaca devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que, aparecem precocemente e mantêm-se elevados durante alguns dias após a lesão (Figura 9). Apesar de existirem três tipos de troponinas (C, I e T) apenas as troponinas I e T são específicas do músculo cardíaco, enquanto a troponina C é produzida no músculo-esquelético e cardíaco. As troponinas, biologicamente, participam na regulação da interação do cálcio de forma a ocorrer a ligação miosina – actina, regulando a contração muscular. No CHL apenas é determinada a troponina I de alta sensibilidade, no equipamento **DXi 800™ (BECKMAN COULTER)**, através de um ensaio imunoenzimático de local duplo, aumentando assim a sensibilidade de deteção desta proteína para concentrações muito baixas.^[32,34]

4.2.5. Proteína C Reativa (PCR)

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda sendo um marcador de inflamação. No caso da avaliação do sistema cardiovascular é importante no desenvolvimento do processo

aterosclerótico, no qual decorre um processo inflamatório. Contudo, apresenta baixa especificidade, uma vez que, em qualquer processo inflamatório esta se encontra aumentada, como exemplo nas patologias infecciosas.^[2,33]

No CHL a PCR é doseada no equipamento AU 2700™ (BECKMAN COULTER), através de um ensaio imunoturbidimétrico.

4.2.6. Relação da atividade muscular com a atividade cardíaca

Como tem sido referenciado nas secções anteriores, grande parte dos biomarcadores cardíacos também estão presentes no músculo-esquelético, podendo surgir aumentados perante atividade muscular intensa não sendo obrigatoriamente uma lesão cardíaca. Assim, marcadores como a lactato-desidrogenase (LDH) e o lactato, que estão relacionados com a atividade muscular, também se encontram alterados em situações patológicas associadas ao sistema cardiovascular.

A LDH é uma enzima que está presente na maior parte das células do organismo humano, sendo essencial na produção de lactato nos músculos e na conversão do mesmo, no fígado. O lactato formado é utilizado pelo fígado na gluconeogénese, na oxidação do piruvato pela LDH. Este mecanismo é essencial para a produção de ATP em condições de atividade física intensa. Esta enzima existe sob a forma de cinco isoenzimas (LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ e LDH₅), que variam entre si na proporção entre as subunidade H (*Heart*) e M (*Muscle*).

A LDH e o lactato são doseados no equipamento AU 2700™ (BECKMAN COULTER), através de um ensaio UV cinético e de um ensaio de cor enzimático, respetivamente. Alterações nos seus valores ocorrem perante diversas situações patológicas, como um enfarte do miocárdio. Contudo, a LDH é um parâmetro de baixa especificidade não indicando qualquer situação patológica específica. Os níveis de lactato poderão ainda estar alterados em consequência da diminuição da gluconeogénese devido a uma disfunção hepática.^[3,35]

4.3. Avaliação da Função Hepática

O fígado é um dos órgãos mais importantes do organismo humano devido às funções vitais que desempenha. Está envolvido em diversos processos como a vascularização, a metabolização/excreção de diversos compostos endógenos (bilirrubina e sais biliares) e exógenos (fármacos e substâncias tóxicas), na síntese proteica, na regulação do metabolismo dos hidratos de carbono e no metabolismo dos lípidos.^[3]

De forma a avaliar a função hepática, poderão ser determinados diversos parâmetros no equipamento AU 2700TM (BECKMAN COULTER), que avaliados em conjunto auxiliam no diagnóstico clínico: i) albumina; ii) bilirrubina; iii) fosfatase alcalina; iv) gama-glutamilttransferase; v) transaminases. Os intervalos de referência para estes parâmetros podem ser encontrados no Anexo I.

Os princípios de ensaio utilizados no doseamento de cada um dos parâmetros referidos acima são diferentes, sendo que a albumina e a bilirrubina (total e direta) são quantificadas através de ensaios de cor fotométricos, a fosfatase alcalina e a gama-glutamilttransferase por ensaios de cor cinéticos e ainda, as transaminases por ensaios UV cinéticos.

4.3.1. Albumina

A albumina é uma proteína sintetizada exclusivamente pelo fígado, exercendo funções fundamentais na regulação da pressão osmótica coloidal e no transporte de diversas substâncias de carácter endógeno - bilirrubina, hormonas e iões - assim como de carácter exógeno, como é o caso dos fármacos.

Como referenciado na secção 3.2.1. alterações nas concentrações de albumina poderão ser observadas em diversas patologias (Tabela II). A hipoalbuminémia poderá ocorrer em situações de desnutrição, de síndrome nefrótica e perdas gastrointestinais. No entanto, em patologias hepáticas verifica-se nos casos de cirrose, hepatite autoimune e hepatite alcoólica.^[4]

4.3.2. Bilirrubina

A bilirrubina é o produto resultante do catabolismo do grupo heme da hemoglobina. A destruição dos eritrócitos ocorre no sistema reticulo-endotelial no baço, fígado e medula óssea. O transporte da bilirrubina não conjugada (indireta) para o fígado é realizado pela albumina, local onde ocorre a sua conjugação com o ácido glucorónico para formar a bilirrubina conjugada (direta). Esta é excretada com a bÍlis, passando posteriormente para o intestino, onde é transformada em urobilinogéneo. No intestino, parte do urobilinogéneo é reabsorvido, sendo conduzido para o fígado e excretado novamente com a bÍlis. O urobilinogéneo que permanece na circulação sanguínea é eliminado através da urina.^[3]

As alterações no metabolismo da bilirrubina poderão originar icterícia hemolítica, icterícia hepatocelular ou icterícia obstrutiva. A diferenciação dos tipos de icterícia encontra-se na Tabela X.^[36]

Tabela X. Diferenciação dos tipos de icterícia.^[36]

	Causas	Diagnóstico Laboratorial		
		Sangue	Urina	Fezes
Icterícia Hemolítica	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da produção de bilirrubina. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina Direta – normal. • Bilirrubina indireta – aumentada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina – negativa. • Urobilinogénio – aumentado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Urobilinogénio – aumentado.
Icterícia Hepatocelular	<ul style="list-style-type: none"> • Defeito de captação; • Defeito de conjugação; • Problemas na eliminação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina Direta – aumentada. • Bilirrubina Indireta – mais aumentada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina – positiva. • Urobilinogénio – aumentado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Urobilinogénio – diminuído.
Icterícia Obstrutiva	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas na circulação biliar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina Direta – mais aumentada. • Bilirrubina Indireta – aumentada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina – positiva. • Urobilinogénio – negativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Urobilinogénio – diminuído ou ausente.

No CHL são determinadas a bilirrubina direta e a bilirrubina total. A bilirrubina total é determinada analiticamente no equipamento **AU 2700TM (BECKMAN COULTER)**, por quantificação de ambas as frações de bilirrubina (direta e indireta), mas não as diferenciando.

4.3.3. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que se encontra essencialmente no osso (osteoblastos), no fígado, na placenta, na mucosa do intestino delgado e nos túbulos proximais do rim.^[37] É uma enzima que catalisa a hidrólise de grupos fosfato de diversos componentes em meio alcalino, sendo que a sua atividade é relevante no transporte dos lípidos no intestino e no processo de formação do osso.^[3]

As alterações observadas na concentração da ALP estão essencialmente relacionadas com doenças hepatobiliares e doenças ósseas. A ALP aumenta significativamente perante uma situação de colestase devido à estimulação dos hepatócitos para a síntese desta enzima e os sais biliares facilitam a libertação da ALP das membranas celulares. Em doenças ósseas também se observa o seu aumento devido à estimulação dos osteoblastos que sintetizam esta enzima.^[3,37]

4.3.4. Gama-glutamyltransferase

A gama-glutamyltransferase (γ -GT) é uma enzima que catalisa a transferência do grupo γ -glutamil para recetores peptídicos, encontrando-se envolvida no transporte de aminoácidos e péptidos para o interior das células. Esta enzima encontra-se nos túbulos proximais renais, fígado, pâncreas e intestino.

Analogamente à ALP, é um parâmetro bastante sensível de doença hepatobiliar devido às razões enumeradas na secção 4.3.3. Contudo, verifica-se também o seu aumento em doenças hepatocelulares embora não seja tão significativo como observado para as transaminases. Para além disso, os valores de γ -GT são afetados pelo consumo frequente de álcool e de compostos químicos, ou seja, aumentam perante uma situação de hepatite alcoólica aguda.^[3,37]

4.3.5. Transaminases

As transaminases são enzimas que estão localizadas em diversas partes do organismo, sendo que as de maior significado clínico são a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST). A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, encontrando-se essencialmente no fígado, no coração e no músculo-esquelético. Enquanto a ALT é uma enzima citoplasmática que se encontra principalmente no fígado. A AST e a ALT intervêm na transferência de grupos amina (NH_2) do aspartato e da alanina para o α -cetoglutarato, para formar oxaloacetato e piruvato, respetivamente. Em ambas as reações forma-se ainda glutamato.

Clinicamente são enzimas consideradas indicadoras de doença hepatocelular, sendo que, a ALT é mais sensível que a AST. Tendencialmente, numa lesão hepatocelular a ALT apresenta-se mais aumentada em relação a AST, como ocorre numa hepatite viral aguda. Contudo, poderá observar-se a situação inversa numa hepatite alcoólica aguda.^[3,37]

4.4. Avaliação da Função Tiroideia

A glândula tiroideia apresenta funções endócrinas devido à produção das hormonas T_4 e T_3 , que são essenciais no crescimento e maturação do esqueleto, no desenvolvimento fetal, no consumo de oxigénio com consequente produção de calor, no controlo da frequência cardíaca, no metabolismo dos lípidos e dos hidratos de carbono. A libertação destas hormonas é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário através de mecanismos de *feedback* positivos

ou negativos. Assim, a libertação da hormona libertadora de tirotropina (TRH) no hipotálamo estimula a síntese e libertação da hormona estimuladora da tiróide (TSH) pela hipófise, que irá por sua vez estimular a glândula tiroideia a produzir as respetivas hormonas.

No CHL a função tiroideia é avaliada no equipamento **DXi 800™ (BECKMAN COULTER)**, através do doseamento das hormonas TSH, T₃ e T₄ (totais e livres). No doseamento destes parâmetros são utilizados diferentes princípios de ensaio, sendo que, a T₃ (livre e total) e a T₄ total são quantificadas através de ensaios imunoenzimáticos competitivos, a T₄ livre por um ensaio imunoenzimático de duas fases e ainda, a TSH através de um ensaio imunoenzimático de local duplo. As alterações nestes parâmetros (Anexo I) poderão estar associadas à disfunção da tiróide como no hipotiroidismo, no hipertiroidismo ou nas doenças autoimunes, referenciadas na secção 3.6.4.

Na generalidade, no hipotiroidismo observa-se a diminuição das hormonas tiroideias, T₃ e T₄, que poderá ser de carácter primário ou secundário dependendo se a TSH se encontra aumentada ou diminuída, respetivamente. Contrariamente, no hipertiroidismo observa-se o aumento das hormonas tiroideias.^[1]

4.5. Avaliação da Função Renal

O sistema renal é essencial para o normal funcionamento do organismo humano devido às suas funções de filtração, reabsorção e excreção, que permitem a eliminação de resíduos provenientes do metabolismo. Revela ainda um papel fundamental no controlo da homeostase do meio interno, através do controlo hidro-eletrolítico e ácido-base, com consequente regulação da pressão arterial.^[36,38] Alterações na fisiologia do sistema renal podem ser observadas em situações patológicas como diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, insuficiência renal de carácter agudo ou crónico, litiase urinária e nas infeções do trato urinário.^[38]

Na avaliação da função renal são usados como exames de eleição a determinação da microalbuminúria e da creatinina, sendo que, os intervalos de referência para estes parâmetros podem ser encontrados no Anexo I. Contudo, na rotina diária laboratorial são realizados exames como a urina tipo II e a avaliação do sedimento urinário, que poderão revelar resultados importantes, embora não sejam específicos de nenhuma patologia em particular.

4.5.1. Creatinina e Microalbuminúria

A creatinina é o produto resultante do metabolismo da creatina, sendo que, é um componente eliminado exclusivamente pelo rim, o qual não é reabsorvido. Assim, a determinação da creatinina no soro e em amostras de urina de 24h, corresponde a um bom parâmetro de avaliação da taxa de filtração glomerular.^[3]

A microalbuminúria é um teste laboratorial que permite determinar quantidades mínimas de albumina (secção 4.3.1.), que é eliminada na urina. A eliminação urinária diária normal de albumina é de cerca de 15mg, sendo que, a deteção de microalbuminúria é considerada quando obtidos valores de excreção urinária de albumina entre 30 a 300mg em amostras de urina de 24h. A determinação deste parâmetro, revela bastante importância no acompanhamento de doentes com diabetes *mellitus* devido ao risco acrescido de desenvolvimento de nefropatia, assim como, o aumento da morbilidade e mortalidade.^[39]

A microalbuminúria e a creatinina (sérica e urinária) são parâmetros determinados no equipamento **AU 2700TM (BECKMAN COULTER)** no CHL, usando ensaios imunoturbidimétricos e ensaios de cor enzimáticos, respetivamente.

4.5.2. Ureia

A ureia corresponde ao produto resultante do catabolismo dos aminoácidos e das proteínas. Este componente, tal como a creatinina, é um catabolito endógeno que é não é reabsorvido pelos rins sendo eliminado na urina. O doseamento sérico da ureia é efetuado no CHL, no equipamento **AU 2700TM (BECKMAN COULTER)**, através de um ensaio UV cinético. Poderão ser observadas situações de hiperuricemia quando a função renal está comprometida e, apesar de ser considerado um parâmetro de avaliação da função renal, a *clearance* da creatinina caracteriza melhor a função renal.^[3]

4.5.3. Urina Tipo II

A urina tipo II corresponde à análise dos parâmetros bioquímicos em amostras de urina não centrifugada, através do método de colheita do jato intermédio de urina. Esta análise é realizada no equipamento **AUTION MAXTM AX-4030 (A.MENARINI diagnostics)**, que permite a determinação rápida de dez parâmetros distintos em tiras de plástico como: i) bilirrubina; ii) cor; iii) densidade; iv) eritrócitos; v) glucose; vi) leucócitos; vii) nitritos; viii) pH; ix) proteínas; x) urobilinogénio (Tabela XI). A maioria dos parâmetros é avaliada sob a

forma de resultado semi-quantitativo devido à atribuição de intensidades relativas, correspondentes a uma concentração estabelecida em caso de positividade, à exceção do pH e da densidade, que correspondem a valores numéricos quantificados.

Tabela XI. Parâmetros determinados em Urina Tipo II.^[40]

Parâmetro Bioquímico	Valores de Normalidade	Intervalo de Detecção	Significado Clínico
Bilirrubina	<0,5mg/dL	0,5 – 6mg/dL	Avaliação da Função Hepática
Cor	Amarela	Avermelhada	Hematúria
		Alaranjada a Esverdeada	Presença de Bilirrubina
		Vermelho acastanhado	Presença de Mioglobina
Densidade	1,000 – 1,030		Avaliação da Capacidade de Concentração do Rim
Eritrócitos	<0,03mg/dL	0,03 – 1mg/dL	Hematúria
Glucose	<50mg/dL	50 – 1000mg/dL	Glicosúria possivelmente associada a Diabetes <i>mellitus</i>
Leucócitos	<25Leu/ μ L	25 – 500Leu/ μ L	Marcador de Inflamação
Nitritos	<0,08mg/dL	0,08 – 0,5mg/dL	Bacteriúria (à exceção de bactérias que não reduzem os nitratos)
pH	Aproximadamente 6	4,6 – 8	Avaliação do equilíbrio ácido-base
Proteínas	<15mg/dL	15 – 1000mg/dL	Avaliação da Função Renal
Urobilinogénio	<2mg/dL	2 – 8mg/dL	Avaliação da Função Hepática

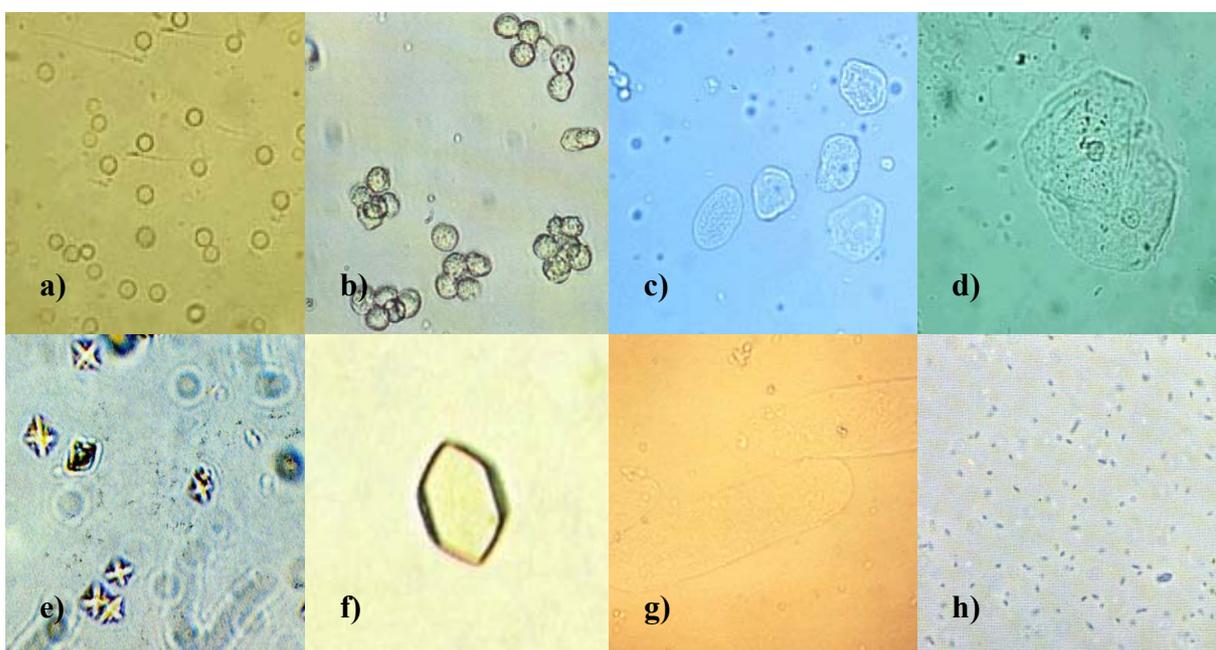
4.5.4. Avaliação do Sedimento Urinário

A avaliação do sedimento urinário permite examinar amostras de urina centrifugada, a 2000 rpm, ao microscópio ótico **Alphaphot YS (NIKON)**. Esta análise é importante para a deteção e avaliação de alterações no sistema renal e/ou no sistema urinário. Pretende-se pesquisar a existência de elementos figurados em dez campos, com a objetiva de 10x e 40x, como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cristais, cilindros e bactérias (Figura 10). A presença de elementos figurados na urina é comum, desde que estejam presentes em baixo número, não correspondendo a nenhuma situação patológica. A presença de eritrócitos deve ser rara (3/campo), sendo que, um número anormal poderá ser sinónimo de hematúria devido a patologias renais ou do trato urinário. Assim como os eritrócitos, os leucócitos também poderão estar presentes (3/campo) e o seu aumento ocorre na sequência de processos

inflamatórios, geralmente associados ao trato urinário, essencialmente infecciosos. No entanto, aquando da presença conjunta de cilindros leucocitários a inflamação é renal.

As células epiteliais encontradas na urina poderão ser de três tipos: tubular renal, do epitélio de transição ou escamosas. Poderão ser encontradas 3 a 5 células por campo, contudo quando existentes em grande número poderão corresponder a uma situação patológica do local de onde provêm. Para além de células, poderão ainda ser observados com frequência cristais de oxalato de cálcio e de ácido úrico devido à dieta alimentar e ao pH da urina, não tendo qualquer significado clínico. Pelo contrário, a presença de cristais de cistina, tirosina ou leucina estão sempre associados a patologias metabólicas. Assim como os cristais, os cilindros também poderão estar presentes, não tendo significado clínico, sendo os hialinos os que surgem com maior frequência. No entanto poderão ser observados cilindros do tipo granuloso, leucocitários e eritrocitários que surgem em patologias renais e glomerulares respetivamente.

Contudo, os resultados obtidos dependerão sempre da qualidade da amostra e das condições em que a mesma foi colhida. Por isso, a presença de bactérias poderá corresponder a uma contaminação da amostra ou a uma infeção urinária.^[40]



²Figura 10. Elementos figurados encontrados no sedimento urinário: a) eritrócitos; b) leucócitos; c) células do epitélio de transição; d) células epiteliais escamosas; e) cristais de oxalato de cálcio; f) cristais de ácido úrico; g) cilindros hialinos; h) bactérias.

² Imagens retiradas de: a) c) d) <http://www.vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5400/VPAT5400CP/Urine/index.htm>; b) g) h) <https://meded.ucsd.edu/isp/1994/im-quiz/urine.htm>; e) f) Graff et al.

4.6. Avaliação dos Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas produzidas ou induzidas pela presença de células neoplásicas e a sua atividade. A pesquisa destas moléculas para a deteção de patologias neoplásicas tem aumentado, de forma alternativa à utilização de técnicas de diagnóstico invasivo, correspondendo a exames de fácil execução e de menor custo. Contudo, apresentam limitações ao nível da especificidade e sensibilidade, pelo que, a interpretação dos resultados não dispensa a realização de outros exames auxiliares de diagnóstico. Pelo contrário, a avaliação dos marcadores tumorais tem demonstrado importância no auxílio do diagnóstico, prognóstico, no estágio e na monitorização do tumor. Assim, após a deteção de positividade para um doente, o clínico poderá acompanhar a progressão ou remissão através do doseamento destas moléculas.^[41]

No CHL são determinados os marcadores tumorais alfa-fetoproteína (AFP), o antígeno carcinoembrionário (CEA), o antígeno carbohidrato 125 (CA 125), o antígeno carbohidrato 15-3 (CA 15-3), o antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) e o antígeno específico da próstata (PSA) no equipamento **DXi 800™ (BECKMAN COULTER)**, através de ensaios imunoenzimáticos de local duplo. São ainda determinados os marcadores tumorais antígeno carbohidrato 72-4 (CA 72-4) e a neuroenolase específica (NSE) no equipamento **COBAS® e411 (Roche Diagnostics)**, através de electroquimioluminescência como referenciado na secção 4.1.3. (Tabela XII). Os intervalos de referência para estes parâmetros podem ser encontrados no Anexo I.

Tabela XII. Caracterização dos marcadores tumorais.^[41]

Marcador Tumoral	Características	Significado Clínico
AFP	– Antígeno oncofetal – glicoproteína.	Essencialmente Associado – Carcinoma hepatocelular. Outras Situações Patológicas – Tumores do testículo.
CA 15-3	– Antígeno tumoral – glicoproteína; – Baixa sensibilidade; – Valor elevado no aparecimento de metástases.	Essencialmente Associado – Carcinoma da mama. Outras Situações Patológicas – Carcinoma do ovário; – Carcinoma do estômago; – Carcinoma do pâncreas; – Hepatite aguda, crónica e cirrose hepática.

CA 19-9	<ul style="list-style-type: none"> – Antígeno tumoral – glicolípido (antígeno hidrocarbonado). 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma do pâncreas. <p>Outras Situações Patológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma colo-rectal; – Carcinoma do estômago; – Carcinoma hepatocelular.
CA 72-4	<ul style="list-style-type: none"> – Antígeno tumoral – glicoproteína; – Maior sensibilidade em associação com os marcadores tumorais CEA, CA 19-9 e/ou CA 125. 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma do estômago. <p>Outras Situações Patológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Adenocarcinomas.
CA 125	<ul style="list-style-type: none"> – Antígeno tumoral – glicoproteína; – Aumento da sensibilidade com a evolução do estágio de malignidade. 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma do ovário. <p>Outras Situações Patológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma do estômago; – Carcinoma do pâncreas; – Carcinoma do pulmão; – Carcinoma do útero (endométrio).
CEA	<ul style="list-style-type: none"> – Antígeno oncofetal – glicoproteína; – Valor elevado no aparecimento de metástases. 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma colo-rectal. <p>Outras Situações Patológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma do estômago; – Carcinoma da mama; – Carcinoma do pâncreas.
NSE	<ul style="list-style-type: none"> – Enzima – enolase. 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma das pequenas células no pulmão; – Neuroblastomas. <p>Outras Situações Patológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Feocromocitomas; – Insulinomas.
PSA	<ul style="list-style-type: none"> – Enzima – glicoproteína (serina-protease); – Elevada sensibilidade e especificidade. 	<p>Essencialmente Associado</p> <ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma da próstata.

4.7. Avaliação do Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos são moléculas fundamentais para o correto funcionamento do organismo humano devido às funções vitais que desempenham, atuando como hormonas, como fonte de energia, ajudando na digestão e integrando estruturalmente as membranas celulares. Apesar

da sua importância biológica, o metabolismo dos lípidos engloba diversos processos complexos, que quando desequilibrados, poderão originar situações patológicas como as dislipidémias com consequências graves, como ocorre no processo aterosclerótico inteiramente relacionado com as doenças cardiovasculares mencionadas na secção 4.2.^[3]

As alterações no metabolismo dos lípidos são avaliadas no CHL através da quantificação dos parâmetros i) colesterol total; ii) colesterol-HDL; iii) colesterol-LDL; iv) triglicéridos no equipamento AU 2700TM (BECKMAN COULTER) através de ensaios de cor enzimáticos. Os intervalos de referência para estes parâmetros podem ser encontrados no Anexo I.

4.7.1. Colesterol Total, Colesterol HDL e Colesterol LDL

O colesterol é sintetizado no fígado e no intestino. Biologicamente é essencial como componente da estrutura das membranas celulares, como precursor das hormonas esteroides e como precursor dos ácidos biliares. Após a sua síntese, é transportado no plasma na forma de macromoléculas denominadas de lipoproteínas. Estas lipoproteínas divergem entre si na sua densidade devido à sua constituição em fosfolípidos, triglicéridos e colesterol esterificado. Assim estão categorizadas em quilomicrons, *very-low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate-density lipoprotein* (IDL), *low-density lipoprotein* (LDL) e *high-density lipoprotein* (HDL).^[3]

Contrariamente às LDL que contribuem essencialmente como fonte de colesterol para as células, as HDL desempenham funções que permitem evitar a sua acumulação, através da intervenção no transporte reverso do colesterol para o fígado. Para além disso, as HDL apresentam atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante e propriedades anticoagulantes que evitam o desenvolvimento da aterosclerose.^[3]

O colesterol total e o colesterol-HDL são quantificados diretamente pelo equipamento, enquanto o colesterol-LDL, é calculado indiretamente a partir da fórmula de Friedwald que tem em conta as concentrações previamente determinadas do colesterol total, colesterol-HDL e dos triglicéridos (Equação 3).

$$(3) \quad [\text{Colesterol} - \text{LDL}] = [\text{Colesterol Total}] - \left([\text{Colesterol} - \text{HDL}] + \frac{[\text{Triglicéridos}]}{5} \right)$$

[Colesterol-LDL] – concentração do colesterol-LDL (mg/dL)

[Colesterol Total] – concentração do colesterol total (mg/dL)

[Colesterol-HDL] – concentração do colesterol-HDL (mg/dL)

[Triglicéridos] – concentração em triglicéridos (mg/dL)

Contudo quando obtemos valores de triglicéridos acima dos 400 mg/dL, o equilíbrio bioquímico dos triglicérides com o colesterol-VLDL (1/5 na fórmula de Friedwald) deixa de existir e, o valor obtido pela fórmula de Friedwald deixa de refletir o valor real do colesterol-LDL, atribuindo erroneamente valores menores a este parâmetro, pelo que, é necessário dosear diretamente o colesterol-LDL. Nessas condições, o sistema informático do laboratório está programado para cancelar o cálculo do colesterol-LDL e para criar automaticamente a prova de doseamento para este parâmetro na amostra. Assim, o autoanalisador **AU 2700™ (BECKMAN COULTER)**, fica apto a realizar este doseamento diretamente na amostra, pelo método do sistema CHO/PAP, após a digestão do colesterol não-LDL.

4.7.2. Triglicéridos

Os triglicéridos estão englobados na classe dos ésteres de glicerol. Apresentam na sua estrutura três moléculas de ácidos gordos e constituem a maior reserva energética do organismo humano. Devido à sua ingestão diária na dieta os triglicéridos são metabolicamente processados pelo organismo, inicialmente no intestino, mediados pelos quilomicrons e posteriormente, no tecido adiposo na forma de ácidos gordos livres, como reserva energética. Os quilomicron residuais que não foram metabolizados são captados pelo fígado levando à formação posterior das lipoproteínas IDL, VLDL e LDL. Por isso, o doseamento dos triglicéridos e a sua avaliação conjunta com o parâmetros documentados na secção 4.7.1. é essencial devido à sua interligação permanente.^[3]

4.8. Avaliação dos Eletrólitos

Os eletrólitos encontram-se amplamente distribuídos no organismo humano, encontrando-se envolvidos em diversos processos biológicos essenciais, como a regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico, a manutenção do pH fisiológico, como cofatores de enzimas e intervenção em reações de oxidação-redução.^[3]

Assim, torna-se relevante o estudo dos principais iões envolvidos neste processo i) sódio; ii) potássio; iii) cloro. Contudo será ainda abordado o estudo dos iões cálcio, magnésio e fosfato e, a sua importância biológica. Os iões são quantificados no equipamento **AU 2700™ (BECKMAN COULTER)**, em que os principais iões são quantificados através de ensaios potenciométricos de membrana seletiva de cada ião, enquanto o fósforo inorgânico é doseado através de um ensaio UV fotométrico e os iões cálcio e magnésio por ensaios de cor fotométricos. Os intervalos de referência encontram-se em anexo (Anexo I).

4.8.1. Sódio

O sódio é o catião presente em maior quantidade no compartimento extracelular, por isso, contribui largamente para as alterações na atividade osmótica do compartimento extracelular, através da regulação da manutenção da distribuição da água entre compartimentos e na regulação da pressão osmótica.

Diariamente, o sódio é consumido na dieta, o qual é absorvido pelo sistema gastrointestinal e reabsorvido após filtração glomerular ou eliminado na urina pelo sistema renal, através da manutenção da entrada e saída passiva de água. Alterações nestes processos originam a desregulação do equilíbrio hidro-eletrolítico, alterações na osmolaridade e nos níveis séricos de sódio. Assim, poderão ser observadas situações de hipernatrémia ou hiponatrémia.^[3,42]

4.8.2. Potássio

O potássio é um catião fundamental, encontrando-se em maior quantidade no compartimento intracelular. Desempenha funções essenciais ao nível da contractilidade cardíaca e muscular, assim como, na condução nervosa. Para além disso, é um ião essencial na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo devido à sua troca com o ião hidrogénio, evitando o excesso de iões hidrogénio no compartimento extracelular.

Assim como o sódio, o potássio também é adquirido através da dieta sendo absorvido pelo sistema gastrointestinal e distribuído pelas células. A maior parte do potássio é excretada pelos rins por troca com o sódio, de forma a manter o equilíbrio hidro-eletrolítico, por ação da aldosterona.

O estudo dos níveis de potássio é bastante importante na clínica, uma vez que, alterações nas suas concentrações conduzem a consequências graves para os tecidos excitatórios controlados pelo potencial de membrana, podendo inclusive ser letal. Desta forma, situações de hipercaliémia e hipocaliémia deverão ser controladas, evitando situações de acidose e alcalose respetivamente.^[3,43]

4.8.3. Cloro

O cloreto é o anião presente em maior quantidade no compartimento extracelular. Assim como o sódio, está envolvido na manutenção da distribuição da água, na pressão osmótica e no balanço da carga iónica no compartimento extracelular.

O cloreto é adquirido através da dieta e reabsorvido tal como os outros íões no trato gastrointestinal. Biologicamente, o cloreto acompanha o percurso do sódio sendo tal como este filtrado e reabsorvido nos túbulos proximais, de forma a manter a eletroneutralidade.

O doseamento de cloreto é importante para a avaliação dos desequilíbrios ácido-base, dado que, nestas situações poderão ser observadas situações de hiperclorémia ou hipoclorémia.^[3]

4.8.4. Osmolalidade

A osmolalidade é um parâmetro que permite avaliar as concentrações dos principais solutos que contribuem para osmolalidade plasmática, influenciando o movimento da água entre os compartimentos. No CHL a osmolalidade é calculada após a determinação das concentrações do sódio, glucose e ureia (Equação 4).^[36]

$$(4) \text{ Osmolalidade} = 2 \times [\text{Sódio}] + \frac{[\text{Glucose}]}{18} + \frac{[\text{Ureia}]}{6}$$

Osmolalidade – osmolalidade plasmática (mOsm/Kg)

[Sódio] – concentração de sódio (mEq/L)

[Glucose] – concentração de glucose (mg/dL)

[Ureia] – concentração de ureia (mg/dL)

4.8.4.1. Glucose

A glucose é um soluto presente no organismo em concentração considerável, contribuindo para a osmolalidade plasmática. Funcionalmente, assegura o fornecimento de energia ao organismo humano. É um metabolito que está envolvido no metabolismo dos hidratos de carbono levando à formação de energia para o organismo, à conversão de diversos componentes (cetoácidos, proteínas e aminoácidos) e ao seu armazenamento no fígado e no tecido adiposo na forma de glicogénio e triglicéridos, respetivamente.

No CHL, a glucose é doseada no equipamento **AU 2700™ (BECKMAN COULTER)** através de um ensaio UV enzimático, sendo essencial na monitorização de patologias como a diabetes *mellitus* devido à ausência ou défice de síntese no caso da diabetes tipo I ou por resistência à insulina devido à disfuncionalidade dos recetores (diabetes tipo II). Nestas situações patológicas obtém-se valores elevados de glucose, ou seja, hiperglicemia. Contudo, para uma correta monitorização destas situações patológicas deverão ainda ser realizados

testes laboratoriais como a determinação da hemoglobina glicada (Hb A₁C) que reflete os níveis de glucose durante um longo período de tempo.^[3]

4.8.5. Estudo dos íões Cálcio, Magnésio e Fosfato

Os íões desempenham funções vitais para o adequado funcionamento do organismo humano, como tem sido referenciado. No entanto para além do sódio, do potássio e do cloreto existem outros íões fundamentais, como o cálcio, o magnésio e fosfato.

O cálcio é um componente essencial na estrutura do osso, encontrando-se em maior concentração nesta zona. No entanto, este circula no plasma na sua forma livre, ligado à albumina e na forma de complexos, sendo que a sua concentração é regulada através da ação da calcitonina, da hormona paratiroide e da vitamina D.^[1,43] Relativamente ao magnésio, encontra-se em maior concentração no compartimento intracelular e encontra-se distribuído pelo osso, músculo e tecidos moles.^[43] No caso do fosfato, localiza-se essencialmente no osso.^[3] A Tabela XIII caracteriza as suas principais funções e a sua importância clínica.

Tabela XIII. Caracterização dos íões cálcio, magnésio e fosfato.^[1,3,43]

Ião	Funções Biológicas	Importância Clínica
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> – Contração Muscular; – Transmissão sináptica; – Secreção de hormonas e de outras substâncias reguladoras; – Coagulação sanguínea. 	<p>Hipercalcémias</p> <ul style="list-style-type: none"> – Aumento da reabsorção óssea; – Aumento da absorção gastrointestinal; – Diminuição da excreção renal. <p>Hipocalcémias</p> <ul style="list-style-type: none"> – Défice ou incapacidade da hormona paratiroide ou da vitamina D.
Magnésio	<ul style="list-style-type: none"> – Ativação de sistemas enzimáticos; – Produção de ATP; – Síntese de ácidos nucleicos e proteínas; – Regulação do fluxo de cálcio. 	<p>Hipermagneseemia</p> <ul style="list-style-type: none"> – Ingestão excessiva de antiácidos com magnésio. <p>Hipomagneseemia</p> <ul style="list-style-type: none"> – Perdas renais e gastrointestinais;
Fosfato	<ul style="list-style-type: none"> – Constituinte de ácidos nucleicos, fosfolípidos e do ATP. 	<p>Hiperfosfatemia</p> <ul style="list-style-type: none"> – Incapacidade do rim na excreção de fosfato; – Diminuição da síntese ou atividade da hormona paratiroide. <p>Hipofosfatemia</p> <ul style="list-style-type: none"> – Perdas renais e diminuição da absorção gastrointestinal.

4.9. Doseamento de Fármacos

O doseamento de fármacos corresponde a um processo essencial na monitorização da terapêutica por parte do clínico, permitindo determinar ou equilibrar a dose benéfica para o doente no tratamento de determinada patologia, evitando atingir o limiar da toxicidade. Para isso, é necessário conhecer a farmacocinética e a farmacodinâmica de cada fármaco em particular, uma vez que, a sua metabolização no organismo humano e a sua correlação com outros fármacos é bastante específica.^[44]

No CHL os fármacos são doseados no equipamento AU 2700TM (BECKMAN COULTER), através de princípios de ensaio diferentes. Na Tabela XIV encontram-se listados os fármacos doseados e a sua respetiva caracterização.

Tabela XIV. Caracterização dos fármacos doseados no CHL.^[3]

Fármaco	Princípio de Ensaio	Utilidade Clínica	Valores de Referência
Carbamazepina	Imunoenzimático Homogéneo	Anticonvulsivante	34 – 51 µmol/L (8 – 12 µg/mL)
Digoxina	Imuno-turbidimétrico	Insuficiência cardíaca congestiva	1,0 – 2,6 nmol/L (0,8 – 2,0 ng/mL)
Fenitoína	Imunoenzimático Homogéneo	Anticonvulsivante	39,6 – 99 µmol/L (10 – 25 µg/mL)
Fenobarbital	Imunoenzimático Homogéneo	Anticonvulsivante	65 – 172 µmol/L (15 – 40 µg/mL)
Teofilina	Imunoenzimático Homogéneo	Asma, doença pulmonar obstrutiva e apneia do recém-nascido	28 – 111 µmol/L (5 – 20 µg/mL)
Valproato de Sódio	Imunoenzimático Homogéneo	Anticonvulsivante	50-100 µg/mL (347 – 693 µmol/L)

4.10. *Screening* das Drogas de Abuso

O consumo de drogas de abuso é uma realidade, sendo que, a sua deteção é uma necessidade no laboratório clínico de forma a auxiliar o médico no diagnóstico em caso de sobredosagem, que poderá originar consequências graves para o paciente, inclusive a morte.

No CHL é realizado um *screening* das drogas de abuso, sempre que requerido pelo clínico, através do kit *INSTANT-VIEW*[®]. Este kit utiliza como metodologia um imunoensaio

cromatográfico como o referenciado na secção 3.5.2.4. recorrendo a amostras de urina, uma vez que, as drogas de abuso são excretadas juntamente com este produto biológico.^[45] A deteção deste tipo de substâncias tem carácter qualitativo sendo o resultado positivo ou negativo. A sua interpretação como positivo, apenas pode ser considerada na presença do indicador de reação positiva na zona afeta ao controlo positivo.

As drogas de abuso pesquisadas no CHL incluem os opiáceos, as benzodiazepinas, os canabinóides, a cocaína, anfetaminas e barbitúricos.

V. Microbiologia

A Microbiologia é uma área das Análises Clínicas que permite estudar os microrganismos e a sua patogênese para o organismo humano. No CHL são efetuados estudos em diversas áreas da Microbiologia: i) Bacteriologia; ii) Micobacteriologia; iii) Parasitologia; iv) Micologia; v) Virologia.

Na rotina laboratorial todos os produtos biológicos que chegam ao laboratório devem estar devidamente identificados o que inclui informações do doente, da colheita, do tipo de produto biológico e da análise pretendida. O laboratório de Microbiologia recebe essencialmente como amostras biológicas: i) LCR; ii) sangue; iii) aspirados broncoalveolares; iv) expectoração; v) fezes; vi) exsudados purulentos; vii) urina; viii) cateteres. Usualmente, a maioria dos produtos têm indicação para exame bacteriológico, o que abrange o exame direto da amostra com coloração de Gram no equipamento **PREVI COLOR GRAM (BIOMÉRIEUX)** e a cultura em gelose chocolate com bacitracina e gelose sangue, à exceção da urina que é cultivada no **Uricult[®]** (MacConkey, CLED e meio para *Enterococcus sp.*). Dependendo do tipo de amostra, no exame direto ao microscópio ótico **Alphaphot YS (NIKON)**, avaliam-se as células epiteliais, os leucócitos polimórficos, o predomínio morfológico bacteriano e fungos. O exame direto ajuda na interpretação das culturas, as quais são observadas às 24h e/ou às 48h/72h, dependendo do tipo de amostra biológica, após incubação a 37°C, analisando-se o aspeto morfológico das colónias o que direciona o diagnóstico laboratorial para a identificação do microrganismo e a realização de antibiograma no equipamento **VITEK[®] 2 (BIOMÉRIEUX)**. São ainda realizados exames micobacteriológicos que incluem a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen e um processo de homogeneização, descontaminação e concentração das amostras para incubação no equipamento **BacT/ALERT[®] 3D (BIOMÉRIEUX)**. Para além disso, são efetuados exames parasitológicos para a pesquisa de parasitas, o que inclui um exame após concentração, cultura de fungos filamentosos em meio Sabouraud (com clorafenicol e gentamicina) e em meio líquido KOH 10% para a sua observação ao microscópio ótico entre lâmina e lamela. São ainda pesquisados os antígenos virais para o Adenovírus, Vírus Influenza (A e B), Vírus Parainfluenza (1, 2 e 3), Vírus Sincicial Humano e o Metapneumovírus. O laboratório recebe ainda garrafas de hemoculturas pediátricas e de hemoculturas aeróbias e anaeróbias maioritariamente em duplicado, de localizações anatómicas diferentes que são incubadas durante cinco dias nas condições ideais, exceto quando o médico suspeita de microrganismos fastidiosos que necessitam de mais

tempo de crescimento no equipamento **BacT/ALERT[®] 3D (BIOMÉRIEUX)**. Apesar do trabalho diário na Microbiologia incidir essencialmente no que foi referenciado anteriormente, existem outros exames mais específicos que são efetuados como a pesquisa de sangue oculto nas fezes, a pesquisa da toxina e do antígeno do *Clostridium difficile*, pesquisa dos antígenos urinários para *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumoniae* e ainda, pesquisa de antígenos de *Chlamydia trachomatis* em exsudados oculares, uretrais, urina e aspirados brônquicos.

VI. Hematologia

A Hematologia é uma área que estuda os constituintes sanguíneos. Diariamente, chegam ao laboratório amostras de sangue para a realização do hemograma no equipamento **UniCel® DXH 800 COULTER® (BECKMAN COULTER)**, para doseamento da velocidade de sedimentação (VS) no aparelho **Ves Matic 30 Plus (A.MENARINI diagnostics)** e para avaliação da hemostase e coagulação no equipamento **ACLTOP 500 CTS (IZASA)**. O hemograma inclui a contagem dos constituintes do sangue como os glóbulos vermelhos, a contagem das populações leucocitárias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), a contagem de plaquetas e ocasionalmente a contagem de reticulócitos. Para além disso, são ainda avaliados os parâmetros eritrocitários como o volume globular médio (VGM), a concentração média da hemoglobina globular (CMHG), o hematócrito, a hemoglobina, a hemoglobina globular média (HGM) e a distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW). Na presença de alterações no hemograma, a avaliação de um esfregaço de sangue periférico corado pela técnica de May-Grünwald-Giemsa no equipamento **Aerospray Hematology Pro™ 7151 (WESCOR® BIOMEDICAL SYSTEMS)** deve ser ponderada de forma a observar possíveis alterações em cada uma das populações, seja em número ou ao nível morfológico. Relativamente à hemostase e à coagulação avaliam-se parâmetros de urgência como o tempo de protrombina (TP) que inclui o cálculo do *International Normalised Ratio* (INR), o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e o doseamento do fibrinogénio derivado. São ainda realizadas provas de coagulação especial como o doseamento dos d-dímeros que está incluído nos parâmetros de urgência, da proteína S, da antitrombina, da proteína C e da resistência à proteína C ativada (APCR).

No laboratório de Hematologia são ainda executadas outras provas, nomeadamente o doseamento da hemoglobina glicada e a electroforese das subunidades da hemoglobina no equipamento **CAPILLARYS 2 FLEX Piercing (Sebia®)**, imunofenotipagem dos principais marcadores celulares (CD19, CD8, CD4, CD56, CD5, CD3, CD45 e CD34, cadeias κ e λ) por citometria de fluxo no aparelho **BD FACSCalibur™ (BD Biosciences)** e testes imunocromatográficos para deteção de *Plasmodium* spp assim como a respetiva observação do esfregaço de sangue periférico.

VII. Controlo de Qualidade no Serviço de Patologia Clínica

Os programas de controlo de qualidade interna e externa, são essenciais num laboratório de Análises Clínicas para assegurar a viabilidade dos resultados obtidos pelo laboratório, assim como para o doente que, tem a total confiabilidade e garantia do serviço que lhe é prestado.

7.1. Controlo de Qualidade Interna

Diariamente no CHL, são realizados os controlos de qualidade interno, segundo uma calendarização definida internamente e preferencialmente antes do processamento das amostras em qualquer equipamento do Serviço de Patologia Clínica. Para esse fim, são utilizadas amostras controlo com características conhecidas e que, possuam idealmente um comportamento e matriz biológica, semelhantes às amostras dos pacientes. Os valores da concentração alvo pretendidos são seleccionados de forma a que se encontrem dentro dos valores de decisão clínica (cut-offs de decisão clínica), bem como em zonas de interesse clínico-terapêutico sejam valores de carácter elevado ou baixo e da magnitude biológica em causa.

No processo de validação de um método novo de doseamento imunológico, bioquímico ou endocrinológico do SPC, é realizada uma avaliação dos indicadores operacionais de qualidade (valor-alvo ou média (M), e desvio padrão (s)) para cada nível de controlo, durante um período de tempo médio de 3 a 6 meses, que permite incluir os erros sistemáticos e aleatórios inerentes à rotina diária de trabalho. Assim, define-se a incerteza média de medição, segundo a ISO 15189:2012, que representa a capacidade técnica real do método de doseamento no SPC.

Após a avaliação da capacidade técnica do método de doseamento são definidos os requisitos operacionais de qualidade (M, S), que estipulam a incerteza máxima de medição permitida no SPC. A definição dos requisitos operacionais de qualidade é feita tendo em conta a seguinte ordem de prioridade: i) Requisitos de qualidade clínicos obtidos das Normas de Orientação Clínica da Direção Geral de Saúde, Guias de prática Clínica Internacionais ou Nacionais, ou ainda Protocolos Clínicos adotados pelo corpo clínico requisitante; ii) Requisitos de qualidade por Variabilidade Biológica (definidos internacionalmente nas maiores e mais antigas bases de dados de Variabilidade Biológica do mundo, da Sociedade Espanhola de Bioquímica Clínica e Patologia Molecular SEQC, também traduzidas sob a autorização da SEQC para inglês no site da Fundação Westgard - EUA); e por fim iii)

Requisitos operacionais de qualidade por Gráficos de Estado da Arte, que definem a qualidade conforme o estado da arte técnica internacional atual e que normalmente permitem uma incerteza máxima de medição maior por forma a adaptarem-se à qualidade técnica real de trabalho, no caso de um método de doseamento de menor qualidade clínica ou biológica.

As amostras de controlo podem ser multiparamétricas ou apenas para o doseamento de um único parâmetro ou magnitude biológica. Para além disso, é fundamental garantir que os equipamentos têm todo o material necessário (soluções consumíveis, reagentes e consumíveis sólidos) para a realização do trabalho diário.

A interpretação dos resultados obtidos para as amostras controlo, corresponde a uma etapa fundamental do controlo de qualidade interna, uma vez que, indica a possibilidade de arranque ou não, do trabalho diário em determinado equipamento, para além de orientar na resolução do problema em causa. Assim, os gráficos de controlo de qualidade internos são definidos com a regra de Westgard $1/2s$ que permite detetar qualquer erro que ultrapasse a incerteza máxima de medição definida, no momento em que se avalia o resultado do controlo e não posteriormente. Para além disso, o SPC usa a regra de $1/2s$ porque o sistema informático de registo e monitorização das cartas de controlo interno do **Modulab Gold (IZASA)** apenas permite elaborar cartas de Levey-Jennings até 3 desvios padrões ($3s$). Logo, a observação do tipo de erros com a regra de $1/2s$ nas cartas do **Modulab Gold**, permite determinar imediatamente se a amplitude do erro é baixa, média ou elevada, e desta forma orienta rapidamente para a resolução técnica do problema. No entanto, se fosse possível montar uma carta de controlo com a regra de exclusão $1/3s$, esta seria montada com a mesma incerteza máxima de medição igual à da regra de $1/2s$ uma vez que percentagem do coeficiente de variação é sempre a mesma, e apenas mudam os desvios padrão com os quais são montadas as cartas de controlo interno.

As causas de erros do controlo interno, poderão ser diversas, como a necessidade de calibração dos parâmetros afetados devido à instabilidade dos reagentes (erro na reconstituição dos reagentes, erro na matriz de um lote particular de reagente do fabricante, reagentes que estejam no fim com desproporção na concentração inicial dos seus constituintes, ou que estão há muito tempo em utilização) e, ainda, situações raras como problemas com as próprias amostras controlo, amostras de calibradores, soluções de revelação do sinal ou ainda com algum dos vários sistemas internos do próprio autoanalisador (sistemas de incubação, de lavagem, de leitura, de dispensação, de armazenamento interno dos reagentes ou amostras).

No entanto, a qualidade dos resultados obtidos não fica limitada apenas ao controlo de qualidade na fase analítica, sendo por isso importante, a avaliação da qualidade nas fases pré-

analítica e pós-analítica. De forma a garantir a qualidade na fase pré-analítica, é necessário verificar que, todos os procedimentos, como a requisição das análises pretendidas, a colheita e pré-preparação do paciente (jejum, restrições alimentares ou medicamentosa), o transporte e conservação das amostras, o registo de entrada no laboratório, a identificação e a qualidade das amostras, é efetuado corretamente. Na fase pós-analítica, é necessário confirmar a viabilidade dos resultados obtidos através da avaliação de um conjunto de parâmetros: i) quadro clínico do doente; ii) concordância entre os parâmetros doseados entre todas as áreas laboratoriais do SPC; iii) confirmação do histórico do doente.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) dispõe ainda de ferramentas de apoio à validação dos resultados, como a avaliação da dispersão das magnitudes biológicas doseadas nos doentes ao longo do tempo (muito útil para os equipamentos de alto débito e com muitos pacientes) e a deteção das alterações fisiopatológicas relevantes personalizada para cada doente (delta checks definidos com a contribuição da variabilidade biológica intraindividual mais a incerteza máxima de medição permitida pelos programas de controlo interno de cada magnitude biológica doseada no SPC), para cada parâmetro doseado.

7.2. Avaliação Externa da Qualidade

O Serviço de Patologia Clínica do CHL, participa em diversos programas de Avaliação Externa da Qualidade nos seus quatro Laboratórios: Imunologia, Bioquímica, Hematologia e Microbiologia, para diversas análises laboratoriais. A adesão a estes programas promove a melhoria contínua do trabalho diário e, credibiliza o SPC, no serviço que presta ao doente.

Na Avaliação Externa da Qualidade, entidades independentes enviam amostras biológicas com o intuito de avaliar todo o processamento das amostras e a sua interpretação laboratorial. As amostras que chegam ao laboratório, são processadas em conjunto com as amostras biológicas dos doentes para que, o seu processamento represente o melhor possível as condições reais de trabalho na rotina diária do SPC. A resposta a estes programas é definida segundo um calendário estipulado pelas entidades independentes que os gerem, dependendo das provas a que o SPC responde.

Dependendo do programa de avaliação externa da qualidade e dos parâmetros de análise avaliados, após o envio dos resultados obtidos para as amostras analisadas, o desempenho do SPC é avaliado por uma das seguintes opções: i) por comparação entre laboratórios com a mesma metodologia; ii) por comparação com o valor definido esperado (obtido por método de referência); iii) por comparação com resultado esperado no caso dos parâmetros qualitativos ou semi-quantitativos (métodos de serologias, microbiologia ou provas de microscopia).

VIII. Conclusões

O estágio curricular decorrido no Centro Hospitalar de Leiria, foi determinante na aquisição de competências práticas e na assimilação de conteúdos teóricos, adquiridos durante o período em que decorreu o Mestrado em Análises Clínicas.

O trabalho diário desenvolvido durante o período de estágio, revelou-se bastante positivo, sendo fundamental para a iniciação profissional num laboratório de Análises Clínicas. Por outro lado, permitiu-me obter experiência que considero importante para o futuro profissional que se aproxima.

Pessoalmente, usufruí da oportunidade facultada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria, que me enriqueceu enquanto profissional desta área, estimulando a minha capacidade crítica perante o diagnóstico laboratorial e alertando-me para a necessidade de proporcionar um serviço de excelência ao doente. Serviço de excelência que, é assegurado através dos controlos diários de qualidade interna e pela participação em programas de controlo da qualidade externa.

Durante os seis meses de estágio, a partilha constante de conhecimentos e o convívio diário com todos os profissionais de saúde do Serviço de Patologia Clínica, tornaram-se, pessoalmente, bastante recompensadores.

IX. Bibliografia

- [1] Fitzgerald P.A., Goldfien A., *Endocrinologia Básica e Clínica*, MacGraw-Hill, 7ª Edição (2006).
- [2] Willemsen J.J., Ross H.A., Lenders J.W.M., Sweep F.C.G.J., Stability of Urinary Fractionated Metanephrines and Catecholamines during Collection, Shipment, and Storage of Samples, *Clinical Chemistry* 53 (2007) 268-272.
- [3] Ullman M.D., Burtis C.A., *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008).
- [4] Keren D.F., *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*, Hodder Arnold, London, 1st Ed. (2003).
- [5] Carrer D.L., *Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation: Illustrated Interpretations*, Laboratoires Sebia (2005).
- [6] Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T., Drew R. Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine, *Clinical Chemistry* 47 (2001) 673-680.
- [7] Bossuyt X., Bogaerts A., Schiettekatte G., Blanckaert N., Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system, *Clinical Chemistry* 44 (1998) 944-949.
- [8] Kyle R.A., The Monoclonal Gammopathies, *Clinical Chemistry* 40 (1994) 2154-2161.
- [9] International Myeloma Working Group, Myeloma Management Guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of International Myeloma Foundation, *The Hematology Journal* 4 (2003) 379-398.
- [10] Mahto M., Balakrishnan P., Koner B.C., Lali P., Mishra T.K., Saxena A., Rare case of biclonal gammopathy, *International Journal of Case Reports and Images* 2 (2011) 11-14.
- [11] Laurenzi M.A., Link H., Characterisation of the mobility on isoelectric focusing of individual proteins in CSF and serum by immunofixation, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 42 (1979) 368-372.
- [12] Sá M.J., Sequeira L., Rio M.E., Thompson E.J., Oligoclonal IgG Bands In The Cerebrospinal Fluid of Portuguese Patients With Multiple Sclerosis, *Arq Neuropsiquiatr* 63 (2005) 375-379.
- [13] Tullman M.J., Overview of the Epidemiology, Diagnosis, and Disease Progression Associated With Multiple Sclerosis, *Am J Manag Care* 19 (2013) 15-20.

- [14] Zeman A., MacLean B., Keir G., Luxton R., Sharief M., Thompson E., The significance of serum oligoclonal bands in neurological diseases, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 56 (1993) 32-35.
- [15] Reiber H., Peter J.B., Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, *Journal of the Neurological Sciences* 184 (2001), 101-122.
- [16] Wild D. *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, 3rd Ed. (2005), pp 408-409.
- [17] Ratnayake R.P., *Neonatal TORCH Infections*, Rimawi B.H., (Eds) Infectious Comorbidities Encountered in Obstetrics and Neonatology (2013), pp 2-8.
- [18] Tekkesin N., Diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: a review, *HOAJ Biology* (2012) 1-8.
- [19] Clerici P., Paschale M., D., Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions, *World Journal of W J V Virology* 12 (2012) 31-43.
- [20] Ferreira W.F.C., Sousa J.C.F., *Microbiologia*, LIDEL, Vol 2 (2000).
- [21] Slabá K., ŠKULTÉTY L., Toman R., Efficiency Of Various Serological Techniques For Diagnosing *Coxiella Burnetti* Infection, *Acta Virologica* 49 (2005), 123-127.
- [22] Scola B., L., Raoult D., Laboratory Diagnosis of Rickettsioses: Current Approaches to Diagnosis of Old and New Rickettsial Diseases, *Journal Of Clinical Microbiology* 35 (1997), 2715-2727.
- [23] Marangoni A., Sambri V., Storni E., D' Antuono A., Negosanti M., Cevenini R., *Treponema pallidum* Surface Immunofluorescence Assay for Serologic Diagnosis of Syphilis, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (2000), 417-421.
- [24] Farhat S.E., Finn S., Chua R., Smith B., Simor A.E., George P., Diena B.B., Diena D., SKULNICK M., Rapid Detection of Infectious Mononucleosis-Associated Heterophile Antibodies by a Novel Immunochromatographic Assay and a Latex Agglutination Test, *Journal Of Clinical Microbiology* 31 (1993) 1597-1600.
- [25] Voigt J., Krause C., Rohwäder E., Saschenbrecker S., Hahn M., Danckwardt M., Feirer C., Ens K., Fechner K., Barth E., Martinetz T., Stöcker W., Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells, *Clinical and Developmental Immunology* (2012), 1-7.
- [26] O'Sullivan M., McLean-Tooke A., Loh R., Antinuclear antibody test, *Australian Family Physician* 42 (2013) 718-721.
- [27] Rigon A., Soda P., Zennaro D., Ianello G., Afeltra A., Indirect Immunofluorescence in Autoimmune Diseases: Assessment of Digital Images for Diagnostic Purpose, *Clinical Cytometry Society* 72B (2007) 472-477.

- [28] Damoiseaux J., Mallet K., Vaessen M., Austen J., Tervaert J.W.C., Automatic Reading of ANCA-Slides: Evaluation of the AKLIDES System, *Clinical and Developmental Immunology* (2012) 1-7.
- [29] Sousa M.J.R., *Os ANA no Diagnóstico Laboratorial das Doenças Autoimunes*, Germano Sousa, Centro de Medicina Laboratorial, 1ª Edição (2009), pp. 40-44.
- [30] Vidal C., Gude F., Boquete O., Fernández-Merino M.C., Meijide L.M., Rey J., Lojo S., González-Quintela A., Evaluation of the Phadiatop™ test in the diagnosis of allergic sensitization in a general adult population, *J Invest Allergol Clin Immunol* 15 (2005) 124-130.
- [31] Ramalho H., Labandeiro L., Cerqueira R., Preto E.M., Braga C., Moura J., Alergia na idade pediátrica: Avaliação dos métodos de rastreio laboratorial, *Revista Portuguesa Imunoalergologia* 8 (2001) 210-214.
- [32] Peela J.R., Jarari A.M., Hai A., Rawal A.K., Kolla S.D., Sreekumar S., Khurana L., Sidhanathi N.R., Cardiac Biomarkers: The Troponins and CK- MB, *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences* 2 (2010) 190-197.
- [33] Lewandrowski K., Chen A., Januzzi J., Cardiac Markers for Myocardial Infarction: A brief review, *American Journal Of Clinical Pathology* 118 (2002) S93-S99.
- [34] Nursalim A., Suryaatmadja M., Panggabean M., Potential Clinical Application of Novel Cardiac Biomarkers for Acute Myocardial Infarction, *Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine* 45 (2013) 240-250.
- [35] Andersen L.W., Mackenhauer J., Roberts J. C., Berg K. M., Cocchi M. N., Donnino M. W., Etiology and Therapeutic Approach to Elevated Lactate Levels, *Mayo Clinic Proceeding* 88 (2013) 1127-1140.
- [36] Pinto A.M., *Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações*, LIDEL (2009).
- [37] Dufour R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S., Seeff L., Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests, *Clinical Chemistry* 46 (2000) 2027-2049.
- [38] Ramé A., Thérond S., *Anatomia e Fisiologia*, Climepsi Editores (2012).
- [39] Wallace D., Kelner M.J., Microalbuminuria, *Western Journal of Medicine* 162 (1995) 452.
- [40] Graff S.L., *Análisis de Orina Atlas Color*, Editorial Medica Panamericana (1987).
- [41] Malati T., Tumour Markers: An Overview, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22 (2007) 17-31.
- [42] Kovesdy C.P., Significance of Hypo- and Hyponatremia in Chronic Kidney Disease, *Nephrology Dialysis Transplantation* 27 (2012) 891-898.

- [43] Parikh M., Webb S.T., Cations: Potassium, Calcium, and Magnesium, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 12 (2012) 195-198.
- [44] Kang J.S., Lee M.H., Overview of Therapeutic Drug Monitoring, *The Korean Journal of Internal Medicine* 24 (2009) 1-10.
- [45] Gerostamoulos D., Urinary drug screening, *Australian Prescriber* 36 (2013) 62-64.

X. Anexo I – Valores de Referência usados no CHL nos Parâmetros Bioquímicos

Parâmetro Bioquímico	Amostra	Valores de Referência
Albumina	Soro	Adultos: 35 – 52 g/L
AFP	Soro	< 9,0 ng/mL
ALT	Soro	Homem (Adultos): < 50 U/L Mulher (Adultos): <35 U/L
AST	Soro	Homem (Adultos): < 50 U/L Mulher (Adultos): <35 U/L
Bilirrubina Conjugada	Soro	< 3,4 µmol/L
Bilirrubina Total	Soro	5 – 21 µmol/L
BNP	Sangue Total	< 100 pg/mL
CA 125	Soro	< 35 U/mL
CA 15-3	Soro	< 31,3 U/mL
CA 19-9	Soro	< 35 U/mL
CA 72-4	Soro	< 6,9 U/mL
Cálcio	Soro	2,20 – 2,70 mmol/L
CEA	Soro	<3,0 ng/mL
CK	Soro	Homem: ≤ 171 U/L Mulher: ≤ 145 U/L
CK-MB	Soro	Adultos: < 24 U/L
Cloro	Soro	Adultos: 101 – 109 mmol/L
Colesterol	Soro	Desejável: < 5,2 mmol/L (200 mg/dL) Limite elevado: 5,2 – 6,2 mmol/L (200 – 239 mg/dL) Elevado: ≥ 6,2 mmol/L (240 mg/dL)
Colesterol-HDL	Soro	Fator de Risco Positivo: < 1,03 mmol/L (< 40 mg/dL) Fator de Risco Negativo: 1,55 mmol/L (≥ 60 mg/dL)
Colesterol-LDL	Soro	Ótimo: < 2,6 mmol/L (100 mg/dL)
Creatinina	Soro	Homem: 59 – 104 µmol/L (0,67 – 1,17 mg/dL) Mulher: 45 – 84 µmol/L (0,51 – 0,95 mg/dL)
	Urina	Homem: 124 – 230 µmol/kg/d (14 – 26 mg/kg/d) Mulher: 97 – 177 µmol/kg/d (11 – 20 mg/kg/d)
Fosfatase Alcalina	Soro	Adultos: 30 – 120 U/L
Fosfato	Soro	Adultos: 0,81 – 1,45 mmol/L
γ-GT	Soro	Homem (Adultos): < 55 U/L Mulher (Adultos): < 38 U/L

Glucose		Soro	4,1 – 5,9 mmol/L (74 – 106 mg/dL)
Lactato		Soro	0,5 – 2,2 mmol/L (4,5 – 19,8 mg/dL)
LDH		Soro	Homem: < 248 U/L Mulher: < 247 U/L
Magnésio		Soro	Homens: 0,73 – 1,06 mmol/L Mulheres: 0,77 – 1,03 mmol/L
Microalbuminúria		Urina	< 30 mg/24h
NSE		Soro	< 16,3 ng/mL
Osmolalidade		Soro	275 – 295 mOs/Kg
Potássio		Soro	Adulto: 3,5 – 5,1 mmol/L
Proteína C Reativa		Soro	< 5 mg/L
PSA	Livre	Soro	< 0,93 ng/mL
	Total	Soro	< 4 ng/mL
Sódio		Soro	Adulto: 136 – 146 mmol/L
T3	Livre	Soro	3,8-6,0 pmol/L
	Total	Soro	1,34 – 2,73 nmol/L
T4	Livre	Soro	7,9 – 14,4 pmol/L
	Total	Soro	78,38 – 157,40 nmol/L
Triglicéridos		Soro	Normal: < 1,70 mmol/L (150 mg/dL) Limite elevado: 1,70 – 2,25 mmol/L (150 – 199 mg/dL) Elevado: 0,26 – 5,64 mmol/L (200 – 499 mg/dL) Muito Elevado: ≥ 5,65 mmol/L (500 mg/dL)
Troponina I		Soro	< 0,04 ng/mL
TSH		Soro	0,34 – 5,60 µIU/mL
Ureia		Soro	Adulto: 2,8 – 7,2 mmol/L