

Adriana Filipa Fadigas Grazina

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela  
Dra. Ana Filipa Paredes e Dra. Sofia Estácio e pela Professora Doutora Leonor Martins de Almeida  
e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Relatório de Estágio

### Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Filipa Paredes (Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana e Diretora Técnica do Laboratório José Manuel Chau S.A), pela Dra. Sofia Estácio (Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana do Laboratório José Manuel Chau S.A) e pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho 2018.

Adriana Filipa Fadigas Grazina



“A persistência é o caminho do êxito”

Charlie Chaplin



## Agradecimentos

Estando prestes a chegar ao fim uma jornada de dois anos que culmina com a realização deste relatório de estágio muitos são os nomes que me merecem um Muito Obrigada, quer pela ajuda prestada no decurso desta caminhada quer pela motivação que muitas vezes me foi transmitida quando o cansaço já falava mais alto.

Gostaria de agradecer ao Grupo Beatriz Godinho, em especial ao Laboratório José Manuel Chau pela possibilidade da realização deste estágio curricular e a toda a equipa maravilhosa que este laboratório encerra.

Devo um Obrigada muito especial à Dra. Ana Filipa Paredes e à Dra. Sofia Estácio pela preciosa ajuda na realização deste relatório e pela disponibilidade que sempre demonstraram para comigo quando a elas recorri. Também à minha colega e amiga Ana Rita Silva pelas palavras de incentivo e pelos conselhos sábios de quem já percorreu o mesmo caminho que agora termino.

Um agradecimento profundo à Professora Doutora Leonor Martins Almeida sem a qual este trabalho não teria sido possível, pela disponibilidade e pelo constante acompanhamento um Muito Obrigada.

Devo ainda deixar uma palavra especial aos que sempre me acompanharam na vida pessoal e académica e que me deram a oportunidade de chegar onde estou hoje, os meus pais.

Para terminar e porque uma página não seria o suficiente para agradecer, um muito obrigado ao meu namorado, e companheiro de todas as horas, pelos sacrifícios que fez ao longo dos últimos dois anos, pela dedicação e pelo apoio que nunca deixou que me faltasse um Obrigada de coração.



## **ÍNDICE GERAL**

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xi</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xv</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>I</b>
<b>Dinâmica do trabalho diário no Laboratório José Manuel Chau S.A .....</b>	<b>2</b>
<b>Atividades laboratoriais desenvolvidas no estágio curricular.....</b>	<b>4</b>
<b><u>Setor de Bioquímica Clínica e Imunologia .....</u></b>	<b>4</b>
<b>1. Atividades na fase pré-analítica.....</b>	<b>4</b>
1.1. Separação de alíquotas para laboratórios subcontratados.....	5
1.2. Separação de alíquotas para seroteca .....	6
1.3. Calibração da cadeia de autoanalisadores .....	6
<b>2. Atividades na fase analítica.....</b>	<b>7</b>
2.1. Setor da Bioquímica Clínica .....	7
2.1.1. Avaliação da função hepática.....	9
➤ Frações da bilirrubina.....	9
➤ Fosfatase alcalina .....	11
➤ Aspartato aminotransferase .....	11
➤ Alanina aminotransferase .....	12
➤ Gamaglutamiltransferase .....	13
2.1.2. Avaliação da função renal.....	13
➤ Creatinina sérica e <i>clearance</i> da creatinina .....	13
➤ Ureia.....	14
➤ Ácido úrico .....	15
➤ Análise sumária urinária.....	16
2.1.3. Iões .....	18
➤ Sódio.....	18
➤ Potássio.....	19
➤ Cloreto .....	19
➤ Cálcio .....	20
➤ Magnésio.....	20
➤ Fosfato.....	21
➤ Ferro.....	21
2.1.4. Lípidos plasmáticos .....	22
➤ Colesterol .....	22
➤ Triglicérides.....	24



2.1.5. Avaliação laboratorial da diabetes <i>mellitus</i> .....	25
➤ Glicemia e prova de tolerância à glicose .....	26
➤ Hemoglobina A <sub>1C</sub> .....	28
➤ Proteinúria e microalbuminúria .....	29
2.1.6. Proteínas.....	30
➤ Proteína C reativa .....	30
➤ Proteinemia total.....	30
➤ Albumina sérica.....	31
➤ Eletroforese de proteínas .....	32
2.1.7. Enzimas .....	34
➤ Creatina cinase.....	34
➤ Lactato-desidrogenase .....	34
2.2. Setor da Imunologia Clínica .....	35
2.2.1. Parâmetros analíticos no controle de anemias .....	36
➤ Ferritina .....	36
➤ Vitamina B12.....	37
➤ Ácido fólico.....	38
2.2.2. Parâmetros analíticos no estudo do metabolismo ósseo .....	38
➤ Vitamina D .....	38
2.2.3. Marcadores tumorais .....	39
➤ Antígeno específico da próstata .....	39
➤ Antígeno carboidrato 19.9.....	40
➤ Antígeno carcinoembrionário .....	40
2.2.4. Função endócrina do sistema reprodutor .....	41
➤ Hormona foliculoestimulante.....	41
➤ Hormona luteinizante.....	42
➤ 17-β Estradiol .....	43
➤ Progesterona .....	43
➤ Prolatina.....	44
➤ Subunidade β livre da gonadotrofina coriônica humana (β HCG ).....	44
2.2.5. Função tiroideia .....	45
➤ Hormona estimuladora da tiroide .....	45
➤ Triiodotironina total e livre .....	45
➤ Tiroxina e tiroxina livre.....	46
➤ Anticorpos anti-peroxidase específica da tiroide.....	47
➤ Anticorpos anti-tiroglobulina .....	47
2.2.6. Serologia infecciosa.....	47
➤ Vírus da imunodeficiência humana .....	47
➤ Vírus da hepatite C .....	49

➤ Vírus da hepatite B.....	49
➤ Citomegalovírus.....	51
➤ Rubéola.....	52
➤ Toxoplasmose.....	52
2.2.7. Técnicas manuais.....	53
➤ Detecção de Sífilis.....	53
➤ Detecção de mononucleose.....	54
2.2.8 Outros parâmetros.....	55
➤ Anticorpos antiestreptolisina O.....	55
<b>3. Controlo de Qualidade Interno e Externo.....</b>	<b>56</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>57</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>59</b>



## **Abreviaturas**

**Ac** - Anticorpo

**AcHBc** - Anticorpo do core da hepatite B

**AcHBe** - Anticorpo E da hepatite B

**AcHBs** - Anticorpo de superfície da hepatite B

**Ag** - Antígeno

**Ag HBe** - Antígeno E da hepatite B

**Ag HBs** - Antígeno de superfície da hepatite B

**ALP** - Fosfatase alcalina

**ALT** - Alanina aminotransferase

**APTT** - Tempo de tromboplastina parcial ativada

**AST** - Aspartato aminotransferase

**A-TG** - Anticorpo anti-tireoglobulina

**ATP** - Adenosina trifosfato

**A-TPO** - Anticorpo anti-peroxidase específica da tiroide

**BHCG** - Gonadotrofina coriônica humana

**CA 19.9** - Antígeno carboidrato 19.9

**CK** - Creatina cinase

**CMV** - Citomomegalovírus

**DM** - Diabetes *mellitus*

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DRC** - Doença renal crónica

**DST** - Doença sexualmente transmissível

**EAM** - Enfarte agudo do miocárdio

**EBV** - *Vírus epstein-barr*

**FSH** - Hormona folículo estimulante

**FT3** - Triiodotironina livre

**FT4** - Tiroxina livre

**GAMA GT** - Gamaglutamiltransferase

**HbA1C** - Hemoglobina glicada A<sub>1</sub>C

**HBP** - Hiperplasia benigna da próstata

**HCV** - Vírus da hepatite C

**HDL** - Lipoproteína de alta densidade

**HIL** - Hemólise, icterícia, lipémia.

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana  
**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência  
**HTA** - Hipertensão arterial  
**IgG** - Imunoglobulina G  
**IgM** - Imunoglobulina M  
**ISE** - Eléctrodo seletivo de iões  
**LDH** - Lactato desidrogenase  
**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade  
**LH** - Hormona luteinizante  
**LPL** - Lipoproteína lipase  
**MNI** - Mononucleose infecciosa  
**PCR** - Proteína C reativa  
**PKC** - Proteína cinase C  
**PRL** - Prolactina  
**PSA** - Antígeno específico da próstata  
**PSAL** - Antígeno específico da próstata livre  
**PSAT** - Antígeno específico da próstata total  
**PT** - Tempo de protrombina  
**PTGO** - Prova de tolerância à glicose oral  
**PTH** - Paratormona  
**RPM** - Rotações por minuto  
**SIDA** - Síndrome da imunodeficiência adquirida  
**T3** - Triiodotironina  
**T4** - Tiroxina  
**TASO** - Anticorpo anti-streptolisina O  
**TBG** - Globulina ligadora de tiroxina  
**TFG** - Taxa de filtração glomerular  
**TRH** - Hormona libertadora da hormona estimuladora da tiroide  
**TSH** - Hormona estimuladora da tiroide  
**VLDL** - Lipoproteína de muito baixa densidade  
**VS** - Velocidade de sedimentação

## Resumo

No decorrer do mestrado de Análises Clínicas foram-me ministrados conhecimentos relevantes na área de diagnóstico laboratorial, que me permitiram crescer enquanto profissional e adquirir uma perspetiva das análises clínicas enquanto um todo e não compartimentadas como habitualmente são classificadas. Tenho a felicidade de ser já uma profissional nesta área, mas tenho plena consciência que me encontro em constante formação.

Foi-me dada a oportunidade de fazer o estágio curricular no Laboratório José Manuel Chau, no qual exerço funções desde 2015, o que me abriu portas para o estabelecimento de laços com vários setores, alguns deles com os quais já mantinha maior contacto através do meu trabalho de rotina diária como é o caso do setor da Urinálise/Parasitologia. Assim, foi possível estreitar laços, com outros setores tais como a Hematologia/Coagulação, Microbiologia e Bioquímica/Imunologia. Contudo, foi no setor da Bioquímica e Imunologia que passei mais horas deste estágio e foram estas as áreas a que mais me dediquei e que por isso foram selecionadas para escrever este relatório de estágio, através do qual tentarei mostrar o trabalho de rotina diária e as especificidades de cada uma delas.

**Palavras-chave:** Bioquímica clínica; Imunologia; Análises clínicas; Laboratório; Relatório de estágio.



## **Abstract**

In the course of the master's degree in Clinical Analysis, I got important knowledge in the area of laboratorial diagnosis, which allowed me to grow as a professional in this field and look at the various areas in the scope of Clinical Analysis as a whole and not compartmentalized as usually classified. I am very lucky to already work in this field but I am aware that I am constantly training and learning.

I had the opportunity to do my internship in the laboratory José Manuel Chau, in Coimbra, where I have been working since 2015, which opened me doors to the establishment of ties with various sectors, some of whom I had already established more contact with the laboratory routine work such as case of urianalyses/parasitology. Therefore, it was possible to strengthen ties with other sectors, such as hematology/coagulation and microbiology and biochemistry/immunology. However, it was in this last sector that I spent the most time of this internship and so in this report these two areas will be described in order to show the different laboratory routine work in each scientific area.

**Key words:** Clinical biochemistry; Immunology; Biomedical science; Biochemical parameters; Laboratory; Internship report.





## Introdução

A decisão de ingressar num segundo ciclo de estudos na área das análises clínicas através da frequência do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, prendeu-se com a minha chegada ao mercado de trabalho, em fevereiro de 2015, altura em que fui recrutada pelo Laboratório José Manuel Chau S.A., que passarei a designar como Laboratório Chau, pertencente ao grupo Beatriz Godinho (Fig.1), para desempenhar funções como Técnica de Análises Clínicas. Com a chegada deste novo desafio e muito embora já tivesse frequentado a licenciatura de Análises Clínicas e Saúde Pública (a atual licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra), senti a necessidade de evoluir a nível académico com a finalidade de melhorar as minhas competências profissionais na área.

Tendo em conta esta minha vontade de querer saber mais e fazer cada vez mais e melhor, fez sentido para mim que este estágio decorresse neste mesmo laboratório. Ao longo dos últimos meses tive oportunidade de contactar mais aprofundadamente com os diversos setores que compõem o nosso laboratório, nomeadamente, a Urinálise/Parasitologia, Hematologia/Coagulação, Microbiologia e Bioquímica/Imunologia, não só por exigências profissionais como também no sentido de fazer a ponte entre os conhecimentos teóricos adquiridos no mestrado e a prática clínico-laboratorial. Embora me fosse dada a oportunidade de passar por todos os setores referidos, desempenhei funções durante mais tempo no setor da Bioquímica clínica e Imunologia. De facto, neste laboratório, não é feita a separação das duas áreas, já que a cadeia de autoanalisadores utilizada neste momento (Cobas 6000<sup>®</sup>) permite fazer as análises para ambas, fazendo todo o sentido descrevê-las de forma mais minuciosa no presente relatório.



**Figura 1:** Logotipo do Grupo Beatriz Godinho.

## **Dinâmica do trabalho diário no Laboratório José Manuel Chau S.A**

O Laboratório Chau está situado na cidade de Coimbra e faz parte de um grupo que agrega vários outros laboratórios, clínicas médicas e farmácias, o Grupo Beatriz Godinho.

Este laboratório tem colaboradores de várias categorias profissionais que são todas peças imprescindíveis do mesmo “*puzzle*”, desde rececionistas, técnicos de Análises Clínicas, técnicos superiores de laboratório e farmacêuticas especialistas em Análises Clínicas.

A direção técnica do laboratório está ao cargo da Dra. Ana Filipa Paredes tendo como diretora técnica substituta a Dra. Sofia Estácio.

Todos os Laboratórios do Grupo Beatriz Godinho estão conectados através de uma rede informática que permite o acesso ao programa de registo de utentes (*E-Deia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>*) através do qual se criam fichas de utente com base nos seus dados pessoais: nome completo, data de nascimento, contacto telefónico, entre outros, e as análises prescritas, na forma de credencial médica, pelo médico de família, médico assistente ou através de requisição particular. Com este programa é possível registar o utente na base de dados, aceder ao seu histórico de resultados, fazer o registo dos resultados das análises prescritas bem como a sua respetiva validação técnica e biopatológica. Estas ações são tomadas de acordo com os cargos desempenhados por cada profissional, sendo que a validação biopatológica apenas fica ao cargo das farmacêuticas especialistas.

Diariamente recebemos, em média, entre 350 a 400 amostras enviadas a partir dos 47 postos de colheitas existentes na região de Coimbra e Aveiro. A atividade diária começa em todos os postos de colheitas com o trabalho de rotina do registo do utente e a recolha das amostras biológicas necessárias à realização das análises prescritas pelo médico. O sistema *E-Deia Lab<sup>®</sup>* funciona com a identificação da credencial e das respetivas amostras através de códigos de barras, e a partir desse momento o utente deixa de ser identificado através do nome para passar a ter um número que o identifica e que permite manter a confidencialidade da sua identidade ao longo de todo o processo de registo de resultados e validação analítica.

Durante a manhã, no laboratório, há sempre um técnico ou especialista destacado para realizar as colheitas das amostras biológicas (maioritariamente sangue) que fica também responsável por calibrar e controlar as técnicas de todos os equipamentos que serão utilizados ao longo do dia. Após as devidas calibrações e de estas terem sido bem-sucedidas, os controlos internos são analisados e posteriormente avaliados tendo por base as regras de *Westgard*, para que se possa garantir a segurança na análise das amostras com obtenção de resultados fiáveis.

Logo que os tubos de sangue chegam ao laboratório, começam imediatamente a ser distribuídos em suportes, de cores diferentes de acordo com a secção a que se destinam. No caso das amostras para o setor da Bioquímica/Imunologia, se são já centrifugadas são imediatamente processadas no equipamento Cobas 6000<sup>®</sup>, sendo as restantes primeiramente centrifugadas antes de entrarem no equipamento. As amostras destinadas ao setor Hematologia/Coagulação são distribuídas em suportes vermelhos para seguirem diretamente para os respetivos equipamentos, como acontece no caso dos tubos com EDTA para o hemograma, a velocidade de sedimentação (VS) e/ou a hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) ou são previamente centrifugados, como acontece, por exemplo, com os tubos com citrato para a determinação plasmática do tempo de protrombina (PT) ou tempo tromboplastina parcial ativado (APTT).

Quando as amostras chegam às respetivas secções, o primeiro procedimento a fazer é o reconhecimento do código de barras de cada amostra através de um leitor para o programa *E-flow*. Este programa informático estabelece a comunicação entre os computadores e respetivos leitores de códigos de barras e os equipamentos das diferentes secções de trabalho, permitindo assim que quando estas amostras entram nos equipamentos comecem imediatamente a ser processadas de acordo com os pedidos de análises de cada uma delas. Em cada uma das secções do laboratório há sempre um técnico responsável por verificar se todas as amostras do dia estão no laboratório e a serem devidamente processadas, isto é possível através do controlo de “listas de trabalho” e “listas de falta de produto”. Este mesmo técnico está ainda destacado para fazer a validação analítica dos resultados antes destes chegarem à validação biopatológica final que ficará a cargo da especialista e/ou diretora técnica. Existem algumas regras do laboratório no que respeita à prioridade com que as amostras são processadas, dando-se assim primazia a i) amostras com carácter de urgência (que deverão vir identificadas dos postos de colheitas com etiqueta vermelha, mesmo que assim não aconteça, o setor da receção alerta todos os setores para a necessidade de processamento urgente), ii) amostras em atraso (que deverão vir identificadas dos postos de colheitas com etiqueta amarela) ou iii) colheitas de repetição (também identificadas com etiqueta amarela e com a anotação de “nova colheita”) que tenham sido necessárias no caso da primeira amostra não se apresentar em boas condições (hemolisada, por exemplo).

A validação analítica é uma tarefa muito importante durante a qual nos devemos munir de toda a informação de que dispomos relativamente ao utente, tal como o seu histórico, idade, género, medicação que faz diariamente ou dados clínicos importantes que tenham sido transmitidos no momento que antecede a colheita.

No decorrer da tarde é feita a conferência do registo das análises pelo departamento da Faturação/Conferência. É neste momento que são verificadas, uma a uma, as análises que foram registadas e se conferem, novamente, os dados dos utentes. É nesta altura, que caso seja detetada alguma análise que não tenha sido registada ou que tenha sido trocada se avisam as secções dessa correção para que, atempadamente, possam avaliar exatamente os parâmetros requisitados.

No final do dia, e já depois de devidamente validados pela especialista, os boletins de resultados são impressos e fechados em envelope no setor da Receção/Resultados e posteriormente distribuídos pelos colaboradores para os fazerem chegar aos postos de colheitas ou centros de saúde.

O trabalho realizado, diariamente, nos postos de colheitas e nos vários setores do laboratório é acompanhado pela direção técnica e pelos responsáveis da qualidade do Grupo Beatriz Godinho. São previamente agendadas reuniões entre o departamento da qualidade e toda a equipa, para dar conhecimento de forma mais próxima e eficaz de alterações de legislação, atualizações de métodos, procedimentos internos do laboratório ou sugerir e implementar ações de correção e de prevenção relevantes para a atividade do mesmo.

## **Atividades laboratoriais desenvolvidas no estágio curricular**

Durante o presente estágio curricular tive oportunidade de estar em contacto direto e trabalhar em todos os serviços do laboratório, no entanto, foi no sector da Bioquímica/Imunologia que passei mais tempo deste estágio, como atrás referido, e por isso irei debruçar-me mais sobre estas duas áreas que, embora distintas, se encontram muito próximas.

### **Setor de Bioquímica Clínica e Imunologia**

#### **I. Atividades na fase pré-analítica**

Neste setor, a principal amostra analisada é o soro, ocasionalmente utilizamos também plasma (quando previsto pela técnica) para algum esclarecimento que seja necessário ou na impossibilidade de ser obtido o soro do paciente. A colheita sanguínea é obtida por punção venosa e a amostra estabiliza durante dez a quinze minutos para que ocorra a retração do coágulo. Posteriormente, a amostra é sujeita a uma centrifugação a 4000 rpm durante dez minutos de forma a obter o soro e efetuar as determinações analíticas pretendidas. A retração do coágulo é de suma importância para evitar hemólise já

que o índice de hemólise da amostra pode interferir com algumas determinações, nomeadamente com a do potássio.

Amostras também muito frequentes nesta secção são as amostras de urina (amostra ocasional ou colheita de urina de 24h). Estas amostras são também previamente centrifugadas antes de serem introduzidas no autoanalisador da secção de bioquímica.

O laboratório usa o sistema informático de triagem das amostras *E-flow* da *Roche Diagnostics* que funciona a partir da leitura de códigos de barras dos tubos das amostras e que faz a distribuição dos mesmos, de acordo com um código de cores que permite, rapidamente, perceber qual a ordem de processamento para a referida amostra, cuja ordem de prioridade deverá ser:

1. Separação de alíquotas para correio interno e/ou externo;
2. Separação de alíquotas para armazenamento na seroteca;
3. Seguir para a cadeia de autoanalisadores;
4. Seguir para aparelho automático de eletroforeses.

No momento em que se faz a triagem da amostra, faz-se também uma primeira análise macroscópica da mesma em que se identifica e escreve no processo do utente os aspetos que possam influenciar de alguma forma os resultados das análises, tais como: estar hemolisada, ser lipémica ou ictérica. Desta forma, a informação chega a quem vai fazer a validação e permite avaliar a necessidade de pedir uma nova colheita. No final da amostra ter sido analisada, este programa permitir-nos-á arquivá-la, em posição fixa, no suporte de arquivo.

### **1.1. Separação de alíquotas para laboratórios subcontratados**

Por questões logísticas e financeiras existem algumas análises que não são realizadas no Laboratório Chau, quer seja pela pouca frequência com que são solicitadas quer pela elevada especificidade que apresentam. Este laboratório é de média dimensão, não tendo capacidade técnica/equipamento para dar resposta ao vasto painel de parâmetros que possam ser requisitados. Assim, para contornar esta situação e dar resposta a todas as análises prescritas recorre-se à subcontratação das mesmas a outros laboratórios entre eles: Dr. Joaquim Chaves- Laboratório de Análises Clínicas S.A, Laboratório Cerba Internacional S.A ou Laboratórios Beatriz Godinho- Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A.

Todos os dias há um técnico responsável pela preparação das amostras a serem enviadas, por correio interno ou externo, para os laboratórios subcontratados. Respeitando as regras dos manuais de colheitas do laboratório Chau e dos restantes laboratórios

subcontratados, as amostras são separadas e preparadas para envio. Desta forma, dá-se uma especial atenção ao tipo de amostra que é necessário (soro ou plasma), ao tipo de conservação requerida (refrigerada ou congelada) ou outras condicionantes, como é o caso de manter ao abrigo da luz amostras destinadas à determinação de parâmetros fotossensíveis. A acompanhar as alíquotas segue sempre a lista das análises que estão a ser requisitadas e os dados dos utentes (idade, sexo e informação clínica relevante).

## 1.2. Separação de alíquotas para seroteca

Sendo uma obrigação legal, são separadas, congeladas e armazenadas durante um ano alíquotas de amostras com pedido de análises do grupo TORCH.

No caso das crianças com idade inferior a doze anos e que tenham pedidos de alérgenos o soro também é congelado por um período de três meses.

## 1.3. Calibração da cadeia de autoanalisadores

No Laboratório Chau está instalada uma cadeia de autoanalisadores, o Cobas 6000<sup>®</sup> (Fig. 2) que é composto pelo módulo core (cu-150) através do qual são introduzidas as amostras, pelo módulo c-501, onde são processadas as amostras de bioquímica e por outros dois módulos cobas 601 onde se efetuam testes de imunoquímica.



**Figura 2:** Autoanalizador Cobas 6000<sup>®</sup> da Roche.

É um equipamento de ótimo desempenho quando utilizado na sua plenitude, o que só é possível através da sua calibração e controlos diários. Todas as manhãs há um técnico responsável por esta tarefa, o que não invalida que as técnicas sejam novamente controladas ou calibradas ao longo do dia se assim se justificar.

A introdução deste tipo de cadeias de autoanalisadores liberta o operador permitindo-lhe ter mais tempo para a análise e validação analítica dos resultados, reduz a necessidade de manuseamento das amostras de equipamento para equipamento e torna mais rápido o processamento e a obtenção dos resultados. Para além de todos os testes que é possível realizar neste equipamento também é avaliado em todas as amostras processadas na bioquímica o seu índice de soro (HIL), ou seja, determinação do grau de hemólise, icterícia e lipémia das amostras.

## 2. Atividades na fase analítica

### 2.1. Setor da Bioquímica Clínica

Podemos avaliar através da bioquímica clínica o perfil eletrolítico, hepático, renal, lipêmico e biliar de adultos e crianças de acordo com critérios de normalidade bem estudados e definidos que tomamos como valores de referência e que nos permitem estabelecer comparações e fazer a correta avaliação do estado de saúde de um paciente.

O fígado é um dos órgãos mais importantes do nosso organismo funcionando como a nossa máquina de síntese, do metabolismo e de desintoxicação. É o órgão responsável pela metabolização de lípidos, hidratos de carbono e proteínas. Tem funções hematológicas importantes, nomeadamente pela produção de fatores de coagulação, como a protrombina, é o responsável pela produção e excreção de bÍlis bem como de síntese de inúmeros compostos, incluindo a ureia, bilirrubina e albumina.

O fígado possui ainda nas suas células um grande número de enzimas intracelulares que são usadas como parâmetros séricos de controlo da função hepática, nomeadamente, a aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (ALP) ou a gamaglutamiltransferase (GGT). Este órgão pode ser afetado por patologias de foro oncológico, cirroses (tóxica e não tóxica), hepatites virais, entre outras, daí a importância dos testes bioquímicos de função hepática que idealmente devem permitir avaliar o órgão na plenitude das suas funções e serem capazes de fornecer informação sobre o seu estado vital, possibilitando um diagnóstico atempado e um correto acompanhamento e monitorização das terapêuticas.

Os rins são também órgãos fundamentais que apresentam variadas funções: síntese hormonal, reabsorção de substâncias essenciais como iões e água (permitindo a regulação da osmolalidade do plasma), manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, manutenção do equilíbrio ácido-base e participam na eliminação de substâncias tóxicas decorrentes do metabolismo, tais como ureia e creatinina, através da urina. O doseamento de parâmetros séricos, tais como o ácido úrico, a creatinina e a ureia é fundamental para detetar e monitorizar alterações da função glomerular. Para além disso, os doseamentos séricos de iões como o sódio, potássio, cloreto e cálcio também poderão ser utilizados na avaliação da função renal. Diversas patologias do foro renal podem originar uma insuficiência renal aguda ou crónica. Podemos falar em insuficiência renal crónica quando temos uma falência gradual de um ou dos dois rins considerada irreversível, surgindo com frequência associada à Diabetes Mellitus (DM) e à Hipertensão Arterial (HTA). Quanto à insuficiência renal aguda,



trata-se de uma deficiência aguda na capacidade de filtração do rim, mas é considerada reversível e surge muitas vezes associada a glomerulonefrites, cálculos renais e hipovolémia grave.

No que respeita ao perfil eletrolítico, ele é avaliado essencialmente através do doseamento sérico dos iões  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  embora também seja importante a avaliação de outro tipo de iões como é o caso do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os iões apresentam diversas funções relevantes no nosso organismo, entre elas a manutenção da homeostasia hídrica nos vários fluidos corporais, manutenção da pressão osmótica e do pH sanguíneo, participação em reações de oxidação-redução e servem muitas vezes de cofatores para enzimas, estando ainda ligados ao processo de contração muscular. Por todas estas razões o ionograma é uma das análises mais requisitada em análises de rotina e avaliação preventiva.

Os lípidos desempenham funções biológicas de extrema importância, quer ao nível estrutural (membranas celulares), quer como reserva energética ou como mensageiros (hormonas). Os principais lípidos no sangue são os triglicerídeos e o colesterol, transportados em complexos lipo-proteicos, lipoproteínas, devido à sua insolubilidade em água. Dependendo das suas dimensões e densidade hidratada as lipoproteínas são designadas como quilomícrons, lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Alterações na composição de lípidos/lipoproteínas no plasma encontram-se associadas a patologias relacionadas com o processo aterosclerótico sendo, por isso, a análise de lípidos também uma das mais frequentes no sector.

Todos os parâmetros bioquímicos devem ser avaliados preferencialmente com um estado de jejum de 8 a 12 horas sendo especialmente importante para avaliação do colesterol e dos triglicerídeos.

O setor da Bioquímica Clínica inclui os equipamentos indicados na tabela I.

**Tabela I:** Equipamentos instalados no setor de Bioquímica Clínica do Laboratório Chau.

<b>Equipamentos</b>	<b>Metodologias associadas</b>
<i>Cobas 6000® Módulo c-501 (Roche Diagnostics)</i>	Fotometria e Potenciometria indireta
<i>Minicap (Sebia)</i>	Eletroforese capilar
<i>Aution Max AX-4030 (A.Menarini Diagnostics)</i>	Refratometria de Reflectância
<i>SediMAX (A. Menarini Diagnostics)</i>	Microscopia em cuvete
<i>Hb9210 (A. Menarini Diagnostics)</i>	Cromatografia líquida de alta eficiência

Nesta fase inicial irei abordar sobretudo as análises bioquímicas realizadas no equipamento Cobas 6000<sup>®</sup> já que representa o core do setor da bioquímica neste laboratório.

A fotometria é a base das metodologias analíticas mais utilizadas em bioquímica clínica permitindo a quantificação de analitos através de ensaios turbidimétricos, colorimétricos ou colorimétricos enzimáticos. Baseia-se na utilização de radiação num comprimento de onda quer do visível, quer do ultravioleta ou infravermelho e na relação entre a concentração de um analito numa solução e a quantidade de radiação absorvida pelo mesmo. A intensidade do feixe de luz emitido pela lâmpada do equipamento diminui ao atravessar a solução devido à sua absorção pelo analito a quantificar e a luz que chega ao foto-detector é então medida e permite avaliar a concentração de analito na amostra. Esta metodologia é a base do funcionamento do módulo c-501 do Cobas 6000<sup>®</sup> que permite determinar os analitos relacionados com a avaliação da função hepática, e da função renal, com o estudo do perfil lipídico e com a quantificação de proteínas, enzimas e hidratos de carbono.

Este módulo inclui ainda a metodologia de Potenciometria indireta utilizando para isso um eléctrodo de referência e eléctrodos seletivos de iões (ISE). A Potenciometria é uma metodologia eletroquímica baseada na determinação da diferença de potencial entre um eléctrodo de referência, com potencial constante e conhecido, e um eléctrodo indicador. O eléctrodo indicador apresenta seletividade para um ião particular e quando na sua presença, permite medir o seu potencial na solução, por intermédio de um voltímetro. Com base na comparação do potencial do ISE com o potencial do eléctrodo de referência é possível determinar a concentração do ião na solução. Esta metodologia permite fazer a determinação do perfil eletrolítico, designado por ionograma, do soro ou da urina que neste laboratório inclui as determinações do sódio, potássio e cloreto.

A seguir indicam-se os parâmetros bioquímicos mais determinados ao longo do estágio, agrupados de acordo com a sua afinidade para o diagnóstico laboratorial.

### 2.1.1. Avaliação da função hepática

#### ➤ Frações da bilirrubina

O metabolismo da bilirrubina inclui a sua captação pelos hepatócitos, a conjugação e secreção hepática. Neste processo estão envolvidas diversas enzimas cujas atividades podem estar alteradas culminando em patologia. Os eritrócitos são formados na medula óssea com

destino ao sistema circulatório, circulando por aproximadamente 120 dias. Findo esse período, entram num estado senescente que culmina com a sua lise no sistema reticuloendotelial quer ao nível do baço quer do fígado ou medula óssea. A lise eritrócitária resulta na libertação de hemoglobina que é catabolizada pelas células de *Kupffer* no fígado e pelos macrófagos no baço e na medula óssea e posteriormente transformada em biliverdina pela heme-oxigenase. A biliverdina-redutase converte a biliverdina em bilirrubina livre que é gradualmente libertada pelos macrófagos no plasma, ligando-se aí à albumina e constituindo a bilirrubina não conjugada/indireta. Esta fração quando não ligada à proteína é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo potencialmente tóxica para o sistema nervoso, o que se verifica em situações de hiperbilirrubinémia indireta grave (Burtis *et al.*, 2015).

Em situações normais, a bilirrubina indireta vai-se conjugar com o ácido glicurónico, nas células hepáticas, dando origem à bilirrubina conjugada/direta que é eliminada nos canalículos biliares, fazendo parte da composição da bÍlis. Sendo solúvel em água, quando aumenta no plasma é eliminada pelos rins. A sua concentração sérica é mínima em condições fisiológicas (0-0.2 mg/dL). Na bÍlis, a bilirrubina conjugada passa para o intestino onde é convertida a urobilinogénio pela flora bacteriana presente, parte deste é reabsorvido a nível intestinal, podendo ser eliminado através do rim, e o restante é eliminado nas fezes na forma de urobilina o que lhes confere a sua coloração (Burtis *et al.*, 2015).

Uma hiperbilirrubinémia devido ao excesso de bilirrubina indireta pode surgir em doenças hemolíticas, a hiperbilirrubinémia devido à bilirrubina direta pode surgir em situações de obstrução dos canais biliares como acontece na litÍase biliar e em casos de tumores no trato biliar e pancreático.

Em quadros de hepatite e cirrose, tanto a bilirrubina direta como a indireta estão aumentadas sendo por isso considerada a sua determinação um excelente marcador hepático muito relevante na avaliação e caracterização de ictéricas.

A bilirrubina direta é quantificada pelo método Diazo pela reação direta com o reagente ácido sulfanílico diazotado com a formação de azobilirrubina.

A bilirrubina total é quantificada da mesma forma mas na presença de uma substância que aumente a solubilidade da bilirrubina não conjugada no meio aquoso. Em ambos os casos, a intensidade de cor da azobilirrubina é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra (Burtis *et al.*, 2015).

### ➤ Fosfatase alcalina

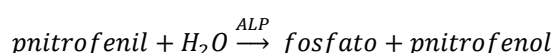
A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima encontrada em diversos tecidos do corpo com maiores concentrações ao nível do fígado e dos ossos.

No fígado está presente sobretudo nas células que formam a parede dos ductos biliares, podendo a sua expressão aumentar nas situações de obstrução biliar.

Nos ossos é produzida pelos osteoblastos, células envolvidas na formação de tecido ósseo, estando por isso preconizado que nas fases de crescimento (infância e adolescência) os valores desta enzima serão intrinsecamente mais elevados sem que isso esteja associado a qualquer patologia (Burtis *et al.*, 2015).

No adulto, a determinação da concentração de fosfatase alcalina no sangue é um importante teste de função hepática, uma vez que é uma mais valia no despiste e identificação de patologias hepáticas associadas à obstrução dos ductos biliares, como acontece nas hepatites, litíase biliar, cirrose, tumores ou abscessos no fígado. Também surgem casos de aumento da atividade desta enzima no adulto por problemas ósseos associados ao aumento da atividade dos osteoblastos, tais como a doença de Paget, raquitismo e, ainda, em mulheres grávidas especialmente a partir do terceiro trimestre de gravidez devido à produção de ALP pela placenta.

A determinação da atividade da ALP em associação à da gamaglutamiltransferase (GGT) permite inferir ou excluir a sua origem hepática. A determinação laboratorial é feita através de ensaio colorimétrico de acordo com a seguinte reação:



O p-nitrofenol libertado é determinado medindo o aumento da absorvância a 450 nm e é diretamente proporcional à atividade catalítica da ALP.

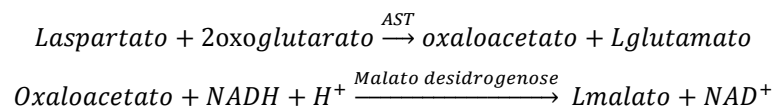
### ➤ Aspartato aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias das células do fígado, coração e músculo esquelético sendo responsável pela interconversão de aminoácidos. Esta é libertada na circulação após lesão ou morte celular e a sua determinação é utilizada maioritariamente para avaliação da função hepática estando aumentada de forma significativa em casos de necrose hepática, cirrose hepática ou

hepatites virais, podendo, no entanto, aumentar em outras patologias como o enfarte agudo do miocárdio (EAM) e pancreatite aguda (Burtis *et al.*, 2015).

O grau do aumento da enzima fornece informações quanto à possível fonte do problema, uma duplicação do valor de referência (Homens  $\leq 40$  U/L e Mulheres  $\leq 32$  U/L), quando é associado a um aumento significativo da ALP, é sugestivo de um problema obstrutivo já no caso de haver uma elevação dez vezes superior ao normal poderá indicar hepatite.

O ensaio de determinação da atividade da AST é cinético e enzimático:



A taxa de oxidação de NADH, determinada pela diminuição da absorvância a 340 nm, é diretamente proporcional à atividade catalítica da AST.

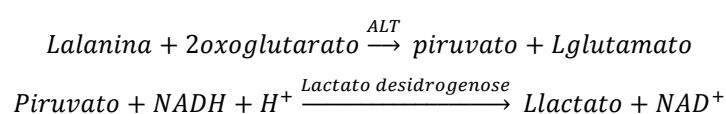
#### ➤ Alanina aminotransferase

A Alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima presente no citoplasma das células do fígado, rins, coração, pâncreas, músculo esquelético, pulmão e baço. A sua principal função é acelerar reações químicas que ocorrem no interior das células hepáticas aquando do catabolismo de aminoácidos.

A atividade da enzima ALT, no plasma é um indicador de lesão hepática sendo frequentemente utilizada para avaliar a hepatotoxicidade induzida por vírus ou fármacos.

A atividade aumentada da ALT no plasma é bastante mais específica do que a AST para a patologia do parênquima hepático, embora o seu valor de diagnóstico esteja associado à avaliação conjunta com as restantes enzimas hepáticas.

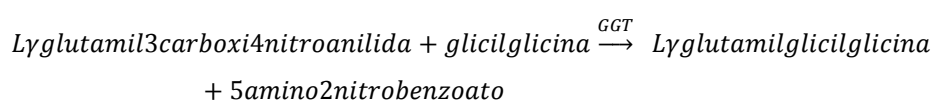
A sua determinação é feita por método cinético e enzimático com base no decréscimo da absorvância a 340 nm, à semelhança do que acontece com a AST através das seguintes reações:



### ➤ Gamaglutamiltransferase

A gamaglutamiltransferase (GGT) é uma enzima que se encontra sobretudo nas membranas do sistema hepatobiliar tendo como função a transferência do ácido glutâmico através das mesmas. Esta enzima encontra-se especialmente aumentada, em paralelo com a ALP, em situações de colestase intra ou extra-hepática, na hepatite alcoólica e em neoplasias hepáticas primárias (Todo Bom *et al.*, 2013).

Nas doenças hepáticas obstrutivas os valores da atividade plasmática da GGT estão entre cinco a cinquenta vezes acima do normal (valores de referência: Homens <60 U/L e Mulheres <40 U/L), já nas hepatites infecciosas o aumento é mais discreto. No entanto, a avaliação desta enzima mostra-se muito útil no acompanhamento das hepatites infecciosas, uma vez que esta é a última enzima hepática a normalizar. A sua atividade é determinada através de um ensaio colorimétrico a partir da seguinte reação:



A atividade enzimática é medida pela quantidade de 5-amino-2-nitrobenzoato formado, avaliada pela sua absorvância a 415 nm.

### 2.1.2. Avaliação da função renal

#### ➤ Creatinina sérica e *clearance* da creatinina

A creatina fosfato funciona como reserva energética a nível muscular, sendo formada pela fosforilação da creatina em períodos de abundância de ATP, uma reação mediada pela creatina cinase. Por catabolismo normal da creatina e da creatina fosfato forma-se diariamente uma certa quantidade de creatinina que é libertada para a corrente sanguínea (Burtis *et al.*, 2015).

Assim, a creatinina é produzida a nível muscular e é eliminada da circulação por filtração glomerular, sendo por isso um dos principais analitos determinados para fazer a avaliação da função renal. A concentração da creatinina a nível sanguíneo é muito baixa, sendo influenciada, pela massa muscular de cada um, podendo por isso variar de indivíduo para indivíduo sem que isso represente patologia renal. Os valores de referência estabelecidos são: Homens 0.70-1.20 mg/dL e Mulheres 0.50-0.90 mg/dL. Os homens

apresentam valores mais elevados de creatinina no plasma devido à sua maior massa muscular sendo que o mesmo também é válido para desportistas que tenham intensa atividade muscular.

Por outro lado, concentrações séricas de creatinina diminuídas podem ocorrer com frequência em grávidas ou ainda em casos de patologia hepática grave.

A determinação sérica da creatinina é muito útil para avaliar o grau de filtração glomerular, contudo devido à sua falta de sensibilidade, em casos de controlo de patologias que poderão evoluir para doença renal grave a melhor determinação é o teste da *Clearance* da creatinina (Sodré, Costa, & Lima, 2007). Este envolve o doseamento da creatinina, pelo ensaio colorimétrico de *Jaffé*, numa amostra de urina de 24 horas e uma amostra de soro, e a determinação da taxa de filtração glomerular, faz-se de acordo com a fórmula:

$$TFG (ml/min) = \frac{[Creatinina\ urinária](mg/dL) \times Débito\ urinário(ml/min)}{[Creatinina\ plasmática] (mg/dL)}$$

Valores elevados da creatinina a nível sérico e diminuídos a nível urinário refletidos numa diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), indicam que o rim poderá estar disfuncional quer por infeção, obstrução ou por outras patologias associadas (Burtis et al., 2015).

#### ➤ Ureia

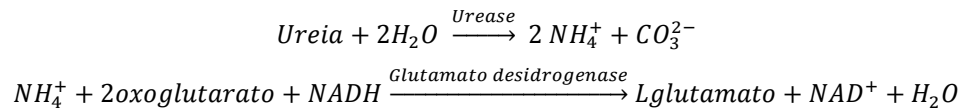
A ureia é um catabolito azotado sintetizado nos hepatócitos a partir do grupo amina resultante da desaminação oxidativa dos aminoácidos. Em situações fisiológicas, 90% da ureia é eliminada por filtração renal, sendo a restante eliminada através do trato gastrointestinal e da pele.

Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo renal e não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a concentração sérica da ureia é um fraco indicador da TFG pois 40%-70% da ureia retorna para o plasma por um processo de difusão passiva nos túbulos renais. Assim, quando o débito urinário se encontra diminuído, tal como acontece em casos de desidratação, há um aumento do retorno da ureia para a corrente sanguínea que se reflete no seu aumento sérico. Porém, nem só nesses casos temos aumento da concentração da ureia no soro, o mesmo pode ocorrer em casos de excesso de ingestão proteica ou em casos em que há diminuição da taxa de filtração glomerular (Todo Bom et al., 2013).

Este parâmetro ganha mais relevância do ponto de vista clínico quando usado em conjugação com a determinação sérica da creatinina, permitindo assim saber se se trata ou

não de uma patologia renal e no caso de o ser permite fazer o diagnóstico diferencial entre patologia pré-renal (choque, hipovolémia) renal (pielonefrite crónica, necrose tubular) ou pós-renal (obstrução urinária). Em casos de doenças hepáticas graves pode ocorrer a diminuição do valor da concentração sérica da ureia.

O doseamento da ureia é feito por ensaio cinético e enzimático sendo a taxa de diminuição do NADH avaliada pelo decréscimo da absorvância a 340 nm, diretamente proporcional à concentração de ureia:

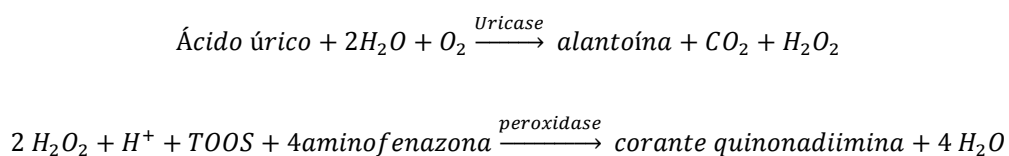


### ➤ Ácido úrico

O ácido úrico representa o produto final do catabolismo das purinas da dieta e das purinas dos ácidos nucleicos endógenos. Está presente no soro em muito baixa concentração (Homens 3.4-7.0 mg/dL e Mulheres 2.4-5.7 mg/dL) sob a forma de ião urato, sendo excretado a nível renal através da urina (Burtis et al., 2015).

A presença de elevadas concentrações deste ião no plasma, hiperuricémia, pode originar a sua precipitação nas articulações devido à sua baixa solubilidade e propensão à formação de cristais, resultando num quadro clínico vulgarmente conhecido por gota. Embora seja esta a patologia mais frequentemente associada a valores elevados de ácido úrico no sangue, existem outras patologias como é o caso da nefrite crónica ou presença de cálculos renais que podem também ser causa ou consequência da hiperuricémia. A formação de cálculos urinários constituídos por ácido úrico está mais associada a um baixo pH urinário (pH abaixo de 5.5) do que a valores plasmáticos elevados, contudo, a sua deposição a nível renal pode provocar inflamação e a longo prazo insuficiência renal crónica.

A determinação laboratorial deste catabolito é feita através de um método enzimático, com avaliação colorimétrica, segundo as reações a baixo esquematizadas:



O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultante da oxidação do ácido úrico catalizada pela uricase é quantificado numa reação mediada pela peroxidase que envolve o N-etil-N-(2-Hidroxi-3-Sulfopropil) 3-



metilanilina (TOOS) e a aminofenazona. A intensidade de cor lida a 546 nm da quinona-diimina formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

➤ Análise sumária urinária

A análise sumária urinária, comumente chamada de análise da urina tipo II, é requisitada com bastante frequência em análises de rotina pela relevância que apresenta no auxílio ao despiste e diagnóstico de muitas patologias.



**Figura 3:** Equipamento Aution MAX AX-4030 e SediMAX.

Quando avaliada em simultâneo com outros parâmetros analíticos do soro ajuda a fazer diagnóstico de patologias como a insuficiência renal ou a diabetes *mellitus* por exemplo. Além disso, por si só, permite fazer o diagnóstico de infecção microbológica no trato urinário. A avaliação completa da análise da urina tipo II passa pela sua avaliação bioquímica (tabela II) e respetiva análise do sedimento urinário.

No Laboratório Chau, o setor da Urianálise está equipado com um sistema da *Menarini*<sup>TM</sup> que é constituído pelo equipamento AUTION MAX AX-4030<sup>TM</sup> apresentado na figura 3. Este equipamento faz a análise semi-quantitativa dos parâmetros analíticos pesquisados na urina com recurso à refratometria de reflectância das tiras-teste contendo reagentes que, em contacto com a amostra, reagem com os analitos, conferindo cor na zona correspondente. Através da incidência de uma fonte luminosa sobre as tiras-teste estas irão refletir a luz de acordo com a intensidade da cor produzida, sendo a concentração dos analitos na amostra então determinada de modo semi-quantitativo com base na luz refletida (Vallada, 1993).

**Tabela II:** Parâmetros analíticos urinários avaliados no Autoanalisador AUTION MAX AX-4030.

Parâmetros analíticos	Interpretação analítica dos parâmetros
Cor (Amarelo)	Amarelo claro, amarelo escuro, alaranjada ou acastanhada dependendo da concentração da urina e da presença de alguns solutos que lhe conferem cor.
Leucócitos (< 3.0/campo)	Surgem na amostra quando há inflamação renal ou no trato urinário inferior.
Sangue (< 2.0/campo)	Pode surgir em casos de infecção avançada no trato urinário ou em pacientes algaliados. Em mulheres em idade fértil deve-se considerar a possibilidade de má colheita (contaminação com o fluxo menstrual).
Nitritos (Negativo)	A sua presença poderá estar relacionada com infecção por bactérias com capacidade de reduzir nitratos a nitritos.
Glicose (Negativo)	Sempre que positiva na urina, em geral em casos de hiperglicemia, indica que a quantidade filtrada pelo rim foi superior ao seu limite de reabsorção, sendo usada no diagnóstico e no controle da diabetes mellitus.
Bilirrubina (Negativo)	A sua presença pode estar associada a problema hepático ou biliar associado ao aumento da bilirrubina direta no plasma.
Urobilinogénio (0.2-1.0)	Pode estar associado a problema hepático ou a patologias hemolíticas.
Acetonas (Negativo)	Surgem aumentadas em casos de acidose metabólica e respiratória, na gravidez, jejum prolongado, dietas rigorosas e situações de diabetes descompensada.
pH (4.6-8.0)	Pode ser alterado pela alimentação, desidratação, fármacos e outros.
Proteínas (Negativo)	A sua presença indica alteração na permeabilidade glomerular estando frequentemente associada à diabetes mellitus.
Densidade (1.005-1.030)	Tende a estar aumentada em casos de desidratação e diminuída quando há perda da capacidade de concentrar a urina (idosos, patologia renal).

Quanto à análise do sedimento urinário, esta é feita no equipamento SediMAX (Fig.3) que utiliza como metodologia a microscopia em cuvette. Esta metodologia consiste na pipetagem automática de uma pequena porção de urina para uma cuvette própria (simulando lâmina e lamela) e na sua avaliação microscópica por uma lente que também faz a captura da imagem (15 campos diferentes) e a envia para o computador que se encontra acoplado ao equipamento.



**Figura 4:** Sedimento Urinário com presença de leucócitos e cristais de oxalato de cálcio.

Assim, através da visualização das fotografias do sedimento urinário é possível fazer a discriminação e a contabilização dos elementos figurados na urina: leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cilindros hialinos, cilindros hialino-granulosos, cilindros granulosos, cristais de oxalato de cálcio, cristais de ácido úrico, cristais de fosfato, bactérias e outros elementos (Guia para o diagnóstico das infecções do tracto urinário, 1977). A título de exemplo, mostra-se na figura 4 um sedimento urinário onde se evidencia a presença de leucócitos e de cristais de oxalato de cálcio.

### 2.1.3. Iões

#### ➤ Sódio

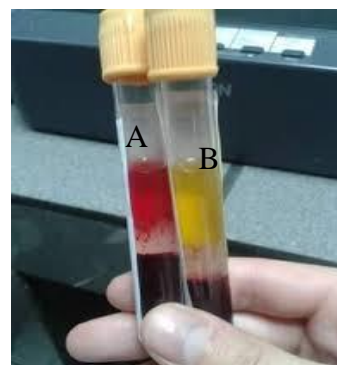
O sódio é o principal eletrólito presente no fluido extracelular o que contrasta com a sua muito baixa concentração no meio intracelular, daí que a hemólise não comprometa o seu doseamento no plasma, é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, pelo potencial de membrana (essencial em funções como a contração muscular ou a neurotransmissão) e ainda pela regulação do pH sanguíneo em conjunto com o ião cloreto e o bicarbonato. A sua absorção ocorre a nível intestinal por transporte ativo ligado à absorção de aminoácidos, bicarbonato e glicose e é eliminado através de vários fluidos corporais como as fezes, suor, mas principalmente pela urina, num processo regulado pela aldosterona. Este processo permite fazer a manutenção do teor sérico de sódio bem como a manutenção dos gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  entre o espaço intracelular e extracelular. O seu doseamento é feito por potenciometria e os seus valores devem manter-se no intervalo de 135-145 mmol/L (Burtis *et al.*, 2015).

Concentrações séricas elevadas de sódio (hipernatrémia) estão associadas a situações de desidratação, aumento da ingestão de sódio ou diminuição de excreção. Teores reduzidos de sódio (hiponatrémia) podem surgir associados à retenção de grandes quantidades de água ou podem estar associados a perdas quer renais quer extra-renais.

O doseamento do sódio é importante no diagnóstico e tratamento de doenças menos graves como gastroenterites, vômitos, diarreias, mas também em situações mais complexas como são a insuficiência renal aguda ou a doença de Addison.

### ➤ Potássio

O potássio é o catião, em maior concentração no fluido intracelular, sendo, pelo contrário, muito baixa no plasma (3.5-5.5 mmol/L), a sua determinação à semelhança do sódio é feita por potenciometria, no entanto, o seu valor pode ser facilmente aumentado pelo grau de hemólise da amostra (Fig.5). É absorvido ao longo do tubo digestivo e eliminado



por secreção urinária, controlada pela aldosterona. Este catião tem importantes funções na transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e na correção do desequilíbrio ácido-base. À parte disto, é ainda importante na manutenção do volume celular (Grassi, M. F., *et al.*, 2017).

**Figura 5:** A - Amostra de soro hemolisado; B - Amostra de soro limpo.

Podemos deparar-nos com situações de teores de potássio aumentados no soro (hipercaliémia) que podem surgir associados ao excesso de consumo de sal mas também associados a patologias como a anemia hemolítica, rabdomiólise ou insuficiência renal. Os valores deste analito poderão ainda estar diminuídos em situações de perdas de fluidos como diarreias, vômitos ou mau uso de diuréticos (Burtis *et al.*, 2015).

Por ser um parâmetro sérico tão sensível e por estar afeto a tantas patologias este acaba por ser sujeito a uma vigilância apertada, especialmente em indivíduos com arritmias cardíacas, insuficiência renal aguda e medicados com diuréticos. Sempre que surgem amostras hemolisadas com pedido de determinação deste ião, é obrigatório o pedido de nova colheita.

### ➤ Cloreto

O cloreto, conjuntamente com o sódio e o potássio, é também essencial no equilíbrio hídroelectrolítico, na regulação da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-base. Tem ainda especial importância na produção do ácido clorídrico do estômago. O cloreto é obtido através da alimentação sendo reabsorvido a nível intestinal e eliminado na urina, à semelhança dos restantes iões. A sua quantificação laboratorial é feita no módulo c-501 do cobas 6000<sup>®</sup> por potenciometria, com valores espectáveis entre 95-105 mmol/L (Burtis *et al.*, 2015).

Elevadas concentrações séricas de cloreto (hiperclorémia) podem surgir em casos de desidratação, alimentação com excesso de cloretos, necrose ou falha renal. Em

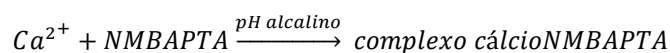
contrapartida, existem casos de baixas concentrações de cloreto (hipoclorémia) que podem estar associados a pielonefrites crônicas e perdas gastrointestinais.

### ➤ Cálcio

O cálcio é o elemento mineral mais abundante no organismo encontrando-se maioritariamente (99%) nos ossos sob a forma de hidroxapatite. Além desta função estrutural ligada ao esqueleto, este catião apresenta ainda funcionalidades importantes no que toca à coagulação sanguínea, condução do impulso neuromuscular, excitabilidade do músculo esquelético e cardíaco e participa ainda na ativação de enzimas e na preservação da integridade da membrana celular (Burtis *et al.*, 2015).

O cálcio está presente na corrente sanguínea em três formas: forma ionizada, como cálcio livre (50%), associado a proteínas, principalmente a albumina (40%) ou complexado com citrato e fosfato (10%) (Burtis *et al.*, 2015).

Os teores de cálcio no soro estão dependentes do controlo da hormona paratiroide (PTH), da vitamina D e da calcitonina. Assim, valores aumentados de PTH e de Vitamina D conduzem a hipercalcémia, mas, o mesmo também ocorre em doenças neoplásicas como, por exemplo, o Mieloma Múltiplo. Já patologias como o hipoparatiroidismo e pancreatite poderão originar situações de hipocalcémia. O doseamento deste cálcio é feito por espectrofotometria passando pelas seguintes reações sendo o BAPTA e o EDTA complexantes de  $Ca^{2+}$  respetivamente, ácido 1,2-bis(o-aminofenoxil)etano tetra e ácido etilenodiamino tetra-acético:



### ➤ Magnésio

O magnésio à semelhança do que acontece com o potássio é um importante catião intracelular. A grande reserva de magnésio no nosso organismo são os ossos que armazenam cerca de 70% da sua totalidade, encontrando-se o restante quer na forma complexada com albumina ou com fosfato, quer na sua forma livre servindo de cofator enzimático para diversas reações metabólicas que requeiram adenosina trifosfato (ATP) (Burtis *et al.*, 2015).

A concentração sérica de  $Mg^{2+}$ , determinada por ensaio colorimétrico, lido a uma absorvância de 600 nm, é normalmente mantida dentro de limites muito estreitos (0.65-1.05 mg/dL). É obtido no organismo a partir de alimentos e da água que ingerimos e a sua regulação é feita sobretudo a nível renal. A hipermagnesémia (aumento dos teores de magnésio no soro) está associada em particular a casos de insuficiência renal aguda e crónica, e a hipomagnesémia pensa-se estar associada a alterações na hemostase do cálcio, potássio e fosfato e a distúrbios cardíacos ou neuromusculares.

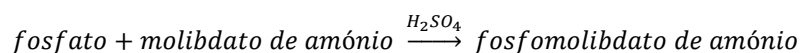
#### ➤ Fosfato

O ião fosfato está presente sobretudo no osso (88%) complexado com o cálcio e é maioritariamente intracelular (Burtis *et al.*, 2015).

No soro, o fosfato encontra-se sob a forma de fosfato inorgânico e ácido fosfórico. O ião fosfato encontra-se num equilíbrio bem definido com o cálcio numa proporção de 6:10 o que faz com que quando há um aumento deste anião (valor de referência 2.5-4.5 mg/dL) haja como consequência uma diminuição do cálcio.

Em algumas situações, ocorre hiperfosfatémia como no caso do hipoparatiroidismo, ou em casos de insuficiência renal. Em determinadas patologias há uma deficiência deste anião que se reflete em hipofosfatémia como se verifica no raquitismo, hiperparatiroidismo ou na Síndrome de *Fanconi*.

A análise laboratorial do ião fosfato, embora não sendo tão frequente neste laboratório quanto a dos restantes iões, também é realizada no módulo c-501 por medição espectrofotométrica do complexo corado de fosfomolibdato de amónio formado através da seguinte reação:



#### ➤ Ferro

O ferro é um elemento essencial para o organismo por estar envolvido em vários processos fisiológicos importantíssimos tais como o transporte de oxigénio às células do organism (Todo Bom *et al.*, 2013).

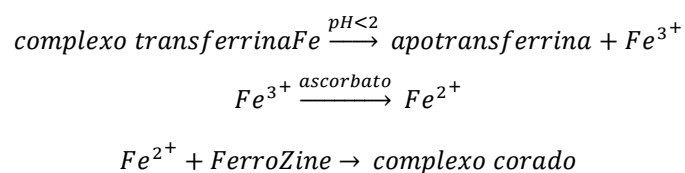
O ferro é adquirido através da alimentação maioritariamente no seu estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), é absorvido sobretudo ao nível do duodeno e passa depois para o plasma onde através de uma reação redox mediada pelo  $Cu^{2+}$  da ceruloplasmina é oxidado a ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ). Esta conversão é de extrema importância para este ião poder estabelecer ligação à

tranferrina e assim ser transportado no plasma até à medula óssea para formar a hemoglobina e ao fígado para ser armazenado sob a forma de ferritina (Burtis *et al.*, 2015).

Numa situação fisiológica, cerca de 95% do ferro sérico encontra-se ligado à transferrina, sendo que cada uma destas moléculas pode transportar dois iões  $Fe^{3+}$ . Na interpretação do resultado da determinação de ferro sérico, há que ter em conta outros parâmetros tais como os doseamentos de hemoglobina, ferritina e transferrina.

A hipersiderémia (elevada concentração de ferro sérico) pode surgir associada a patologias hepatocelulares, como a hepatite aguda e cirrose hepática, a múltiplas transfusões de sangue e a algumas anemias. Baixos teores de ferro (hiposiderémia) surgem em anemias ferropénicas, nas síndromes inflamatória e nefrótica, em mulheres grávidas ou menstruadas.

A determinação da concentração sérica do ião ferro é feita por colorimetria sendo proporcional à intensidade de cor do complexo corado formado de acordo com o seguinte esquema:



#### 2.1.4. Lípidos plasmáticos

##### ➤ Colesterol

O colesterol é o principal esteróide do organismo, é sintetizado a partir da acetil-CoA em vários tecidos, mas sobretudo ao nível do fígado e da parede intestinal. Cerca de 90% do colesterol é sintetizado pelo organismo e apenas 20% tem origem na alimentação (Burtis *et al.*, 2015). A sua síntese é regulada pela concentração de colesterol intracelular e pelas hormonas glucagon e insulina – a insulina estimula a síntese de colesterol e o glucagon tem o efeito contrário (Rodwell *et al.*, 2015).

A sua função biológica está ligada à manutenção da estrutura e regulação da fluidez membranar, é precursor de diversas hormonas esteróides, como a testosterona e a vitamina D (Rodwell *et al.*, 2015), é um componente essencial das bainhas de mielina no sistema nervoso central e periférico e é ainda de extrema importância na síntese dos ácidos biliares que permitem a digestão de lípidos.

Praticamente todo o colesterol no intestino está presente na forma não-esterificada e apresenta um certo comportamento anfipático, aspecto importante para a sua absorção no intestino, já que é nesta forma que é incorporado em micelas mistas contendo ácidos gordos, monogliceróis, fosfolípidios e ácidos biliares. Assim, o colesterol já consegue atravessar a barreira intestinal e ser incorporado nos quilomícrons e assim chegar ao sistema linfático juntamente com os triglicerídeos da dieta e posteriormente ao sangue sendo estas lipoproteínas rapidamente catabolizadas, em particular, nos capilares do tecido adiposo.

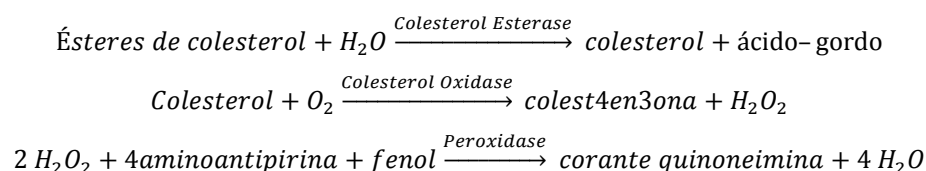
No plasma de um indivíduo saudável, em jejum, o colesterol está incorporado maioritariamente nas LDL, seguindo-se nas HDL e nas VLDL.

As LDL são lipoproteínas derivadas das VLDL, que apresentam baixa densidade graças à sua constituição rica em triglicerídeos, sendo elas que transportam o colesterol do fígado para os tecidos extra-hepáticos. Estas lipoproteínas têm um papel fulcral na formação e desenvolvimento de aterosclerose e de doença coronária já que quando se acumulam no plasma permanecem aí durante longos períodos e acumulam-se também na íntima das artérias tornando-se-se aterogénicas (Hurt-Camejo, E., Camejo, G., 2018).

As HDL por sua vez são lipoproteínas de alta densidade, mais ricas em colesterol e menos em triglicerídeos e têm especial importância no transporte reverso do colesterol dos tecidos até ao fígado onde posteriormente é convertido nos seus catabolitos, nomeadamente nos sais biliares. É importante fazer a monitorização do colesterol HDL no soro, sendo recomendado um valor >40 mg/dL, já que representa um fator de proteção para a aterosclerose (Burtis et al., 2015).

Neste laboratório, a análise de lípidos é uma das mais frequentes sendo que as determinações mais solicitadas incluem: concentração sérica de colesterol total, concentração sérica dos triglicéridos e concentração sérica de colesterol-HDL.

A determinação sérica do colesterol total é realizada por método colorimétrico e enzimático sendo a intensidade da cor do composto formado, na reação que se segue diretamente proporcional à sua concentração:



Por sua vez a avaliação da concentração sérica de colesterol HDL é realizada pela mesma metodologia, após separação das HDL das outras lipoproteínas. As LDL, VLDL e os quilomícrons são combinados com polianíons formando complexos inertes que deixam



apenas livres as partículas de colesterol HDL para que estas possam reagir com a colesterol esterase e com a colesterol oxidase, que através das reações a cima descritas, dão origem a um composto corado, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à sua concentração.

A determinação do colesterol-LDL faz-se habitualmente por cálculo, recorrendo à equação de *Friedwald* a seguir apresentada.

$$\text{Colesterol-LDL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol-VLDL} - \text{colesterol-HDL}$$

$$\text{Colesterol-LDL} = \text{colesterol total} - \frac{[\text{triglicerídeos}]}{5} - \text{colesterol-HDL}$$

Esta determinação só é válida para concentrações séricas de triglicéridos inferiores a 400 mg/dL.

Neste cálculo assume-se que em condições fisiológicas, o colesterol-VLDL é 1/5 da concentração sérica dos triglicerídeos. No caso do equipamento Cobas 6000<sup>®</sup> a unidade c-501 já se encontra programada para fazer a sua determinação laboratorial sempre que os valores de triglicerídeos atingem os 350 mg/dL. A quantificação do colesterol-LDL é feita pelo método atrás referido para a determinação do colesterol total e HDL, após serem bloqueadas as VLDL, HDL e quilomícrons por intermédio de um surfactante seletivo, ficando apenas o colesterol-LDL solúvel e em condições de reagir com a colesterol esterase e colesterol oxidase e dando origem a um composto corado, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração plasmática de colesterol-LDL.

### ➤ Triglicerídeos

Os Triglicerídeos são ésteres constituídos por glicerol e três ácidos gordos maioritariamente de cadeia longa. À semelhança do que acontece com o colesterol, também os triglicéridos derivam em parte da alimentação, mas principalmente da síntese no fígado e no tecido adiposo.

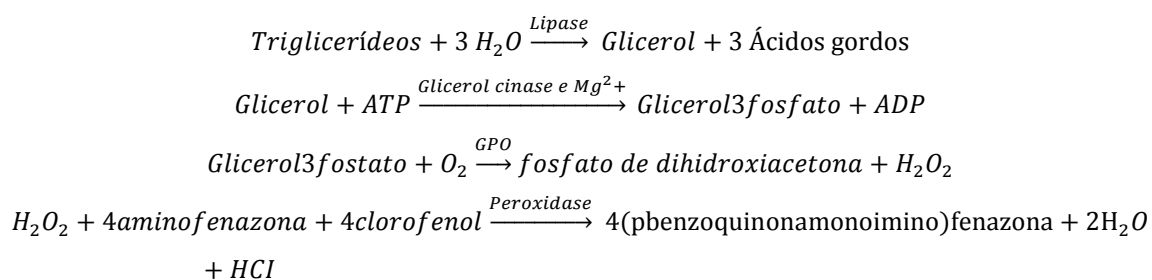
Os triglicerídeos obtidos na alimentação são absorvidos no intestino e transportados sob a forma de quilomícrons que têm na sua composição 90% de triglicerídeos. Estes quilomícrons são transportados na linfa, entram em circulação geral e ativam a lipoproteína lípase (LPL) que, por sua vez, catalisa a hidrólise dos triglicerídeos a ácidos gordos de monoacilglicerois que, são captados essencialmente pelas células do tecido adiposo para armazenamento energético.

Os quilomícrons resultantes da ação da LPL (remanescentes) são facilmente capturados pelo fígado, endocitados, e utilizados para a síntese de triglicerídeos e outros lípidos, posteriormente incorporados nas VLDL (Burtis *et al.*, 2015).

A concentração plasmática de triglicerídeos é normalmente baixa (<150 mg/dL) estando a hipertrigliceridemia associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e outras patologias como a pancreatite. O aumento deste parâmetro pode surgir em consequência de uma dieta rica em gorduras e hidratos de carbono ou estar associado a doenças como a diabetes ou a hábitos sedentários. Por esta razão, a determinação dos triglicerídeos é utilizada no controlo do tratamento de doentes com DM, obstrução hepática e alterações no metabolismo dos lípidos.

A determinação deste parâmetro deve ser feita após um jejum de doze horas, já que a concentração dos triglicéridos no soro varia muito facilmente em função das refeições efetuadas antes da colheita. Em casos de excessiva hipertrigliceridemia, o soro torna-se turvo (análise macroscópica) e de acordo com o índice de soro calculado (que avalia o grau de hemólise, lipémia e íctericia da amostra) assim se validam os resultados não afetados. Como o grau de lipémia poderá interferir com a determinação de outros parâmetros (transaminases, por exemplo), quando tal se verifica a validação segue com essa informação.

A determinação da concentração de triglicerídeos no soro é realizada através de ensaio colorimétrico enzimático, segundo o esquema abaixo indicado:



A quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formado por oxidação do glicerol-3-fosfato, através da medida da absorvância da fenazona formada, é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos

### 2.1.5. Avaliação laboratorial da diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* (DM) faz parte de um grupo de distúrbios metabólicos do metabolismo dos hidratos de carbono no qual a glicose é subutilizada dando origem a quadros de hiperglicémia. A progressão desta patologia pode trazer complicações graves

para o doente como retinopatias, disfunção renal, neuropatia e aterosclerose que pode culminar em doença arterial coronária. Comumente classificamos a diabetes em DM tipo 1 e DM tipo 2.

A primeira representa apenas 5% a 10% dos indivíduos com diabetes e surge normalmente na infância associada a sintomas como a poliúria, polidipsia e perda de peso. Estes indivíduos apresentam uma insuficiência grave de insulina resultante da perda de células  $\beta$ -pancreáticas (normalmente de origem autoimune), estando assim dependentes de tratamento com insulina exógena para se manterem em boas condições fisiológicas e afastados de quadros de cetoacidose (Burtis *et al.*, 2015).

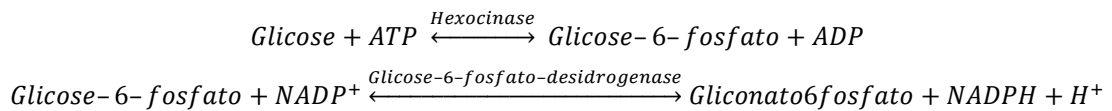
A diabetes *mellitus* tipo 2 é a forma mais comum desta patologia, apresentada por cerca de 90% dos doentes diabéticos, surge normalmente após os 40 anos de idade e está muitas vezes associada a quadros de obesidade. Estes indivíduos são praticamente assintomáticos e não se apresentam insulino dependentes já que os seus valores de insulina podem estar normais ou até aumentados e a hiperglicémia surge como consequência de uma resistência generalizada das células à entrada da glicose (Todo Bom *et al.*, 2013).

Existem ainda outras formas menos frequentes da diabetes como é o caso da diabetes gestacional provocada por uma intolerância variável à glicose durante a gravidez em mães perfeitamente saudáveis. Estas grávidas quando diagnosticadas têm de ser monitorizadas durante toda a gravidez bem como no pós-parto, já que há um risco aumentado de virem a desenvolver diabetes tipo 2 (Burtis *et al.*, 2015).

Em termos laboratoriais, atualmente, há um conjunto de análises essenciais ao diagnóstico e monitorização da terapêutica da diabetes onde se incluem a determinação da glicémia e a prova da tolerância à glicose oral (PTGO), o doseamento de hemoglobina glicada ( $HbA_{1c}$ ) e a microalbuminúria.

#### ➤ Glicémia e prova de tolerância à glicose

A avaliação da glicémia é sempre realizada após jejum de 8 a 12h, é utilizada como teste de *screening* da diabetes *mellitus*, embora não seja suficiente para fazer diagnóstico (Todo Bom *et al.*, 2013). Laboratorialmente, a determinação da glicémia é feita por método enzimático. A reação é catalisada pela hexocinase e a taxa de formação de NADPH numa segunda reação é diretamente proporcional à concentração de glicose plasmática, conforme o esquema abaixo indicado:



Durante o estágio realizado tive contacto com uma situação que me alertou para a necessidade de me manter desperta para situações comuns que diariamente podem afetar a qualidade com que trabalhamos em laboratório: um indivíduo, do sexo masculino, com 68 anos e descrito como diabético tipo 2, insulino dependente, apresentou uma HbA<sub>1c</sub> de 7.1% e um valor de glicémia de 48 mg/dL. Perante este valor de glicémia tão diminuído pensei tratar-se de um erro na pipetagem da amostra (ainda que o equipamento não tivesse dado alerta nesse sentido, como é habitual) e na repetição da análise obtive um valor de 47 mg/dL. Perante este resultado, e após a sua confirmação, comunicámos com o utente no sentido de perceber como se sentia e para confirmar se se encontrava em jejum no momento da colheita, ao que o indivíduo respondeu que sim, que se encontrava bem, e que estava em jejum no ato da colheita, apenas tinha tomado a sua dose habitual de insulina. Após este esclarecimento ficou explicada a causa da hipoglicémia tão acentuada naquele doente e foi pedida nova colheita, desta vez em jejum e sem tomar qualquer medicação.

Quando a glicémia em jejum deixa dúvidas ao médico quanto ao diagnóstico de diabetes, este prescreve a PTGO, que consiste no doseamento da glicose em jejum seguida da ingestão de uma sobrecarga oral de 75 g de glicose e uma nova determinação passadas duas horas da sua ingestão. A única exceção para esta prova é na população das grávidas em que de acordo com a Direção Geral de Saúde são feitos três doseamentos: em jejum, uma hora e duas horas após a ingestão da glicose.

Para indivíduos sem histórico recente de glicémia, aos quais é prescrita esta prova, deve-se fazer o doseamento em jejum antes da sua realização. Se o valor da glicémia obtido for superior a 150 mg/dL é necessário contactar o médico, sendo que, geralmente, a prova não é realizada.

O diagnóstico de diabetes *mellitus* é feito de acordo com a norma 09 de 2002 da Direção Geral de Saúde (Norma da Direção Geral de Saúde, 2011), com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

- a) Glicémia em jejum  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7,0$  mmol/l);
- b) Sintomas clássicos + glicémia ocasional  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l);
- c) Glicémia  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l) às 2 horas, na PTGO com 75 g de glicose;
- d) Hemoglobina glicada A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)  $\geq 6,5\%$ .

Quanto ao diagnóstico da diabetes gestacional, faz-se com base nos seguintes valores para plasma venoso:

a) Glicémia em jejum, a realizar na primeira consulta de gravidez,  $\geq 92$  mg/dl e  $< 126$  mg/dl (ou  $\geq 5,1$  e  $< 7,0$  mmol/l);

b) Se a glicémia em jejum for  $< 92$  mg/dl, realiza-se uma PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. Nesta prova, é critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores:

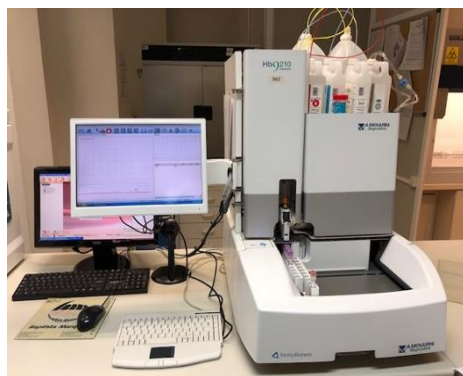
- i) em jejum, glicémia  $\geq 92$  mg/dl (ou  $\geq 5,1$  mmol/l);
- ii) à 1 hora, glicémia  $\geq 180$  mg/dl (ou  $\geq 10,0$  mmol/l);
- iii) às 2 horas, glicémia  $\geq 153$  mg/dl (ou  $\geq 8,5$  mmol/l).

#### ➤ Hemoglobina A<sub>1C</sub>

A glicose forma uma ligação irreversível com a hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos dando origem à chamada hemoglobina glicada. A forma, resultante da glicação do resíduo de valina da cadeia  $\beta$  é a hemoglobina glicada A<sub>1C</sub> (HbA<sub>1C</sub>). A sua concentração está dependente da concentração de glicose sanguínea e do tempo de vida média dos eritrócitos (120 dias). A quantificação da HbA<sub>1C</sub> trouxe grande melhoria no diagnóstico e na monitorização terapêutica de doentes com DM já que os seus valores não são afetados por flutuações diárias da glicémia nem pelo exercício físico recente ou ingestão de alimentos (Netto *et al.*, 2009).

A sua interpretação terapêutica terá de ter em conta a outras co-morbilidades que o doente possa apresentar e que afetem a vida média do eritrócito, por exemplo, doentes diabéticos com doença hemolítica apresentam uma redução substancial da sua HbA<sub>1C</sub> (Burtis *et al.*, 2015).

No Laboratório Chau a determinação da HbA<sub>1C</sub> é feita no equipamento Hb9210 da A. Menarini diagnostics (Fig.6) pela técnica de afinidade ao boronato associada ao HPLC. Sucintamente este equipamento possui uma coluna que contém no seu interior ácido aminofenilborónico adsorvido a gel polimérico, após a injeção da amostra para a coluna (previamente hemolisada no equipamento), e tendo em conta que o ácido aminofenilborónico apresenta



**Figura 6:** Autoanalisador Hb9210 da A. Menarini para quantificação de HbA<sub>1C</sub>.

afinidade para os componentes glicosados da hemoglobina, vai estabelecer-se a ligação da HbA<sub>1c</sub> à coluna sendo a restante amostra não ligada (HbA<sub>0</sub>) eluída por um primeiro reagente. Um segundo reagente quebra a ligação estabelecida entre a HbA<sub>1c</sub> e o ácido aminofenilborónico fazendo-a passar posteriormente pelo espectrofotómetro onde é lida e quantificada a um comprimento de onda de 413 nm.

➤ **Proteinúria e microalbuminúria**

O doseamento de albuminúria ou, de forma mais abrangente, de proteinúria na urina ocasional ou em urina de 24h, é utilizada laboratorialmente para avaliação da função renal sobretudo em doentes com DM. A determinação da excreção urinária de proteínas totais, em particular, da albumina é muito útil na deteção precoce de doença renal crónica (DRC) (Vallada, 1993).

Atualmente, a análise mais utilizada para avaliação precoce da permeabilidade renal é a microalbuminúria pela elevada sensibilidade que apresenta em comparação com a proteinúria das 24h. Valores aumentados de microalbuminúria devem-se a alterações estruturais no glomérulo renal que se traduzem numa diminuição da capacidade funcional da barreira glomerular renal, sendo utilizada para diagnóstico de nefropatia diabética. Valores aumentados de microalbuminúria estão ainda associados a elevado risco cardiovascular (considera-se existir microalbuminúria quando a taxa de excreção urinária de albumina tiver valores >20 mg/24h e <300 mg/24h) (Sodré *et al.*, 2007). Casos de sépsis ou doenças inflamatórias como a artrite reumatóide também podem surgir acompanhadas de valores aumentados de microalbuminúria. No entanto, para além da DM, a causa mais comum deste aumento é a hipertensão arterial, verificando-se em cerca de 25% destes doentes.

A determinação da microalbuminúria é realizada através de ensaio imunoturbidimétrico, após prévia centrifugação da amostra, através de uma reação imunoquímica de anticorpo anti-albumina. Quanto maior a turvação da amostra maior é a concentração de albumina na urina. Para uma amostra de urina de 24h, a sua determinação faz-se através da seguinte fórmula:

$$\text{Microalbuminúria (mg/24h)} = \text{Microalbuminúria (mg/L)} \times \text{Volume urinário de 24h (L)}$$

## 2.1.6. Proteínas

### ➤ Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é a proteína de fase aguda mais sensível e de maior expressão sérica, é produzida em grande parte pelo fígado, mas também, ainda que em pequena quantidade, por monócitos e macrófagos em resposta à estimulação por interleucina-1 e interleucina-6 (Todo Bom *et al.*, 2013). Surge aumentada no plasma (valor de referência <0.5 mg/dL) após enfarte do miocárdio, trauma, infecção, inflamação ou proliferação neoplásica e dada a sua baixa concentração plasmática, a quantificação é feita por ensaio imunoturbidimétrico.

A PCR tem a capacidade de ativar a via clássica do complemento tornando-se capaz de iniciar opsonização, fagocitose e lise de vírus e bactérias, é ainda capaz de reconhecer substâncias autógenas, libertadas por tecidos danificados, e eliminá-las da circulação.

A determinação da concentração da PCR é utilizada para detetar processos inflamatórios sistêmicos (colite ulcerosa por exemplo), avaliar a resposta ao tratamento de infecções bacterianas e monitorizar terapêuticamente doenças reumáticas tratadas com anti-inflamatórios (Burtis *et al.*, 2015).

Esta medição é ainda muito importante na avaliação do processo aterosclerótico e do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos aparentemente saudáveis. Contudo, esta proteína não é específica de nenhum processo inflamatório e por isso a sua interpretação deve ocorrer sempre em paralelo com a história clínica do paciente.

### ➤ Proteinémia total

As proteínas plasmáticas são macromoléculas de extrema importância no nosso organismo já que desempenham funções que variam desde o transporte de substâncias essenciais insolúveis a funções de defesa do organismo. As proteínas são sintetizadas essencialmente no fígado mas também nas células plasmáticas, gânglios linfáticos, baço e medula óssea, sendo grosseiramente divididas em albumina e globulinas (alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 e gama) (Burtis *et al.*, 2015).

Em algumas patologias podem ocorrer alterações nas concentrações das proteínas totais que, no adulto, devem estar compreendidas entre 6.6-8.7 g/dL, bem como variações acentuadas das percentagens das várias frações electroforéticas. A hipoproteinémia (baixa concentração de proteínas plasmáticas) pode ocorrer em casos de hemodiluição, síndrome

nefrótica ou ainda devido a doença hepática ou intestinal. Contrariamente, em patologias como o mieloma múltiplo ocorre hiperproteinémia devido ao aumento de uma das frações isoladamente (fração das gamaglobulinas), sendo também bastante frequente em situações de desidratação grave resultantes de crises diarreicas ou vômito (Todo Bom *et al.*, 2013).

A quantificação sérica das proteínas totais é obtida por ensaio colorimétrico, pelo método do biureto, baseada na reação das ligações peptídicas com o cobre em meio alcalino. A absorvância do complexo corado formado é uma função direta da concentração da proteína.

#### ➤ Albumina sérica

A albumina, sintetizada pelas células do parênquima hepático, é a proteína mais abundante no plasma do Homem adulto, correspondendo a 55-65% da massa das proteínas plasmáticas totais. É responsável pela regulação da pressão oncótica do plasma e pelo transporte de um grande número de ligandos, tais como a bilirrubina, o cálcio e ácidos gordos graças à sua elevada solubilidade em água (Burtis *et al.*, 2015). Além de todas as funções fisiológicas já referidas, a albumina é ainda responsável pela eliminação de iões tóxicos do organismo à semelhança do que acontece com os fármacos.

O excesso de albumina (hiperalbuminémia) não tem grande significado clínico a não ser em casos de desidratação. A depleção de albumina (hipoalbuminémia) ocorre em várias patologias, quer como consequência de doença hepática, por défice de síntese ou ainda por perda em casos de lesões tecidulares como acontece com queimaduras graves. Pode ocorrer também por perda excessiva através das fezes, o que geralmente se deve a neoplasias e também na urina por alteração da permeabilidade glomerular, como acontece por exemplo na síndrome nefrótica ou por perda de capacidade de reabsorção tubular como acontece em alguns casos de nefrotoxicidade.

A quantificação laboratorial da albumina é feita por ensaio colorimétrico, a pH ácido, de modo a manter a albumina com carácter catiónico de modo a poder ligar-se ao verde de bromocresol (BCG), um corante aniónico, formando um complexo azul-esverdeado cuja intensidade de cor, medida fotometricamente, é proporcional à concentração desta proteína na amostra.



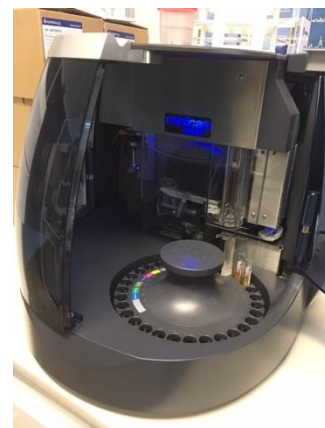


➤ Eletroforese de proteínas

A análise eletroforética das proteínas séricas, em conjunto com outros parâmetros já abordados ao longo deste relatório, pode ajudar na correta avaliação do estado clínico do paciente. Esta análise permite a avaliação de alterações das proteínas séricas, tal como acontece em casos de mieloma múltiplo ou em algumas hepatopatias.

A eletroforese das proteínas baseia-se no facto das proteínas séricas, a pH alcalino, ficarem com diferentes densidades de carga negativa e, por isso, migrarem a diferentes velocidades quando sujeitas a um campo elétrico.

No Laboratório Chau esta análise é feita no equipamento automático *Minicap<sup>®</sup> da Sebia<sup>™</sup>* (Fig.7) que utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre. As moléculas de proteína ficam carregadas usando uma solução tampão com pH alcalino, através do qual as proteínas adquirem carga negativa migrando do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo) a velocidades diferentes já que a densidade de carga elétrica da proteína vai depender dos aminoácidos que a constituem e da ordem em que se encontram nas cadeias peptídicas. Assim, as moléculas carregadas são separadas em

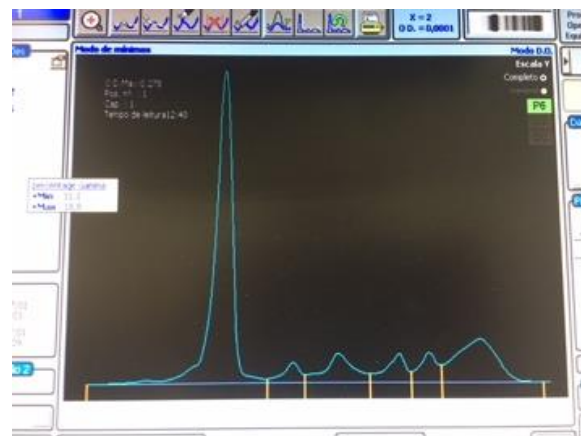


**Figura 7:** Equipamento Minicap da Sebia.

função da sua mobilidade eletroforética num regulador de alcalinidade e com um pH específico. A separação das proteínas é realizada através de uma corrente de alta-voltagem obtendo-se um traçado eletroforético em que a concentração de cada fração específica é determinada tendo em conta a concentração da proteína total no soro, determinação feita previamente à eletroforese no módulo c-501 da cadeia de analisadores automáticos da Roche<sup>™</sup>.

O perfil eletroforético das proteínas séricas no Homem é composto por seis bandas: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina e gamaglobulinas.

Através da avaliação do traçado eletroforético (Fig.8) é possível retirar conclusões no que toca por exemplo à homogeneidade proteica das bandas já que



**Figura 8:** Traçado eletroforético normal de soro humano.

esta é diretamente proporcional à área de cada uma, assim sendo, quanto mais larga for a banda, mais heterogeneidade proteica existe.

Após a migração, a primeira banda a surgir mais próxima do ânodo corresponde à albumina que é a proteína mais abundante no soro de indivíduos saudáveis representando cerca de 65% das proteínas totais, apresentando por isso o pico mais elevado. A segunda banda do traçado, correspondente à fração  $\alpha$ 1-globulinas, é bastante heterogênea e engloba várias proteínas plasmáticas com mobilidade eletroforética semelhante, com destaque para a alfa-1-antitripsina que constitui cerca de 90% desta fração. Imediatamente a seguir surge a banda correspondente às  $\alpha$ 2-globulinas, onde estão incluídas a alfa-2-globulina, haptoglobulina, macroglobulina e ceruloplasmina. Com uma mobilidade menor surgem as bandas das  $\beta$ -globulinas,  $\beta$ 1-globulina e  $\beta$ 2-globulina, onde se incluem as LDL, transferrina, proteínas do complemento como o C3, beta-2-microglobulina e a antitrombina. A última banda do traçado corresponde às  $\gamma$ -globulinas onde se incluem todas as imunoglobulinas, principalmente as IgG, IgA e IgM (Burtis *et al.*, 2015).

Em determinadas situações, como por exemplo em quadros de infecção, o nosso organismo pode apresentar pequenas oscilações em termos de traçado eletroforético, principalmente no que respeita à banda das imunoglobulinas. Em situações fisiológicas normais, num quadro como este, vai haver uma expansão policlonal destas proteínas o que implica uma banda maior em termos de elevação, comparativamente com as restantes, mas também mais larga. Em casos de malignidade poderá ocorrer a expansão de uma linha celular isoladamente, ou seja, aquilo a que chamamos vulgarmente de expansão monoclonal que em termos de traçado eletroforético se manifesta como uma elevação única e estreita da banda das gamaglobulinas, o que acontece muitas vezes em casos de mieloma múltiplo, como representado no traçado 1 da Figura 9 (Todo Bom *et al.*, 2013).



**Figura 9:** 1 - Traçado eletroforético das proteínas séricas com aumento monoclonal da fração das gamaglobulinas. 2 - Traçado eletroforético das proteínas séricas sem alterações.

## 2.1.7. Enzimas

### ➤ Creatina cinase

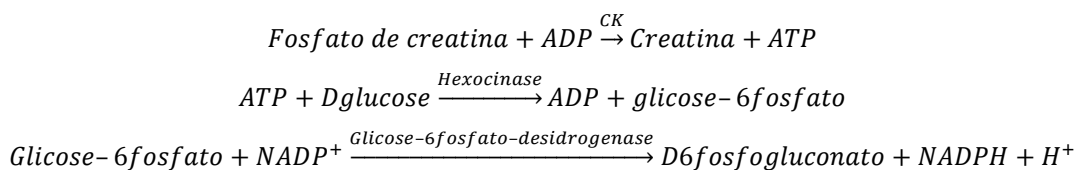
A creatina cinase (CK) é a enzima que catalisa a reação de conversão da creatina a fosfocreatina. A fosfocreatina serve de reserva energética em células com elevada atividade metabólica, como as células musculares e cerebrais (Todo Bom *et al.*, 2013).

A CK é um dímero composto por duas subunidades que derivam do músculo (subunidade M) ou do cérebro (subunidade B), podendo ser encontrada sob a forma de três isoenzimas: MM, MB ou BB sendo a MM a mais prevalente a nível sérico (97%).

Valores aumentados de CK-MM estão normalmente associados a patologias músculo-esqueléticas que originam distrofia muscular como acontece com a rbdomiólise, mas também pode ocorrer em pacientes que tenham sofrido queimaduras, acidentes ou alguma situação que induza destruição muscular. A fração CK-MB encontra-se principalmente no músculo cardíaco e tem um carácter de diagnóstico muito importante já que surge aumentada no soro, dez a vinte vezes o normal (<25 U/L), nas primeiras 12/20h que se seguem a um enfarte do miocárdio (Todo Bom *et al.*, 2013).

A atividade sérica da CK-BB encontra-se aumentada em situações de isquémia cerebral, doença vascular cerebral aguda e em situações de traumatismo craniano.

A avaliação laboratorial da atividade da CK é feita por espectrofotometria no UV, de acordo com as reações a baixo indicadas (Burtis *et al.*, 2015), sendo o aumento da absorvância a 340 nm diretamente proporcional à atividade da enzima:



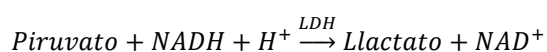
### ➤ Lactato-desidrogenase

A enzima lactato-desidrogenase (LDH) encontra-se em vários tecidos mas principalmente no fígado, músculo e rim, sendo a sua principal funcionalidade a interconversão de lactato a piruvato.

Existem cinco isoenzimas da LDH, cada uma delas é um tetrâmero composto por duas subunidades diferentes (subunidade M e subunidade H). A atividade desta enzima

encontra-se aumentada em situações clínicas, como o enfarte do miocárdio, hemólise, patologia hepática, patologia renal, pulmonar ou muscular (Burtis *et al.*, 2015).

Atividades séricas elevadas de LDH são muito comuns, embora não específicas. Em patologias como a anemia megaloblástica, chega a atingir valores cinquenta vezes superiores aos valores de referência (240-480 U/L). Valores aumentados de LDH também se verificam em casos de enfarte do miocárdio, carcinomas e leucemias. Quando o aumento é mais moderado poderá estar relacionado com quadros de hepatite (valores dez vezes superiores ao valor de referência) ou com distrofias musculares (Burtis *et al.*, 2015). A sua determinação laboratorial baseia-se no decréscimo da absorvância a 340 nm, devido à oxidação do NADH na reação de redução do piruvato a lactato catalisada pela LDH, de acordo com a reação:



Tendo em conta que esta enzima está em muito maior concentração no meio intracelular do que no meio extracelular é sempre necessário confirmar que as amostras em que surge aumentada não se encontram hemolisadas, caso assim aconteça, há necessidade de ser realizada nova colheita.

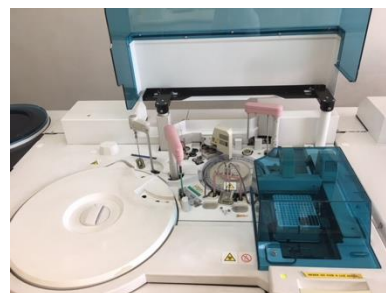
## 2.2. Setor da Imunologia Clínica

Neste setor, à semelhança do que acontece no setor da bioquímica, a principal amostra utilizada para os doseamentos a efetuar é o soro, embora o plasma possa também ser utilizado em grande parte das situações.

No Laboratório Chau, o sector da imunologia é responsável pela determinação de parâmetros analíticos destinados ao controlo de anemias, à avaliação do metabolismo ósseo, ao doseamento de hormonas, à imunoserologia vírica e ainda à determinação de alguns marcadores tumorais.

Como já referido, o setor da imunologia neste laboratório encontra-se fisicamente muito próximo do de bioquímica já que a cadeia de autoanalisadores que utilizam é comum, sendo os doseamentos referidos realizados no módulo 601 do Cobas6000® da Roche Diagnostics (Fig.10). Este autoanalisador permite a avaliação imunoquímica de até 100 parâmetros/h.

Os métodos de ensaio utilizados neste setor têm por base reações muito específicas entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) e são muito fiáveis devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. Neste equipamento, os testes de imunológica estão divididos em ensaios de electroquimioluminescência competitivos e ensaios de electroquimioluminescência não competitivos (*Sandwich*). Este tipo de ensaio tem por base a determinação da quimioluminescência produzida durante reações químicas que têm como substrato substâncias capazes de emitir luz, sendo a luz emitida detetada por um quimioluminómetro. O limite de deteção desta técnica é cerca de dez vezes superior ao limite de deteção dos ensaios clássicos de ELISA, apresentando uma sensibilidade muito superior (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2008).



**Figura 10:** Subunidades 601 do Cobas 6000®.

Os imunoensaios de electroquimioluminescência competitivos são utilizados para determinação de analitos de massa molecular muito reduzida, tais como a tiroxina livre e a triiodotironina livre. Estes imunoensaios eletroquimioluminescentes utilizam micropartículas magnéticas que permitem a separação de frações ligadas e livres utilizando um eléctrodo.

Os imunoensaios de electroquimioluminescência não competitivos ou em *Sandwich* são utilizados para avaliar partículas de maiores dimensões, como acontece com o antígeno específico prostático (PSA). Neste tipo de ensaio, são utilizados anticorpos primários monoclonais biotinilados específicos para o analito a pesquisar, estes anticorpos encontram-se imobilizados em micropartículas magnéticas revestidas com estreptavidina que se ligam a complexos de ag-ac secundário marcados com ruténio formando uma estrutura em "sandwich". A ligação entre a estreptavidina e o ruténio permite a adesão das micropartículas a uma fase sólida (eléctrodo) que pela passagem de corrente eléctrica induz a emissão quimioluminescente que é medida pelo fotomultiplicador (Zhuo Y. *et al.*, 2018).

### 2.2.1. Parâmetros analíticos no controlo de anemias

#### ➤ Ferritina

A ferritina é uma macromolécula de elevado peso molecular constituída por um invólucro proteico (apoferritina) e um núcleo que pode chegar a incluir 2500 iões de ferro

no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), representa assim a maior reserva de ferro do nosso organismo. Encontra-se sobretudo ao nível do sistema reticuloendotelial das células do fígado, baço e medula óssea já que são estes os órgãos chave no percurso da linha eritroide. A principal função desta molécula é reter em si os iões de ferro, impedindo que fiquem livres, tóxicos para as células e simultaneamente ser uma fonte de mobilização rápida do ferro para a produção da hemoglobina (Burtis *et al.*, 2015).

Existem várias isoformas da ferritina destacando-se as isoformas básicas que têm função de armazenamento a longo prazo e estão sobretudo no fígado, baço e medula óssea. As isoformas ácidas encontram-se sobretudo ao nível do tecido miocárdico, placentário e tumoral e funcionam essencialmente como intermediárias de transmissão do ferro para várias sínteses metabólicas.

A determinação da ferritina sérica, obtida por ensaio não competitivo, é utilizada para a avaliação das reservas de ferro no organismo e permite detetar situações de défice de reservas muito antes de se verificarem alterações no hemograma. Valores diminuídos estão associados a anemias hipocrómicas e microcíticas sendo que aquando da validação nos deparamos com valores diminuídos de ferritina a primeira preocupação é saber qual o valor da hemoglobina para perceber se a linha eritroide já está a ser comprometida. Quando surgem valores aumentados, estes podem estar associados a necrose celular, bloqueio da eritropoiese ou sobreprodução por tecidos tumorais, como acontece em situações de leucemia aguda, cancro do pulmão e do fígado.

#### ➤ Vitamina B12

A vitamina B12 é constituída por uma estrutura complexa em anel (anel corrina) que contém no interior um átomo de cobalto. Esta vitamina é adquirida exclusivamente através da alimentação em alimentos como a carne, o peixe e produtos lácteos. Serve de cofator a várias enzimas, nomeadamente à metionina sintetase (responsável pela conversão da homocisteína em metionina), sendo importante em reações de metilação, participa na oxidação dos ácidos gordos e é ainda de extrema importância do desenvolvimento e mielinização do sistema nervoso central. Valores diminuídos de vitamina B12 podem estar associados a défices de fator intrínseco em casos de gastrites originando quadros de anemia perniciosa, síndromes de mal absorção provocados por doenças inflamatórias intestinais ou em situações de défice de ingestão como acontece com o vegetarianismo rígido (Burtis *et al.*, 2015).

As principais consequências que advêm da diminuição desta vitamina é o déficit de produção de células sanguíneas por anomalia de síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), originando anemias megaloblásticas e ainda alterações da função neurológica culminando com quadros de depressão e demência. A sua determinação é feita por ensaio de electroquimioluminiscência competitivo.

#### ➤ Ácido fólico

O ácido fólico também conhecido como vitamina B9 é obtido através da alimentação estando presente sobretudo em alimentos frescos essencialmente frutos e vegetais. Os principais motivos de diminuição desta vitamina são a não ingestão e a má absorção (Todo Bom *et al.*, 2013).

O folato é importantíssimo para a síntese de DNA e regeneração da série vermelha sendo que teores plasmáticos baixos (valor de referência 3.9-26.8 µg/mL) desta vitamina vão-se repercutir em problemas hematológicos como a anemia megaloblástica, sendo por isso de suma importância a avaliação conjunta do hemograma (Burtis *et al.*, 2015).

As grávidas são uma população que requer especial acompanhamento no que respeita à avaliação dos teores séricos de ácido fólico já que este é essencial para a formação do tubo neural do feto e défices desta vitamina podem originar quadros muito graves como espinha bífida. A sua determinação à semelhança do que acontece com a vitamina B12 é feita por ensaio de electroquimioluminiscência competitivo.

### 2.2.2. Parâmetros analíticos no estudo do metabolismo ósseo

#### ➤ Vitamina D

A vitamina D é o precursor natural da vitamina 1,25-dihidroxitamina D que é uma hormona esteroide lipossolúvel. Esta hormona é produzida quando o seu precursor que se encontra na pele é exposto à luz solar, sofrendo posteriormente duas hidroxilações sucessivas ao nível do fígado e dos rins até se tornar biologicamente ativa (Burtis *et al.*, 2015).

Existem cinco isómeros da Vitamina D sendo que apenas dois apresentam maior relevância: a vitamina D2 (ergocalciferol) e a vitamina D3 (calciferol). Ao contrário da

vitamina D3, a vitamina D2 não é produzida pelo nosso organismo sendo obtida exclusivamente a partir da alimentação ou através de suplementos alimentares.

A 25-Hidroxivitamina D (forma ainda inativa) é considerada como o melhor indicador das reservas da vitamina D no corpo humano, é essencial para a saúde dos ossos já que na sua forma ativa (1,25-dihidroxivitamina D) promove a absorção de cálcio e fósforo a partir dos alimentos.

No Laboratório Chau no módulo 601 faz-se a determinação da 25-dihidroxivitamina D, por ensaio de electroquimioluminescência competitivo sendo os valores de referência dados da seguinte forma: deficiência em vitamina D (<20.00 µg/mL), insuficiência de vitamina D (21-29 µg/mL) e valor recomendado (>30.00 µg/mL). Valores diminuídos de vitamina D estão associados a fraqueza muscular, hiperparatiroidismo secundário e perda de massa óssea, que em idades precoces pode conduzir a malformações ósseas como por exemplo o raquitismo.

### 2.2.3. Marcadores tumorais

#### ➤ Antígeno específico da próstata

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína que apresenta atividade proteolítica importante na liquefação do coágulo seminal, é produzido quase em exclusivo pelas células epiteliais dos ácinos e ductos da glândula prostática (Burtis *et al.*, 2015). Pode encontrar-se sob duas formas: complexado com proteínas como a  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina ou a alfa-2 macroglobulina, que inibem a sua atividade proteolítica, ou na sua forma livre (PSA Livre) (Burtis *et al.*, 2015).

O PSA sendo produzido pelo epitélio secretor da próstata encontra-se elevado em situações de prostatite, hiperplasia benigna da próstata (HBP) e carcinoma prostático.

A determinação deste antígeno implica a necessidade prévia da certificação de que o utente cumpre os requisitos para poder realizar a análise, que passam por ter tido abstinência sexual nas 48h que precederam a análise e por não ter feito recentemente exames de rastreio invasivos como o toque retal ou colonoscopia. Existem ainda outras condicionantes como a prática de alguns desportos, como o ciclismo ou o hipismo que podem ser violentos e dar origem a falsos resultados.

Atualmente recorre-se á determinação do PSA total (PSAT) e do PSA Livre (PSAL), através de imunoensaios em *sandwich*, para calcular um quociente (PSAL/PSAT) que traz



vantagens em termos de sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial de carcinoma da próstata em homens que se encontram na chamada “zona cinzenta”, que corresponde a valores entre 4-10 ng/ml. No entanto, o diagnóstico não pode nunca ser feito unicamente tendo por base estes parâmetros, sendo imprescindíveis outros exames de diagnóstico, tanto ecográficos como testes de palpação. Assim sendo, estas determinações são sobretudo utilizadas para monitorização de progressão da patologia e da eficiência da terapêutica em doentes com carcinoma da próstata. É de salientar que é possível a deteção do PSA mesmo em pacientes que tenham sido submetidos a prostatectomia radical, já que há uma pequena porção de PSA a ser secretado pelas glândulas para-uretrais e anais (Burtis *et al.*, 2015).

#### ➤ Antígeno carboidrato 19.9

O antígeno carboidrato 19.9 (CA 19.9) é um glicolípido de baixo peso molecular sintetizado pelas células dos ductos pancreático e biliar humanos normais e pelos epitélios gástrico, do cólon, do endométrio e salivar (Burtis *et al.*, 2015).

A determinação deste antígeno, realizada por imunoensaio de *sandwich*, é extremamente útil no diagnóstico diferencial e na monitorização de pacientes com carcinoma pancreático. A determinação do CA 19.9 não apresenta sensibilidade suficiente para fazer a deteção precoce de carcinoma pancreático, nem é possível estabelecer uma correlação entre os valores de CA 19.9 determinados no soro e o tamanho da massa tumoral. No entanto, em casos de um aumento muito acentuado (valor de referência <37 U/L) é possível presumir que possam haver metástases envolvidas no quadro clínico.

Este antígeno é ainda muito utilizado no rastreio do carcinoma hepatobiliar e do carcinoma gástrico embora neste último seja utilizada, em simultâneo, a determinação do antígeno carcinoembrionário (CEA). Patologias benignas como a colestase ligeira poderão estar associadas a valores aumentados de CA 19.9 (Burtis *et al.*, 2015).

#### ➤ Antígeno carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário é uma glicoproteína de elevado peso molecular produzida essencialmente pelo feto no período embrionário e por isso encontra-se sobretudo no soro e tubo gastrointestinal fetal. Ainda assim podem surgir pequenas quantidades associadas ao tecido intestinal, pancreático e hepático em indivíduos adultos saudáveis.

Surgem frequentemente valores mais elevados de CEA em indivíduos fumadores o que se reflete nos valores de referência para este analito já que estes valores para um não fumador são quase metade dos de um fumador (valor de referência para não fumadores <3.8 mg/dL e para fumadores <5.5 mg/dL), o que se deve ao facto do fumo do cigarro, pela sua composição tóxica, reduzir a capacidade do sistema imunitário produzir anticorpos contra este tipo de antigénios.

Os valores de CEA estão aumentados em casos de adenocarcinoma do colo-retal, não sendo a sua determinação utilizada para o diagnóstico desta patologia, mas sobretudo sobretudo para a monitorização da terapêutica em pacientes com este problema oncológico (Burtis *et al.*, 2015). Mais uma vez, devido á sua baixa sensibilidade há que ter presente que valores aumentados poderão estar relacionados com patologias de carácter benigno, tais como doenças inflamatórias intestinais, enfisema, cirroses hepáticas e pancreatites. A sua determinação é feita por ensaio de electroquimioluminiscência não competitivo.

#### 2.2.4. Função endócrina do sistema reprodutor

##### ➤ Hormona foliculoestimulante

O hipotálamo é responsável pela produção da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) que tem uma ação estimuladora sobre a hipófise que, por sua vez, induz a libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH) como falarei a seguir (Burtis *et al.*, 2015).

A FSH é uma glicoproteína produzida pela hipófise anterior sob o controlo do hipotálamo, é controlada por mecanismo de feedback negativo pelas hormonas sexuais femininas e masculinas ( $17\beta$  Estradiol e Testosterona, respetivamente). A sua principal função é estimular o crescimento e a maturação das células germinativas, dos folículos e espermatozóides (Burtis *et al.*, 2015).

O doseamento desta hormona, realizado por imunoensaio competitivo, é utilizado na mulher para avaliação da evolução do ciclo menstrual e o seu respetivo estado folicular; com a chegada da menopausa e consequente diminuição da principal hormona feminina (estradiol), o *feedback* negativo sobre a FSH deixa de se verificar e os seus valores no sangue aumentam. No homem esta determinação também é bastante útil para avaliar a espermatogénese e por consequência o estado funcional dos tubos seminíferos.

## ➤ Hormona luteinizante

A hormona luteinizante (LH) é uma glicoproteína pertencente à família das gonadotropinas, produzidas pela hipófise anterior em resposta ao estímulo hipotalâmico que em conjunto com a FSH é responsável pelo crescimento e funcionamento das gónadas femininas e masculinas.

No caso da mulher, esta hormona vai atuar ao nível dos ovários estimulando o crescimento e o amadurecimento do folículo e por consequência a libertação de estrogénios e progesterona (Burtis et al., 2015). O ciclo menstrual decorre de uma sucessão de acontecimentos bem conhecidos onde intervêm em conjunto hipotálamo-hipófise-ovários como representado no gráfico I. Quando a meio do ciclo menstrual, por estimulação hipofisária, ocorre o pico da concentração de LH, dá-se a

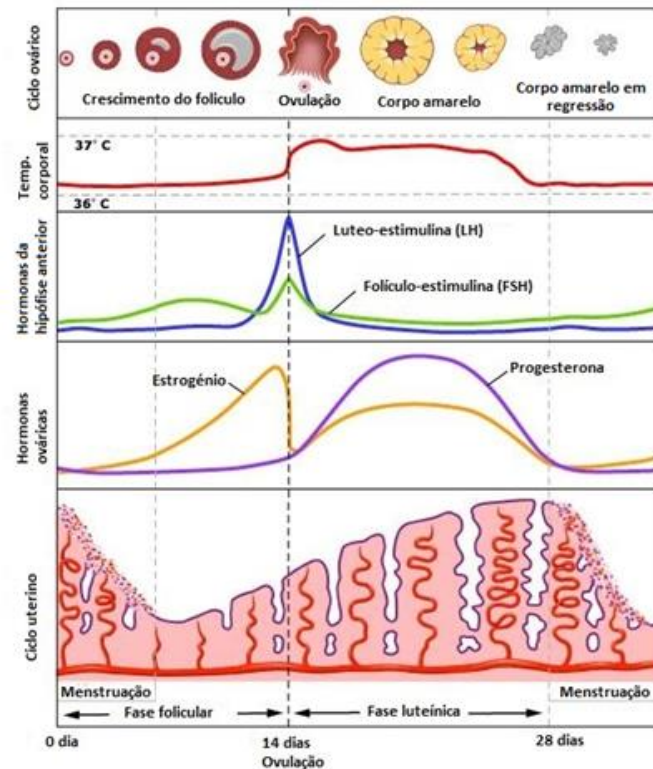


Gráfico I: Regulação hormonal do ciclo menstrual.

ovulação e forma-se o corpo lúteo a partir dos restícios foliculares que por

sua vez, será responsável pela libertação de progesterona que tem como função a preparação do endométrio para uma possível implantação do embrião (Burtis et al., 2015).

Nos homens, a LH vai atuar sobre as células de *Leydig* estimulando a produção de testosterona, hormona responsável pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos e ainda sobre os tubos seminíferos, favorecendo o amadurecimento dos espermatozóides.

A determinação da LH em conjunto com a FSH no soro serve para rastrear alterações no sistema hipotálamo-hipófise-gónadas como é o caso de infertilidade feminina devido a ovário poliquístico, por exemplo, ou alterações hormonais relacionadas com a menopausa ou com insuficiência das células de *Leydig*. No equipamento 601 a determinação da LH é feita por técnica de *sandwich* e os valores de referência, naturalmente, variam de acordo com a fase do ciclo menstrual em que a mulher se encontra à data da colheita (fase folicular, fase ovulatória, fase lútea ou pós-menopausa).

### ➤ 17-β Estradiol

Os estrogénios são produzidos maioritariamente pelos ovários e em pequenas quantidades pelos testículos e pelo cortéx supra-renal e são os responsáveis pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários femininos sendo o 17-β estradiol a hormona biologicamente mais ativa. A sua síntese está dependente da regulação pela FSH e LH e varia ao longo do ciclo menstrual, tem uma função importantíssima na manutenção dos tecidos reprodutivos femininos, mas também na mineralização óssea. Na menopausa, o decréscimo acentuado da produção de estradiol pode ter como consequência a osteoporose.

O doseamento desta hormona no soro é utilizado para avaliação de quadros de infertilidade, ginecomastia, produção de estrogénios por tumores dos ovários e testículos e é também muito utilizado para o acompanhamento da terapêutica de fertilidade e a determinação do estadio do ciclo menstrual nos casos de fertilização *in vitro*.

O seu doseamento é realizado por imunoensaio de competição, e à semelhança do que acontece com a LH as suas concentrações plasmáticas variam de acordo com o género, fisiologicamente bastante mais elevadas na mulher, e com a fase do ciclo em que a mulher se encontra na altura da colheita, mulheres grávidas apresentam variações da concentração do 17-β estradiol em função do tempo de gestação em que se encontram chegando a atingir valores >30000 pg/mL na fase final da gestação.

### ➤ Progesterona

A progesterona é uma hormona esteroide formada maioritariamente nas células do corpo lúteo e na placenta durante a gravidez. A síntese de progesterona está diretamente ligada ao desenvolvimento e regressão do corpo lúteo estando por isso sob influência da LH, e por esta razão o pico mais alto de progesterona no sangue corresponde ao dia que precede a ovulação. A sua ação sente-se sobretudo ao nível da mucosa uterina já que promove o desenvolvimento de glândulas secretoras que preparam o útero para a implantação do ovo fertilizado. Durante a gravidez a progesterona inibe a contração do miométrio e promove a proliferação de alvéolos ao nível da glândula mamária (Burtis *et al.*, 2015).

O doseamento é realizado por ensaio electroquimioluminescente competitivo e é utilizado no diagnóstico de fertilidade e para deteção da ovulação e avaliação da fase lútea.

## ➤ Prolatina

A prolactina (PRL) é uma hormona sintetizada pela hipófise anterior à semelhança da LH e FSH. Atua sobre as glândulas mamárias promovendo o seu desenvolvimento e diferenciação. Durante a gravidez, esta hormona aumenta em resposta à estimulação por estrogénios e progesterona permitindo a produção de leite materno para possibilitar o aleitamento pós-parto.

Na mulher, valores muito aumentados de PRL inibem a produção de esteroides pelos ovários e a secreção de gonadotrofinas pela hipófise e no homem inibem a produção de testosterona podendo causar impotência sexual ou ginecomastia (Burtis *et al.*, 2015). A hiperprolactinémia é a principal causa de infertilidade quer feminina quer masculina.

A determinação dos valores de prolactina é feita por imunoensaio não competitivo e é utilizada no diagnóstico de ciclos anovulatórios, avaliação de casos de amenorreia e galactorreia, ginecomastia e azoospermia. O seu doseamento pode ainda ser útil perante a suspeita de cancro da mama ou tumores hipofisários.

## ➤ Subunidade $\beta$ livre da gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ HCG)

A gonadotrofina coriónica humana (HCG) é uma glicoproteína produzida no tecido trofoblástico com a função de manutenção do corpo lúteo nas primeiras semanas de gravidez. A sua concentração aumenta exponencialmente nas primeiras 9 semanas de gestação (aproximadamente 100000 IU/L) diminuindo a partir da 10<sup>a</sup>-16<sup>a</sup> semana de gravidez até à reta final da mesma. A quantificação de HCG no sangue, que neste laboratório é feita por imunoensaio de sandwich, permite não só confirmar a gravidez como fazer uma previsão do tempo de gestação. A pesquisa de HCG também pode ser feita na urina, contudo o resultado é apenas qualitativo (Burtis *et al.*, 2015).

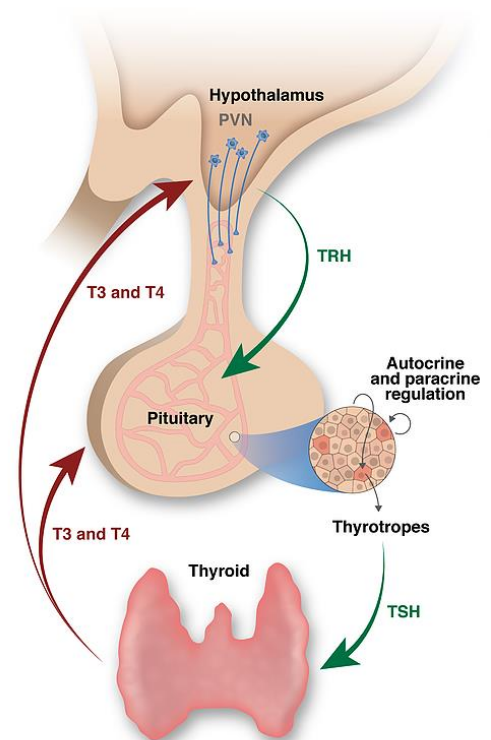
Em mulheres não grávidas poderão também surgir valores aumentados desta hormona o que poderá estar associado a tumores trofoblásticos e não trofoblásticos (tumores de células germinativas com componentes trofoblásticos). É importante que perante valores aumentados de HCG se façam exames complementares nomeadamente ecografias, de confirmação da gestação.

## 2.2.5. Função tiroideia

### ➤ Hormona estimuladora da tiroide

A hormona estimuladora da tiróide (TSH) é uma glicoproteína secretada com um ritmo circadiano pela hipófise anterior em resposta à estimulação pela hormona libertadora da hormona estimuladora da tiroide (TRH) sintetizada pelo hipotálamo (Todo Bom *et al.*, 2013).

A TSH é responsável pela regulação e proliferação da glândula da tiroide bem como pela sua secreção hormonal, estimulando a produção de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) como mostra a figura 11. Um aumento, ainda que ligeiro, de qualquer uma destas hormonas tiroideias induz imediatamente uma reação a nível hipofisário que irá conduzir a uma estimulação ou inibição da produção da TSH. Devido à esta elevada sensibilidade e especificidade o seu doseamento é muito utilizado como teste inicial de diagnóstico de patologia tiroideia (valor de referência 0.270-4.20  $\mu\text{UI}/\text{mL}$ ), surgindo aumentada em casos de hipotiroidismo primário e diminuída em situações de hipertiroidismo (Burtis *et al.*, 2015).



**Figura 11:** Regulação hipotalâmica e hipofisária da função tiroideia.

### ➤ Triiodotironina total e livre

A triiodotironina (T3) é uma hormona tiroideia sintetizada a partir da tiroglobulina, é a principal hormona responsável pelo desenvolvimento dos efeitos das hormonas da tiroide nos seus órgãos alvo e em conjunto com a T4 regula a taxa metabólica do sistema cardiovascular e do sistema nervoso, influencia o crescimento e o metabolismo ósseo bem como o desenvolvimento gonadal.

Apenas uma pequena parte da T3 é produzida pela tiróide sendo que a grande maioria da sua síntese ocorre no fígado por desiodinação da T4 e por esta razão as concentrações desta hormona no soro (normalidade 60-181 ng/dL) refletem mais o que se passa a nível periférico do que ao nível da tiroide.

Cerca de 99% da totalidade da T3 encontra-se ligada a proteínas de transporte e apenas 1% na sua forma livre (FT3) sendo que apenas esta última é biologicamente ativa. A diminuição da T3 pode ocorrer por deficiência na sua formação a partir da T4, o que pode ser induzido por medicamentos ou por situações clínicas de hipotireoidismo (Burtis et al., 2015). O doseamento da T3 é utilizado sobretudo no diagnóstico e na monitorização de situações de hipertireoidismo em que os doentes apresentam um valor diminuído de TSH (valor de referência 0.27-4.20  $\mu$ UI/mL), mas normal de FT4 (valor de referência 12.00-22.00 pmol/L). Contudo, em termos genéricos, a determinação da FT3 é mais sensível na avaliação do estado funcional da tireóide já que não está dependente de alterações nas concentrações plasmáticas e de fixação das proteínas. No Laboratório Chau é possível fazer os dois tipos de determinações por ensaio de quimioluminescência competitivo.

#### ➤ Tiroxina e tiroxina livre

A tiroxina (T4) é a principal hormona da tireoide segregada para a circulação sanguínea por esta glândula a partir da tiroglobulina, sendo de extrema importância para o organismo no que respeita à regulação da taxa metabólica e por isso é importante que se mantenha dentro dos seus valores de referência (4.5-10.9  $\mu$ g/dL) na corrente sanguínea. À semelhança do que ocorre com a T3, também a T4 circula na corrente sanguínea numa mistura equilibrada de hormona livre e hormona ligada a proteínas, nomeadamente, à globina transportadora das hormonas da tireoide (TBG). É sob a forma livre, FT4, que esta se apresenta biologicamente ativa e é a determinação da FT4 a que maior relevância apresenta por não ser condicionada pelo *uptake* proteico.

Concentrações aumentadas de T4 sérica total estão associadas a situações de hipertireoidismo e valores diminuídos correspondem geralmente a hipotireoidismo. Quando não existe disfunção tireoideia, valores elevados de TBG podem conduzir a um aumento de T<sub>4</sub> total, o que pode acontecer em situações de gravidez e hiperproteinémia, por exemplo. Pelo contrário, uma diminuição dos teores de TBG leva a uma redução de T4 total o que pode acontecer em situações de doença hepáticas e gastrointestinais neoplásicas ou não.

A determinação da concentração sérica da FT4 em conjunto com o doseamento da TSH é a principal ferramenta para a avaliação de perturbações da tireóide tal como para fazer o controlo da terapêutica tirossupressora.

No Laboratório Chau apenas é feita a determinação sérica da FT4 por imunoensaio de competição a T4 é subcontratada ao Laboratório Labeto.

### ➤ Anticorpos anti-peroxidase específica da tiroide

A peroxidase específica da tiroide (TPO) está presente nos microsomas dos tirócitos e desempenha a função de iodação da L-tirosina com vista à formação das hormonas T3 e T4. Existem vários quadros de tiroidite autoimune que resultam da produção de anticorpos anti-TPO como acontece na grande maioria dos pacientes com tiroidite de Hashimoto (Todo Bom *et al.*, 2013).

Para que se possa fazer um diagnóstico mais assertivo desta patologia deve fazer-se também a determinação dos anticorpos anti-tiroglobulina, embora os valores séricos destes anticorpos não apresentem correlação direta com a patologia. De facto, no início da patologia estes valores estão muito aumentados (valor de referência A-TPO <115 UI/mL e A-TG <34 UI/mL) mas podem diminuir posteriormente durante longos períodos, sendo necessária uma vigilância apertada pois se voltarem a surgir títulos elevados poderemos estar perante uma reincidência da patologia.

### ➤ Anticorpos anti-tiroglobulina

A tiroglobulina (TG) é produzida na glândula da tiroide especificamente no lúmen folicular e em conjunto com a TPO dá origem às hormonas tiroideias, como já acima referido.

Em patologias tiroideias autoimunes também há formação de anticorpos anti-TG, à semelhança do que acontece com os A-TPO contudo, o seu doseamento, que neste laboratório é feito por electroquimioluminescência de competição, não é tão específico já que existem vários casos de pessoas com aumento da anti-TG (A-TG <34 UI/mL) que não apresentam qualquer patologia. Ainda assim, em pacientes com carcinoma da tiroide e que apresentem A-TG detetável a sua concentração poderá ser utilizada como marcador de evolução da patologia (Burtis *et al.*, 2015).

## 2.2.6. Serologia infecciosa

### ➤ Vírus da imunodeficiência humana

O vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), representado na figura 12, pertence à família dos retrovírus e é responsável pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

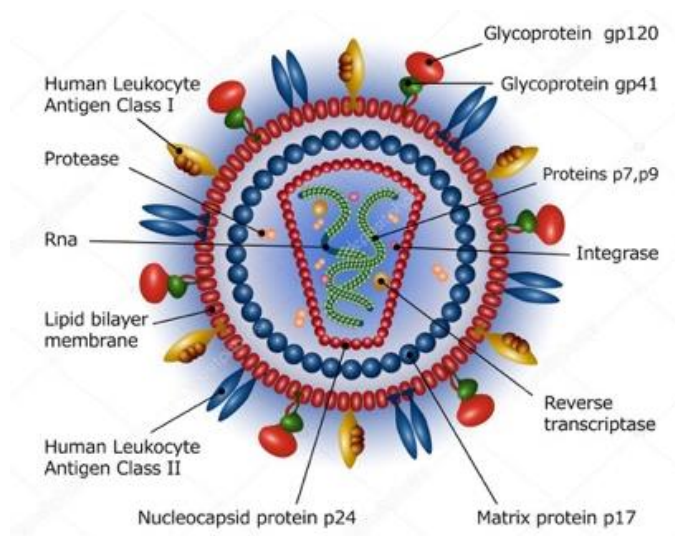


que se caracteriza por ser o último estágio da infecção por HIV em que ocorre a redução do número de Linfócitos T CD4 levando a uma diminuição da ação do sistema imunitário e por consequência a uma maior vulnerabilidade a infecções oportunistas (Kindt *et al.*, 2008).

São conhecidos dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2 que diferem na sua distribuição geográfica, na sua apresentação antigénica e ainda na sua capacidade infetante já que o HIV-1 se apresenta muito mais infeccioso e é o responsável pela grande maioria dos casos a nível Mundial. A transmissão ocorre pessoa-a-pessoa por contacto com sangue infetado e seus derivados, através de relações sexuais não protegidas ou por via vertical antes, durante ou após o nascimento (Kindt *et al.*, 2008).

A infecção por HIV apresenta um período de incubação longo que pode ir de seis a doze semanas e nesta fase o utente está normalmente assintomático, os poucos que se apresentam sintomáticos apresentam sintomas inespecíficos entre a segunda e a sexta semana após o contágio. A partir da sexta semana já é possível fazer a deteção de anticorpos no soro contra proteínas do vírus e o teste que se efetua no Laboratório Chau é adquirido

da Roche Diagnostics, sendo de quarta geração, significa que pesquisa anticorpos contra antígenos do HIV-1, HIV-2 e o antígeno da p24 do HIV I que surge aumentado mais precocemente e que por isso permite aumentar a sensibilidade e estreitar a janela de diagnóstico. Sempre que se obtém um resultado positivo pela técnica de electroquimioluminescência o Laboratório Chau subcontrata a sua confirmação, por dois métodos diferentes do utilizado, ao Laboratório Labeto. Se se confirmar o resultado no boletim de resultados segue a nota de “HIV-1+HIV-2 Positivo” não confirmados por Western-Blot e sugere-se que seja feita essa confirmação. Estes resultados são normalmente enviados diretamente ao médico e no boletim fornecido ao utente, em relação à análise do HIV, segue a nota de “resultado enviado diretamente para o médico”.

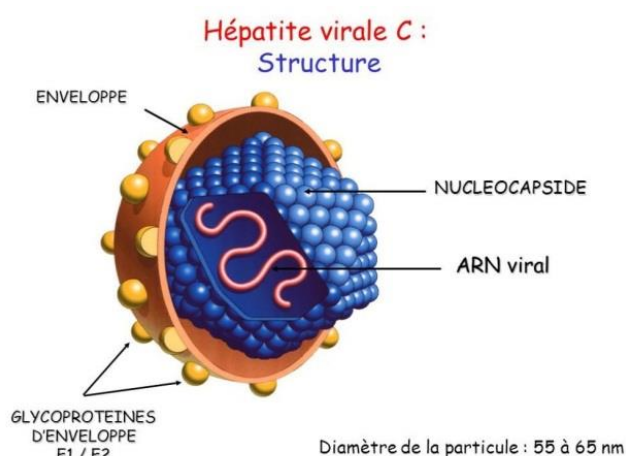


**Figura 12:** Diagrama esquemático de um corte transversal do virião do HIV.

### ➤ Vírus da hepatite C

O vírus da Hepatite C (HCV), representado na figura 13, pertence à família *Flaviviridae* e apresenta um genoma RNA de cadeia simples. A transmissão ocorre por via parenteral, via sexual ou por via vertical. Tal como acontece com o HIV, o HCV apresenta um período de incubação relativamente longo (seis a doze semanas) em que a maioria dos casos se apresenta assintomática e, por isso, torna-se importantíssimo fazer testes de rastreio.

A infecção por HCV é uma das principais causas de doença hepática podendo evoluir para quadros de hepatites agudas ou crónicas. Aproximadamente 70-85% das infeções por HCV evoluem mais cedo ou mais tarde para doença crónica embora esteja dependente de fatores como a idade ou o estado imunitário do doente. A gravidade da hepatite crónica prende-se com o facto de facilmente progredir para cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular (Burtis *et al.*, 2015).



**Figura 13:** Diagrama esquemático de um corte transversal do virião do HCV.

Os testes laboratoriais utilizados para rastreio são: o doseamento das transaminases (AST e ALT) e a pesquisa de anticorpos anti-HCV (utilizando a electroquimioluminescência por técnica de *sandwich*). Sempre que obtemos um resultado positivo num paciente sem histórico desta virose voltamos a repetir a análise após nova centrifugação da amostra, e caso se confirme a positividade, enviamos a amostra para confirmação em Leiria no Laboratório Labeto. No boletim de resultados segue uma nota de sugestão de confirmação por anticorpos para vírus Hepatite C – anti-HCV confirmatório e/ou PCR RNA-HCV (carga viral) e eventual genotipagem.

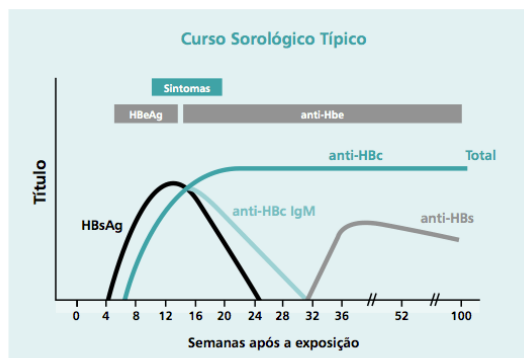
### ➤ Vírus da hepatite B

O vírus da Hepatite B (HBV) pertence à família dos *Hepadnavirus* e é constituído por DNA circular em dupla hélice e, tal como acontece com o HCV, apresenta tropismo para as células hepáticas (Burtis *et al.*, 2015).

A partícula viral é constituída por uma membrana mais externa a que damos o nome de envelope, que é formada essencialmente por proteínas que expressam o designado antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) e pelo capsídeo, que tem como função proteger o genoma e a enzima transcriptase reversa e que expressa o antigénio do core da hepatite B (HBcAg) e o antigénio E da hepatite B (HBe).

A transmissão deste vírus ocorre pelo contacto com sangue infetado ou derivados, através de relações sexuais desprotegidas e de mãe para filho (menos comum) (Burtis *et al.*, 2015).

Devido à complexidade estrutural do HBV existem vários marcadores que devem ser analisados para fazer o diagnóstico correto da patologia, já que estes vão surgindo no soro em tempos diferentes como mostra o gráfico II. O primeiro marcador a mostrar positividade em caso de contágio com o vírus é o antigénio HBs que persiste no soro entre 1-3 meses, quase em simultâneo



**Gráfico II:** Curso da Hepatite B aguda com recuperação imunológica.

surge positivo no soro o antigénio HBe, marcador de replicação viral. Em resposta à presença destes antigénios estranhos começa a surgir a resposta imune que se manifesta com a produção do anticorpo IgM anti-HBc, que se mantém positivo 3-6 meses após a infeção aguda, e que com o evoluir da infeção dá lugar ao anticorpo IgG anti-HBc. Se o sistema imune estiver plenamente funcional, nesta fase começa também a surgir no soro o anticorpo anti-HBe, que significa que ocorreu a seroconversão, ou seja, que houve uma diminuição da multiplicação do vírus coincidente com o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anticorpo HBsAc como mostra o gráfico 2. Este último permanecerá o resto da vida conferindo imunidade à exposição a este vírus, pode ter origem numa infeção por HBV debelada ou conferido por vacinação (Burtis *et al.*, 2015).

No Laboratório Chau faz-se o doseamento do antigénio HBs (HBsAg), do anticorpo HBs (HBsAc), por ensaio de electroquimioluminescência não competitivo, e do anticorpo HBc (HBcAc) por ensaio de electroquimioluminescência competitivo. O doseamento do HBsAg é utilizado para fazer diagnóstico de Hepatite B com o objetivo de impedir a continuidade da transmissão através de sangue e de hemoderivados e é ainda utilizado para controlar a evolução da doença, bem como a eficácia do tratamento com os anti-virais. Sempre que obtemos um resultado positivo sem histórico enviamos a amostra para confirmação no Laboratório Labeto em Leiria. A determinação do HBsAc é utilizada

normalmente para controlar a necessidade e a eficácia da vacina e para fazer a monitorização da doença após uma infeção aguda. Por último, a determinação do HBcAc, em associação com a dos outros marcadores permite fazer o diagnóstico e a monitorização da hepatite B, sendo que, na falta de outros indicadores a presença destes anticorpos pode ser a única indicação de infeção viral já existente. Também neste caso, sempre que obtemos resultados positivos, sem concordância com o histórico do paciente, pedimos confirmação para o Laboratório Labeto em Leiria.

#### ➤ Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus de DNA de cadeia dupla pertencente à família *Herpesviridae*, encontra-se amplamente difundido pelo Mundo e uma vez ocorrida a infeção ele permanece no hospedeiro toda a vida, podendo provocar infeções assintomáticas que evoluem para infeções latentes, mas que podem ser reativadas (Junqueira *et al.*, 2008).

A transmissão requer contacto íntimo com secreções infetadas, nomeadamente, sangue, saliva, urina, sémen e secreções vaginais.

Embora as infeções primárias sejam assintomáticas, estas podem ser bastante perigosas quando ocorrem na gravidez acarretando risco de transmissão intra-uterina. Desta transmissão podem resultar lesões graves e permanentes no feto tais como atraso mental, de crescimento e mais tardiamente podem surgir problemas auditivos, bem como dificuldades na aprendizagem.

A avaliação serológica para esta patologia é feita através da determinação das IgG e IgM anti-CMV, por imunoensaio de electroquimioluminescência não competitivo, sempre que surjam valores aumentados de IgM significa que se pode estar perante uma infeção aguda ou uma reativação do vírus (menos perigosa que a infeção primária na gravidez) (Junqueira *et al.*, 2008).

Para fazermos esta distinção, existe ainda uma outra determinação a ser utilizada que não é realizada no Laboratório Chau (realizada no Laboratório Labeto), que é a determinação da avidéz das IgG's. Esta análise baseia-se, no princípio da afinidade dos anticorpos IgG para um antígeno específico e o seu conseqüente aumento durante o estabelecimento da resposta imunológica, sucintamente, define-se como a força de ligação do anticorpo ao antígeno que lhe deu origem, sendo a avidéz das IgG's tão mais elevada quão mais antiga for a infeção. Um valor aumentado das IgM, em combinação com um baixo valor de avidéz das IgG, indica que estamos perante uma infeção primária e que a grávida pode correr riscos na sua gestação devendo ser seguida em consulta de risco (Plotkin, Stanley A, 2018).

## ➤ Rubéola

O vírus da rubéola é um vírus pleomorfo de RNA atualmente incluído na família *Togaviridae*. A Rubéola, patologia provocada pelo vírus que lhe dá nome é uma doença moderadamente contagiosa que é acompanhada de erupções cutâneas que poderão vir acompanhadas de febre, dores de cabeça, inflamações glândulares e, no caso dos adultos pode provocar dores articulares (Garcia Bermejo I., de Ory Manchón F., 2015).

A transmissão da Rubéola ocorre através da inalação de partículas respiratórias contaminadas com o vírus e apresenta um período de incubação de duas a três semanas. Em adultos e em crianças saudáveis, esta infeção é facilmente ultrapassada sem deixar sequelas, contudo, nas grávidas especialmente nas que se encontram no primeiro trimestre de gravidez, esta patologia pode causar anomalias congénitas no feto com manifestação tardia, como a surdez, podendo ainda ocorrer reabsorção do embrião, aborto espontâneo e em alguns casos parto de natimorto (Garcia Bermejo I., de Ory Manchón F., 2015).

Atualmente, a vacina da Rubéola faz parte do plano nacional de vacinação e a aplicação de uma dose única é suficiente em cerca de 90% dos casos. No entanto, é importante que especialmente as mulheres em idade fértil façam os doseamentos de IgG e IgM para este vírus e que a vacina seja reforçada em caso de não estarem imunes antes que se planeie encetar uma gravidez. No Laboratório Chau são feitos os doseamentos, por ensaio de electroquimioluminescência *sandwich*, das duas imunoglobulinas específicas referidas sendo que sempre que temos um caso de IgM positiva, a amostra segue para confirmação no Laboratório Labeto com pedido conjunto de avidéz tal como acontece para o CMV.

## ➤ Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infeção provocada pelo parasita protozoário *Toxoplasma gondii*. A contaminação com este parasita ocorre por ingestão de alimentos ou águas contaminadas por oócitos maduros transmitidos pelos gatos ou por carne mal cozinhada que contenha quistos do parasita (Kindt *et al.*, 2008).

A infeção primária é normalmente subclínica e em indivíduos saudáveis evolui para um estado de latência que normalmente persiste até ao final da vida, mas em casos especiais como é o dos imunodeprimidos (doentes com SIDA, por exemplo), uma reativação da infeção poderá evoluir para meningoencefalite e conduzir à morte. Existem ainda outras situações em que a infeção primária por *Toxoplasma* pode constituir perigo como acontece

por exemplo com as grávidas, já que a presença deste parasita pode dar origem a lesões graves no feto devido à sua capacidade para atravessar a barreira placentária. Na grande maioria dos casos não há sinais clínicos à nascença, mas crianças infetadas durante a vida intra-uterina podem tardiamente vir a apresentar sequelas como atraso mental e psicomotor ou perda de audição sendo que a infeção se pode tornar tanto mais grave quanto menor for o tempo de gestação aquando da infeção.

O diagnóstico da infeção por *Toxoplasma* é normalmente feito através da deteção dos anticorpos IgG e IgM específicos. A determinação dos anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* é utilizada para fazer a avaliação do estado serológico e é um indicador de infeção aguda ou latente; por outro lado, a deteção dos anticorpos IgM podem indicar infeção aguda recente ou a reativação do parasita.

Sempre que no Laboratório Chau sejam obtidos valores de IgM anti-*Toxoplasma* positivos, faz-se a confirmação desse resultado no Laboratório Labeto, caso se confirme é também determinada a avidéz das IgG's. Estas determinações são especialmente importantes no caso das grávidas, já que a farmacoterapia precoce nestes casos pode prevenir lesões congénitas ou reduzir a gravidade de possíveis sequelas para o feto.

#### 2.2.7. Técnicas manuais

##### ➤ Deteção de Sífilis

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível (DST) provocada pela bactéria *Treponema pallidum* (espiroqueta). A principal via de transmissão é a via sexual contudo pode ocorrer por contaminação com material perfurante não estéril na realização de *piercings* e tatuagens bem como através de transfusão sanguínea, a forma congénita ocorre quando há a transmissão de mãe para o feto (Sonda *et al.*, 2013).

Esta patologia encontra-se dividida em três estadios: Primário, Secundário e Terciário. O estadio primário cursa com aparecimento de lesões nos órgãos genitais ou boca indolores e sem quaisquer outras manifestações inflamatórias excetuando nos casos de transmissão sanguínea em que não ocorre o aparecimento de lesões. No segundo estadio a bactéria já se encontra na corrente sanguínea e começa a surgir resposta imunológica dando origem a sintomas característicos como manchas avermelhadas na pele acompanhadas de sintomas semelhantes aos estados gripais. Na última fase e mais grave de todas, para a qual só evoluem pacientes que não façam tratamento, há o desenvolvimento de lesões nos pulmões, coração e cérebro (Avelleira & Bottino, 2006).

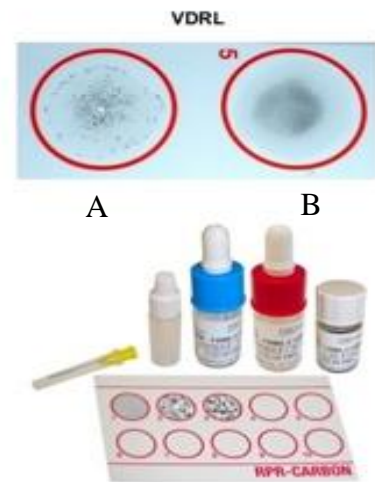
Indivíduos infectados por esta bactéria produzem vários anticorpos diferentes entre os quais as chamadas reaginas, a sua deteção tem por base a utilização de um reagente composto por cardiolipina, lecitina e colesterol que mimetiza o antigénio VDRL da sífilis (Avelleira & Bottino, 2006).

O RPR-nosticon® (Fig.14) é o teste utilizado no Laboratório Chau para fazer o *screening* de sífilis. É um teste de floculação não treponémico, macroscópico, que permite detetar a reagina.

Quando se põe em contacto uma gota de soro positivo numa lâmina de teste com o reagente formam-se flocos negros (devido à presença de carvão no reagente de teste) visíveis a olho nu (Fig.14-A), quando a reagina não está presente na amostra não ocorre floculação e surge uma

cor cinza uniforme com um centro negro (Fig.14-B). Este é um método semi-quantitativo que apenas permite um

resultado qualitativo. Sempre que temos uma amostra positiva fazemos diluições sucessivas para saber até que diluição se obtém aglutinação, o que é bastante útil para a avaliação da resposta ao tratamento. Contudo, um resultado positivo deverá sempre ser confirmado pelo método de pesquisa de anticorpo anti-*Treponema pallidum* (TPHA).



**Figura 14:** A - Teste VDRL Positivo e B - Teste VDRL Negativo.

#### ➤ Deteção de mononucleose

A mononucleose infecciosa (MNI) corresponde à fase aguda de uma patologia viral provocada pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) que faz parte da família dos herpes humanos.

Esta patologia está frequentemente associada à adolescência, a principal via de transmissão é através do contacto íntimo pelo beijo a pessoas seropositivas para este vírus daí a patologia ser vulgarmente chamada de “doença do beijinho”. A transmissão também pode ocorrer em casos de transfusões sanguíneas, mas é muito menos frequente. Na maioria das crianças a infeção primária por EBV é assintomática, os sintomas desenvolvem-se com maior frequência em adolescentes e adultos e são sobretudo: febre, cansaço, dor de garganta, de cabeça e ínguas no pescoço (Moreira *et al.*, 2011).

Os indivíduos infetados por EPB possuem no seu soro anticorpos heterófilos que são capazes de reagir com glóbulos vermelhos de diferentes espécies. O rastreio deste tipo de anticorpos é efetuado recorrendo ao teste rápido de aglutinação em lâmina, o Monoslide-Test (Fig.15).



**Figura 15:** Teste rápido de deteção de Mononucleose infecciosa Monslide Test.

Este teste rápido é constituído por hemácias de cavalo, hemácias de boi e células do rim de cobaias que apresentam à sua superfície os chamados antigénios de *Forssman*. Este teste está dividido em duas etapas o teste de rastreio (*Hoff e Bauer*) e o teste de absorção diferencial de *Davidsohn*. O primeiro permite fazer a deteção de aglutinação das hemácias de cavalo pelos anticorpos heterófilos associados à MNI, mas também pelos anticorpos inespecíficos de *Forssman*. Quando o teste de rastreio está positivo e com o objetivo de perceber se a aglutinação aconteceu em resposta à presença de anticorpos heterófilos associados a MNI ou não realizamos o segundo teste de adsorção diferencial. Neste caso o teste é considerado positivo se houver adsorção dos anticorpos associados à mononucleose aos antigénios presentes nas hemácias de boi e o mesmo não acontecer relativamente aos antigénios das células de rim de cobaia.

## 2.2.8 Outros parâmetros

### ➤ Anticorpos antiestreptolisina O

Os estreptococcus beta-hemolíticos do grupo A causam infeções nomeadamente doenças de pele ou amigdalites que podem ser seguidas de glomerulonefrite, endocardite aguda ou febre reumática por subida da bactéria através do trato respiratório superior (Szczygielska, I., et al., 2018).

A estreptolisina O é uma das toxinas extracelulares libertadas pelo estreptococcus beta-hemolítico do grupo A, é capaz de induzir a síntese de anticorpos específicos, os anticorpos antiestreptolisina O (TASO) apresentam-se aumentados em cerca de 80% das infeções.

A determinação destes anticorpos deve ser efetuada várias vezes em intervalos semanais. Apesar de níveis circulantes de TASO serem encontrados na maioria dos pacientes com febre reumática e glomerulonefrite pós-estreptocócica, a sua maior



recomendação é no seguimento de pacientes com febre reumática, já que nesses casos os títulos de TASO se correlacionam melhor com a atividade da doença. O desenvolvimento de título pode indicar que o tratamento com antibióticos foi bem-sucedido como poderá significar que o antigénio persiste mesmo depois dos sinais clínicos de infeção já terem desaparecido (Szczygielska, I., et al., 2018).

### **3. Controlo de Qualidade Interno e Externo**

Embora já tenha vindo a referir ao longo deste trabalho que diariamente se realizam no setor da Bioquímica e da Imunologia controlos internos de qualidade fornecidos pela casa comercial dos equipamentos é de salientar que o mesmo acontece em todas as técnicas manuais que efetuamos no laboratório. Além destes controlos, o Laboratório Chau também se encontra inscrito no programa de química clínica e imunoensaio do “*Randox International Quality Assessment Schemes*” (RIQAS) que não é mais do que um contorno de qualidade externo que nos permite garantir o rigor do nosso trabalho.

## **Conclusão**

Em jeito de conclusão, posso afirmar que os últimos dois anos que passei a frequentar o Mestrado de Análises Clínicas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra foram dos mais gratificantes da minha vida académica. Em primeiro lugar, porque me permitiu integrar o corpo de estudantes de uma faculdade que muito admiro e também porque pude adquirir conhecimentos com professores altamente especializados que tudo fazem para que possamos chegar ao mundo do trabalho o mais bem preparados quanto possível. Todo este percurso trouxe-me até ao término deste estágio de onde saio mais enriquecida e preparada para desempenhar as minhas funções com maior segurança e qualidade técnica. Além disso, foi a força motriz que me permitiu abraçar novos desafios no meu local de trabalho, tendo tido o prazer de desempenhar funções em setores com os quais não havia tido oportunidade de contactar.

Pessoalmente, aguçou-me ainda mais a vontade e a curiosidade de explorar esta área da saúde e deu-me as ferramentas necessárias para o continuar a fazer.



## **Bibliografia**

- Avelleira, J. C. R., & Bottino, G. (2006). Sífilis: Diagnóstico, tratamento e controle. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(2), 111-126.
- Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2015). *Tietz - Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics (7ª edição)*, Elsevier.
- Grassi, M. F., Dell'Acqua, M. C. Q., Jensen, R., Fontes, C. M. B., Guimarães, H.C. Q. C. P., (2017) Diagnósticos, resultados e intervenções de enfermagem em pacientes com lesão renal aguda, *Jornal Paulista de Enfermagem* 538-545.
- Guia para o diagnóstico das infecções do tracto urinário. (1977). Bayer Diagnósticos, S.A.
- Garcia Bermejo I., de Ory Manchón F. (2015), Diagnóstico serológico de las infecciones congénitas y algoritmos para mejorar la eficacia diagnóstica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* vol:33 22-26.
- Hurt-Camejo, E., Camejo. G., (2018) ApoB-100 Lipoprotein Complex Formation with Intima Proteoglycans as a Cause of Atherosclerosis and Its Possible Ex Vivo Evaluation as a Disease Biomarker. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* vol:5 36.
- Junqueira, J. M. J., Sancho, T. M., & dos Santos, V. A. (2008). Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *NewsLab* vol:8 86.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2008). *Imunologia de KUBY (6ª edição)*. Artmed.
- Moreira, E., Machado, Â., Machado, L., Xavier, C., Monteiro, C., Cunha, J., & Garrido, C. (2011). Infecção pelo vírus Epstein Barr e hepatite. *Nascer e Crescer* vol:20 73-75.
- Netto, A. P., Andriolo, A., Fraige Filho, F., Tambascia, M., Gomes, M. D. B., Melo, M., Cavalcanti, S. (2009). Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais., *Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial* v:45 31-48.
- Norma da Direção Geral de Saúde I-7. (2011). *Prevenção e Avaliação da Nefropatia*.
- Plotkin, Stanley A (2018). Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population. *The Journal of Infectious Diseases* 10-12.
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Antony, W. P. (2015). *Harper's Illustrated Biochemistry (30ª edição)*. Mc Graw Hill Education.
- Sodré, F. L., Costa, J. C. B., & Lima, J. C. C. (2007). Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* v:43 329–337.
- Szczygielska, I., Hernik,, E., Kołodziejczyk, B., Gazda, A., Maślińska, M., Piotr, M. G. (2018) Rheumatic fever – new diagnostic criteria. *Journal of Reumatology* 37-41.
- Sonda, E. C., Richter, F. F., Boschetti, G., Casasola, M. P., Krumel, C. F., & Machado, C. P. H.

(2013). Sífilis Congênita: uma revisão da literatura. Revista de Epidemiologia e controle de infecção v:81 111-126.

Todo Bom, A., Mota Pinto, A., Rendas, A., Rabaça, C., Robalo Cordeiro, C., Brás Silva, C., ... Soares, S. (2013). Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações (2ª edição). LIDEL - edições técnicas.

Vallada, E. P. (1993). Manual de exames de urina (4ª edição.). ATHENEU.

Zhuo Y., Wang H.J., Lei Y.M., Zhang P., Liu J.L., Chai Y.Q., Yuan R., (2018) Electrochemiluminescence biosensing based on different modes of switching signals. Analyst 143, 3230-3248.