



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Francisca Ricardo Pinto

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientada pela Professora Doutora Bárbara Rocha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Ana Francisca Ricardo Pinto

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientada pela Professora Doutora Bárbara Rocha e apresentado à Faculdade
de Farmácia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Neste relatório não podia deixar de fazer um agradecimento especial a todos aqueles que tornaram possível a execução deste trabalho.

Ao LACUC, que me acolheu de braços abertos, mesmo quando estávamos todos com pouca esperança. À minha equipa, que me ajudou sempre, principalmente a crescer como estudante e como pessoa. Obrigada por me terem dado a oportunidade de contribuir, mesmo que de forma mínima, para ajudar no controlo da pandemia.

Ao CMLGS-Porto, por ter tornado a minha passagem pelo laboratório uma experiência incrível, que ainda hoje dura. Por me terem dado ferramentas essenciais para a minha vida como estudante, e agora como trabalhadora. Obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Aos meus professores, que fizeram parte deste percurso, por darem sempre o seu melhor conselho e por me terem passado algum do seu conhecimento e experiência, fazendo de nós estudantes mais aptos. Em especial à professora Ana Miguel que tornou a minha passagem pelo LACUC mais rica. À professora Bárbara Rocha, minha orientadora, pela paciência e dedicação.

À Dra. Eduarda Figueiredo por ter sido minha orientadora, mas, acima de tudo, mentora. Às minhas colegas da triagem por toda a força e disponibilidade para me ajudarem em tudo.

À minha família, por acreditarem sempre em mim, mesmo quando eu própria duvidei.

À minha mãe, por encontrar sempre forma de acreditar em mim e, mesmo nos momentos mais difíceis, me dar força para continuar.

Um especial agradecimento ao meu avô que, apesar de não ter conseguido assistir à conclusão do trabalho, me vai acompanhar sempre.

Por fim, ao Flávio, pela paciência, amor e preocupação.

Índice

Agradecimentos	iii
Índice	v
Índice de figuras, tabelas e equações.....	ix
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas	ix
Índice de equações.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumo	xv
Abstract	xv
Introdução.....	I
Parte I – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra dirigido ao SARS-CoV-2.....	2
SARS-CoV-2.....	2
Caracterização do SARS-CoV-2.....	3
Origem e reservatório	3
Epidemiologia.....	3
Mecanismo de infeção	3
Manifestações clínicas	4
Vacinação.....	4
Diagnóstico laboratorial	4
Caracterização do laboratório	5
Fase pré-analítica	6
Fase analítica.....	6
Amostras	6
Equipamentos utilizados.....	6
Deteção do genoma viral.....	7
Inativação do vírus	7
Extração do RNA viral.....	7
Preparação para a RT-qPCR.....	8
RT-qPCR	9

Validação dos resultados e interpretação das curvas obtidas.....	10
Controlo de qualidade.....	11
Deteção de antigénio.....	12
Controlo de qualidade.....	13
Deteção de anticorpos.....	13
Controlo de qualidade.....	14
Parte II – Laboratório Central do Porto do grupo Germano de Sousa	14
Caracterização do laboratório.....	14
Organização laboratorial	14
Equipamentos utilizados.....	15
Fase pré-analítica.....	16
Colheitas.....	16
Material de colheita	16
Triagem.....	16
Entrada das amostras e distribuição pelos setores laboratoriais.....	17
Conformidade das amostras	17
Serviço ao exterior.....	17
Fase analítica.....	18
Bioquímica.....	18
Metabolismo dos hidratos de carbono	19
Metabolismo lípidos.....	20
Metabolismo proteínas	23
Avaliação da função hepática.....	25
Avaliação da função pancreática	27
Avaliação da função renal.....	29
Equilíbrio hidroelectrolítico.....	32
Biomarcadores do metabolismo do ferro.....	33
Avaliação da função muscular	36
Metabolismo mineral ósseo.....	37
Controlo de qualidade.....	40
Equipamentos utilizados	40
Hematologia.....	41
Formação das células sanguíneas.....	42

Hemograma	44
Contagem de reticulócitos.....	46
Esfregaço sanguíneo.....	48
Velocidade de sedimentação	51
Hemóstase	51
Determinação do grupo sanguíneo.....	53
Teste de <i>Coombs</i>	54
Controlo de qualidade.....	54
Equipamentos utilizados	55
Imunologia	56
Microbiologia	56
Controlo de qualidade	57
Fase pós-analítica.....	58
Conclusão.....	59
Bibliografia	61
Anexos	69
Anexo 1	69
Anexo 2.....	70
Anexo 3.....	70
Anexo 4.....	71

Índice de figuras, tabelas e equações

Índice de figuras

- Figura 1** Hematopoeise - diagrama da formação das diferentes linhagens a partir de células-tronco pluripotente (Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2016). Hoffbrand's Essential Haematology (Seventh ed). Chichester, West Sussex; UK: Wiley Blackwell).....43
- Figura 2** Esfregaço sanguíneo concordante com boletim analítico. (Warner MJ, Kamran MT. Iron Deficiency Anemia. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.)51
- Figura 3** Cascata da coagulação simplificada (ADAMS, R.L.C. and BIRD, R.J. (2009), Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. Nephrology, 14:.)....52

Índice de tabelas

- Tabela 1** Equipamentos utilizados no LACUC.....7
- Tabela 2** Determinações analíticas para avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono 19
- Tabela 3** Determinações analíticas utilizadas na avaliação do metabolismo lipídico.....21
- Tabela 4** Determinações analíticas para avaliação do metabolismo das proteínas23
- Tabela 5** Determinações analíticas para avaliação da função hepática.....25
- Tabela 6** Determinações analíticas avaliados no caso clínico 128
- Tabela 7** Determinações analíticas para avaliação da função renal.....29
- Tabela 8** Determinações analíticas para avaliação do metabolismo do ferro34
- Tabela 9** Determinações analíticas para avaliação da função muscular.....36
- Tabela 10** Determinações analíticas para avaliação do metabolismo mineral ósseo.....37
- Tabela 11** Parâmetros analíticos avaliados no caso clínico 250

Índice de equações

Equação 1 Clearance da creatinina.....	30
Equação 2 Cálculo da saturação da transferrina.....	35
Equação 3 Determinação do INR.....	53

Abreviaturas

ACE 2: Enzima conversora de angiotensina 2

AEQ: Avaliação Externa da Qualidade

Ag: Antígeno

ALP: Fosfatase Alcalina

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

ATP: Adenosina trifosfato

BSL: Nível de biossegurança

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CHCM: Hemoglobina corpuscular média

CK: Creatina quinase

CMLGS-Porto: Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Porto

COVID-19: *Coronavirus Disease 2019*

Ct: *Cycle Threshold*

DEQAS: *Decentralized Evaluation Quality Assurance System*

DGS: Direção Geral da Saúde

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

ECDC: Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético

ELFA: Ensaio imunoenzimático por fluorescência

EMA: Agência Europeia do Medicamento

EPI: Equipamento de proteção individual

GGT: Gama Glutamil Transferase

Hb: Hemoglobina

HbA1c: Hemoglobina glicada

HDL: *High-density lipoproteins*

HCM: Hemoglobina globular média

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HS-PCR: Proteína C reativa de alta sensibilidade

Ht: Hematócrito

IDL: *Intermediate-density lipoproteins*

Ig: Imunoglobulina

INR: Índice Razão Normalizado

ISI: Índice Internacional de Sensibilidade

LACUC: Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

LDH: Lactato Desidrogenase

LDL: *Low-density lipoproteins*

LFA: Imunoensaio de fluxo lateral

Lp(a): Lipoproteína a

LTP: Laboratório Trindade Porto

MERS-CoV-2: Síndrome Respiratório do Médio Oriente – Coronavírus 2

PCR: *Polymerase chain reaction*

PMN: Células polimorfonucleadas

PTGO: Prova tolerância oral à glicose

PTH: Hormona Paratiroide

qRT-PCR: PCR em tempo real com Transcriptase Reversa

RDW: Distribuição dos eritrócitos

Rh: Resus

RNA: Ácido Ribonucleico

SARS-CoV-2: Síndrome Agudo Respiratório Severo – Coronavírus 2

SEQC: *Sociedad Española de Química Clínica*

ssRNA: Cadeia simples de Ácido Ribonucleico

Taq: *Thermus aquaticus*

Th: *Threshold Line*

TIBC: Capacidade total de ligação de ferro

UKNEQAS: *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCM: Volume globular médio

VLDL: *Very-low-density lipoproteins*

Resumo

O presente relatório de estágio aborda a importância do ramo das análises clínicas como meio complementar de diagnóstico. Inicialmente é feita uma pequena caracterização dos laboratórios onde foi realizado o estágio curricular – LACUC (Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra) e CMLGS-Porto (Laboratório Central do Porto do grupo Germano de Sousa).

Ao longo do relatório é feita uma caracterização geral de cada laboratório, abordando os equipamentos e técnicas utilizadas, assim como as determinações analíticas mais pedidas. Por fim, são abordados casos clínicos enquadrados nas duas valências que serão abordadas com maior pormenor – bioquímica e hematologia.

A realização do estágio curricular e do presente relatório permitiu a consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas.

Palavras-chave: Análises clínicas, SARS-CoV-2, Bioquímica, Hematologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

Abstract

The following internship report addresses the importance of the clinical analysis field as a complementary mode of diagnostics. Initially, a brief description of the laboratories where the curricular internship occurred is made – LACUC (Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra) and CMLGS-Porto (Laboratório Central do Porto do grupo Germano de Sousa).

Throughout the report, a description of each laboratory is done, including the equipment and techniques used and, simultaneously, the most requested analytical determinations. Finally, clinical cases related to both areas are explored in more detail - biochemistry and haematology.

The completion of this curricular internship and this report has allowed the consolidation of the knowledge acquired during the master's degree in Clinical Analysis.

Keywords: Clinical Analysis, SARS-CoV-2, Biochemistry, Haematology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra.

Introdução

O ramo das análises clínicas é de extrema importância no diagnóstico de várias condições clínicas e posterior monitorização da terapêutica, constituindo a base dos exames complementares de diagnóstico, depois de uma correta avaliação por parte do clínico.

É através do laboratório de análises clínicas, independentemente do seu contexto (hospitalar ou privado), que o técnico e o clínico trabalham em conjunto para poderem oferecer uma resposta individualizada a cada utente. Estas respostas personalizadas, baseadas na realização de testes laboratoriais, permitem, muitas vezes, a deteção precoce de novas patologias e a prevenção de complicações de doenças pré-existentes.

No atual contexto pandémico, os laboratórios de análises clínicas tiveram de se adaptar à nova realidade, criando áreas destinadas exclusivamente à deteção de infeções pelo novo coronavírus designado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), reforçando o valor das análises clínicas na tomada de decisões médicas.

Através da realização do meu estágio curricular, em dois laboratórios distintos, consegui ter uma noção mais verdadeira das duas realidades. O meu plano de estágio foi desenhado de forma a ter uma experiência num laboratório dedicado à deteção de novas infeções por SARS-CoV-2, e num laboratório dedicado às restantes análises.

Na parte I do meu relatório abordo a minha experiência no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), no período de 21/01/2021 a 05/03/2021, dedicada à deteção do SARS-CoV-2. A parte II é dedicada ao Laboratório Central do Grupo Germano de Sousa no Porto (CMLGS-Porto), onde realizei a segunda componente do meu estágio, no período de 15/03/2021 a 16/07/2021, tendo passado pelas valências de bioquímica, hematologia, imunologia e microbiologia, que me permitiram uma visão mais geral e interligada de todas as áreas, dando-me ferramentas para encarar as análises clínicas como um todo. Neste relatório aprofundarei as valências de bioquímica e hematologia.

Além de todos os equipamentos automatizados, que cada vez ganham mais força, face ao elevado número de pedidos que chegam ao laboratório, é necessário estes serem dotados de técnicos qualificados, para que seja possível o manuseamento cuidado dos equipamentos, a correta interpretação de resultados e a sua validação. Estas competências, juntamente com os programas de controlo de qualidade, permitem chegar a resultados mais fidedignos.

Parte I – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra dirigido ao SARS-CoV-2

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), no qual foi realizado o meu estágio curricular, estava localizado no 3º piso da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no Polo I que, no contexto pandémico que atravessámos, permitiu dar uma resposta rápida à necessidade de maior testagem da população da região centro de Portugal. Ao haver uma maior testagem, foi possível identificar quais os casos positivos e, ao aplicar as medidas propostas pela Direção Geral de Saúde (DGS), tais como a sinalização dos casos positivos e isolamento dos contatos de risco, foi possível limitar o contágio pessoa-pessoa.

O laboratório, destinado à deteção e monitorização da infeção por SARS-CoV-2 encontra-se em funcionamento desde abril de 2020, de segunda a domingo, sendo o horário assegurado por três equipas, com horários rotativos. Cada equipa era constituída por cinco a seis elementos, entre eles farmacêuticos, biólogos, técnicos de análises clínicas e bioquímicos, sendo toda a parte administrativa também assegurada por assistentes administrativas. Tem como diretoras técnicas a Professora Doutora Ana Miguel Matos e Dra. Patrícia Madaleno, que asseguram a validação biopatológica dos resultados, e funcionamento adequado do laboratório.

Antes de abordar da atividade do laboratório, nomeadamente os métodos de diagnóstico laboratorial, é importante abordar, de forma breve, o vírus SARS-CoV-2, a sua origem, reservatório, epidemiologia e o seu mecanismo de infeção.

SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus identificado e responsável por infetar humanos. No entanto, é o terceiro coronavírus responsável por provocar um surto, nos passados 20 anos. O primeiro surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) teve origem na China, no fim de 2002¹ tendo como balanço final 8 098 infetados e 774 mortos. Seguido por um surto provocado pelo MERS-CoV² identificado em 2012, como causador da síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV), com o total de 858 mortes. Por fim, e já em 2019, surge o vírus SARS-CoV-2, responsável pela síndrome respiratória aguda provocada pelo coronavírus 2, que conta com 605 749 945 de infetados, 6 487 863 mortes e 580 943 965 recuperados.^{3,4} Este surto é responsável pela, agora chamada, pandemia, cujo início foi definido pela Organização Mundial de Saúde a 11 de março de 2020.⁵

Caracterização do SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, género betacoronavírus.⁶ Caracteriza-se por ser um vírus envelopado, com cápside helicoidal e genoma RNA cadeia simples de polaridade positiva (+) ssRNA.⁷ O virião tem, na sua constituição, 4 proteínas estruturais: as proteínas da nucleocápside (N), transmembranar (M), e do envelope (E), que facilita a adsorção do vírus às células alvo e Proteína *Spike* (S). O genoma viral codifica, também proteínas não estruturais (nsp), como a RNA transcriptase RNA dependente (RdRp).⁸

Origem e reservatório

A pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 não tem uma origem clara, e atualmente está ainda em investigação, mas é considerado pela maioria como tendo tido origem num mercado de peixe e marisco em Wuhan, sendo a hipótese de transmissão zoonótica a mais apoiada atualmente.⁹ O reservatório mais comum do SARS-CoV é o morcego. No entanto, e para conseguir atravessar a barreira e infetar o Homem, defende-se que tenha existido ou exista um hospedeiro intermediário que é, até hoje, indeterminado.¹⁰

Epidemiologia

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre pessoa-pessoa, através de aerossóis, libertados pelo nariz ou boca, aquando de tosse ou espirros. Estas gotículas podem ficar depositadas em superfícies, ou entrarem diretamente em contacto com uma pessoa próxima, através de contacto com olhos, nariz ou boca. O período de incubação desta infeção varia entre 1 e 14 dias após o contacto com o vírus.¹¹

Mecanismo de infeção

O vírus SARS-CoV-2 quando entra em contacto com o organismo e numa fase inicial, tende a procurar os tecidos para os quais tem maior afinidade. A este mecanismo dá-se o nome de tropismo. No caso do SARS-CoV-2, as células para as quais tem tropismo são as células do aparelho respiratório, onde o recetor celular deste vírus, a enzima conversora de angiotensina II (ACE2), se encontra em maior quantidade. A maior infecciosidade, associada a este vírus, deve-se a uma mutação que sofreu na proteína *Spike*, que lhe conferiu uma maior afinidade para o recetor ACE2.^{11,12}

Além do recetor, este necessita também da protease presente no hospedeiro, para que haja clivagem da proteína *Spike* e, assim, consiga entrar na célula hospedeira. Depois da entrada, o vírus vai libertar o seu mRNA para o citoplasma da célula hospedeira, onde o

RNA vai ser traduzido em proteínas, necessárias para a montagem de novas partículas virais que, posteriormente, serão libertadas pela membrana plasmática.¹¹

Manifestações clínicas

Os sintomas, após a infeção, variam consoante a gravidade da doença. As principais manifestações clínicas são febre, tosse, dores de garganta e musculares. Também pode provocar, em casos mais graves, pneumonia, síndrome respiratória aguda grave ou morte. A ausência de sintomas define a infeção assintomática, que contribui para o aumento da propagação do vírus e aumento da dificuldade no controlo da sua transmissão.¹¹

Vacinação

Um dos maiores passos para o controlo da pandemia foi o desenvolvimento de vacinas que permitissem criar uma resposta humoral, com células de memória, e produção de anticorpos, sem que houvesse contacto com o vírus vivo. A administração das vacinas permitiu, à escala global, o desenvolvimento de imunidade e o controlo do número de internamentos e mortes, aliviando o sistema nacional de saúde.¹³

Em Portugal foi desenhado o plano nacional de vacinação a 3 de dezembro de 2020 de forma a, consoante a prioridade, vacinar toda a população, e prevenir os sintomas graves e complicações da doença e, assim, tentar controlar a evolução da pandemia. Inicialmente foram definidos grupos prioritários para a vacinação, de acordo com a idade de comorbilidades associadas a cada indivíduo.¹⁴

As vacinas aprovadas pela agência europeia do medicamento (EMA) para administração à população têm, na sua constituição, uma molécula de mRNA que contém informação para codificar a proteína S do vírus, produzindo, assim, resposta imune temporária, com produção de anticorpos. Em Portugal foram autorizadas a Vacina Spikevax[®], Cominarty[®], Vaxzevria[®] e Janssen[®]. As vacinas Spikevax[®] e Cominarty[®] utilizam a técnica do mRNA recombinante que codifica para a proteína S viral, variando nos tempos de administração das diferentes doses.^{15,16} A vacina Vaxzevria[®] utiliza adenovírus modificado, que contém o gene que codifica a proteína S viral¹⁷ e a vacina Janssen utiliza um vetor viral recombinante que contém DNA que codifica para a proteína S viral.¹⁸

Diagnóstico laboratorial

Na altura em que decorreu o meu estágio, o diagnóstico laboratorial era feito através da utilização do método de referência – qRT-PCR (*Real Time Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), sendo utilizado principalmente por ser um método sensível,

rápido e específico. Neste método eram detetados pelos menos dois genes, de entre o gene S (que codifica a proteína *Spike*), o gene E (que codifica o invólucro), o gene N (que codifica a nucleocápside) e o gene RdRp (que codifica a RNA dependente da RNA polimerase), que são específicos do SARS-CoV-2. Um caso positivo considerava-se confirmado laboratorialmente quando havia deteção de pelo menos dois alvos distintos do genoma, sendo um deles específico do SARS-CoV-2.¹⁹

Também eram utilizados outros métodos, tais como testes rápidos para a deteção qualitativa de antígenos SARS-CoV-2 e testes indiretos para deteção qualitativa de anticorpos SARS-CoV-2. A validação do teste rápido era efetuada por comparação com o teste de referência qRT-PCR e o teste serológico era utilizado como indicador da imunidade do indivíduo, não como meio de diagnóstico.²⁰

Caracterização do laboratório

No LACUC, e para a realização destes métodos de diagnóstico, trabalhava-se em condições de biossegurança nível 3 (BSL-3), que permitia o manuseamento das amostras biológicas com a maior segurança possível, tentando impedir contaminações, quer das amostras, quer dos colaboradores que as manuseavam. O BSL-3 permite a manipulação de agentes patogénicos, tais como o coronavírus, que em condições normais provocam doença e são altamente transmissíveis por via respiratória através de aerossóis.²¹

O laboratório estava dividido em duas secções – administrativa e analítica. A atividade do laboratório iniciava-se na entrada/receção, onde havia a entrada de amostras, para posteriormente serem triadas e processadas.

As amostras chegavam ao laboratório dos mais variados locais da região Centro, entre eles o Instituto Português de Oncologia (IPO), Clínica IBERVITA (IBERVITA), Centro de Medicina de Reabilitação da Região Centro (Rovisco Pais), Agrupamento de Centros de Saúde de Dão Lafões (Dão-Lafões), Administração Regional de Saúde do Centro (ARSC), Medicina Legal (ML), Drive in (Figueira da Foz e Coimbra) Rastreios UC, bem como a título pessoal, tais como pessoas que tinham viagens para Madeira (MA) e Açores (AZ) e associações desportivas que tinham protocolos com o laboratório.

Na secção de processamento de amostras tínhamos a antecâmara, onde se colocavam os equipamentos de proteção individual (EPI). O EPI incluía touca, óculos de proteção, máscara FFP2, fato de proteção integral, bata resistente a fluídos, duas capas de proteção para os sapatos e dois pares de luvas. No seguimento das instalações tínhamos a

antecâmara de inativação, onde eram preparados os tubos com líquido de inativação (usados para inativar o vírus) e sala de inativação. Desde a entrada na primeira antecâmara até à sala de inativação, todo o material tinha um fluxo unilateral e todo o material contaminado era colocado no lixo considerado perigo biológico, para posteriormente ser incinerado.

Após inativação e preparação das amostras, nas câmaras de fluxo laminar, estas eram entregues à área de processamento, já com o vírus inativo, estando prontas para entrar no extrator e posteriormente no termociclador, correspondendo às áreas de extração e amplificação, respetivamente.

Todos os resultados obtidos necessitavam de validação biopatológica, que era feita na área de validação do laboratório.

Fase pré-analítica

A fase pré-analítica envolve todos os procedimentos antes da análise propriamente dita da amostra. Esta fase incluía a colheita da amostra, a sua receção e registo no sistema informático. Nesta fase era muito importante a verificação da identificação e etiquetagem das amostras colhidas e recebidas, para que, a cada tubo correspondesse um utente e pedido de teste associado.

Fase analítica

Amostras

As amostras que chegavam ao laboratório eram colhidas por zaragatoa da região nasofaríngea, para a deteção de genoma viral e de antigénio. Para a deteção de anticorpos (serológica), a amostra de eleição era soro.

Equipamentos utilizados

O laboratório tinha diferentes equipamentos para as diferentes determinações analíticas – deteção de genoma viral e anticorpos para o SARS-CoV-2, que estão descritos na tabela abaixo, assim como os objetivos e métodos de deteção utilizados. Estes métodos são distintos consoante o interesse em saber se a infeção está ativa (RT-qPCR e teste rápido) ou se já teve a infeção, ou foi vacinado e, de alguma forma, produziu uma resposta celular e posteriormente resposta humoral, que vai ser detetada pelo método serológico.

A deteção de antigénio viral não era feita num equipamento automatizado, mas manualmente, através da utilização de uma cassette (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) que utiliza imunoensaio qualitativo para deteção de antigénio viral.

Tabela I - Equipamentos utilizados no LACUC

Equipamento utilizado	Método de detecção	Objetivo
Extrator m2000 sp e Termociclador m2000 rt	<i>Polymerase chain reaction</i> com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)	Deteção do genoma viral por biologia molecular
VIDAS®	Imunoensaio qualitativo	Deteção de anticorpos SARS- CoV-2 (serologia)

Deteção do genoma viral

A metodologia para deteção do genoma viral do SARS-CoV-2 dividia-se em vários passos, entre eles: inativação do vírus, extração de ácidos nucleicos e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) em tempo real. Na técnica utilizada, os alvos eram os genes que codificavam para a proteína estrutural N (nucleocápside) e não estrutural RdRp (RNA polimerase). A reação de amplificação e deteção era necessária para ser possível o diagnóstico da infeção, uma vez que a quantidade de RNA presente na amostra direta, podia não ser suficiente para a sua deteção.

Inativação do vírus

Para a extração do RNA e posterior amplificação por PCR, era necessário fazer a inativação viral. A inativação do vírus era feita com 750 µL de líquido de inativação (tiocianato de guanidina + detergente) e 750 µL da amostra. Todo este processo permitia o manuseamento da amostra numa fase posterior, nomeadamente na extração do RNA, de forma segura, uma vez que nesta fase o vírus perde a sua infecciosidade.

Durante esta fase era sempre necessário que fossem cumpridos todos os procedimentos de segurança, para que não houvesse a contaminação do operador ou das superfícies fora da câmara de fluxo laminar. No final de cada inativação, era necessário desinfetar todas as superfícies e a câmara de fluxo laminar com álcool a 70%, bem como todo o material utilizado. A parte exterior do EPI (touca, bata, segundo par de luvas e segundo par de proteção de calçado) era também descartada.

Extração do RNA viral

Para a extração viral existia um conjunto de reagentes que permitiam a extração dos ácidos nucleicos e remoção de possíveis inibidores da amplificação das amostras. A extração do RNA viral era feita no extrator automatizado, na unidade de preparação da amostra (sp),

que pertence ao equipamento da *Abbott m2000 Real-time System*. Neste equipamento há um fluxo unidirecional, da esquerda para a direita, que diminui a possibilidade de contaminação das amostras, no decorrer do procedimento.

Os viriões do SARS-CoV-2 são desnaturados pela ação do tiocianato de guanidina e as membranas são destruídas pelo detergente *Tween* (presentes no reagente *Lysis*). Assim, os ácidos nucleicos livres, vão ser capturados por micropartículas magnéticas (presentes no reagente *Microparticles*). Os inibidores e componentes que não estão ligados, vão ser removidos pelas soluções *Wash*.

Por fim, os ácidos nucleicos retidos nas micropartículas eram eluídos, com auxílio de um tampão fosfato (presente no reagente *Elution Buffer*), de forma a poderem ser amplificados pela técnica de PCR.

De forma a ser possível fazer um controlo de eficácia dos passos de extração e amplificação, era adicionado o controlo interno ao reagente *Lysis*. O controlo era pipetado juntamente com o reagente para todas as amostras. Consistia numa sequência de RNA diferente da sequência do SARS-CoV-2 a amplificar, que era amplificada em simultâneo. Também se utilizava um controlo positivo, controlo negativo e água isenta de RNAses em cada corrida, que eram processados, cada um deles em separado, como as restantes amostras.

Todos estes passos permitiam que, no fim da extração, tivéssemos as sequências alvo (codificantes para N e RdRp), com o mínimo de interferentes e inibidores possível, de modo a serem amplificadas e detetadas nas melhores condições, garantindo a qualidade e fiabilidade dos resultados.²²

Preparação para a RT-qPCR

A preparação para a amplificação ocorria ainda no m2000 sp e culminava na preparação da placa de reação de 96 poços (*Optical Reaction Plate*), que era ser utilizada no m2000 rt, para a amplificação das sequências alvo, presentes nas respetivas amostras.

Esta preparação consistia na mistura dos reagentes de amplificação com o RNA eluído. O KIT de amplificação era constituído por: 6 primers (4 complementares aos genes alvo – gene N e RdRp e dois complementares ao controlo interno), 3 sondas (correspondentes às sequências a amplificar), dNTPs, molécula fluorescente ROX; enzima polimerase termoestável (rRTh), derivada da *Thermus thermophilus* e que apresentava

atividade de transcriptase reversa na presença de manganês;²³ e reagente de ativação, que funcionavam como co-fator da enzima porque tinha na sua constituição manganês.²⁴

RT-qPCR

A placa de 96 poços era transferida para o equipamento *Abbott m2000 rt* após a sua preparação. A reação de PCR tem diferentes etapas: conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa; amplificação do cDNA pela *Taq DNA Polymerase* e detecção dos produtos amplificados em tempo real.²⁵

A amplificação era feita através de ciclos de aquecimento que permitem a desnaturação, hibridização e extensão das sequências de RNA, sendo as temperaturas de aquecimento 95°C, 60°C e 72°C, respetivamente para os três ciclos.²⁶

Inicialmente o RNA era convertido em cDNA pela DNA polimerase com atividade de transcriptase reversa. Os primers complementares dos genes alvo e controlo interno ligam-se à cadeia de RNA, e a cadeia complementar é prolongada, formando uma cadeia simples complementar (ssDNA). Com a temperatura elevada, há desnaturação das duas cadeias e há ligação do segundo primer à cadeia de DNA complementar, que vai ser prolongada pela DNA polimerase (rRTh polimerase), formando DNA de cadeia dupla (dsDNA).

A cada ciclo, com a variação das temperaturas, há desnaturação das cadeias, e o ciclo repete-se, havendo duplicação do número de cópias da sequência alvo. No fim dos 37 ciclos de amplificação, obtém-se uma amplificação exponencial. Assim, o número de cópias obtidas no fim da amplificação vai ser proporcional ao número de cópias iniciais.

A detecção das sequências dos genes alvo era feita com recurso a sondas fluorescentes específicas (*TaqMan*). As sondas utilizadas consistiam numa sequência de oligonucleótidos sintéticos, que eram complementares aos genes alvo. Estas sondas são marcadas com fluoróforo, ligavam-se à extremidade 5' e um *quencher* estava ligado na extremidade 3'. A emissão de fluorescência estava dependente da sua hidrólise e excitação a um comprimento de onda específico.

Quando os genes alvo não estavam presentes, a sonda permanecia intacta e a emissão do fluoróforo era absorvida pelo *quencher*. Quando os genes alvo estavam presentes, a sonda hibridizava com a sequência complementar, havia quebra da cadeia e, por sua vez, emissão de fluorescência.

As sondas específicas dos genes que codificam para as proteínas do SARS-CoV-2 (sequências alvo) eram marcadas com o mesmo fluoróforo, ao contrário do controle interno, que estava marcado com um fluoróforo diferente. Isto permitia detetar simultaneamente diferentes genes do vírus no mesmo poço e a deteção do gene do controle interno.

Validação dos resultados e interpretação das curvas obtidas

Quando terminava a amplificação, era feita a interpretação da curva de amplificação obtida. As amostras e respetivos controlo negativo e positivo tinham uma curva de amplificação associada. Nas curvas resultantes era lida a fluorescência (y) em função do número de ciclos de amplificação (x). Para interpretar as curvas de amplificação é necessário compreender o que significa ciclo *threshold* (C_t) e linha *threshold* (T_h). A linha T_h , corresponde ao nível basal a partir do qual já é possível detetar a emissão de fluorescência, e o C_t corresponde ao número de ciclos necessário para o sinal de fluorescência seja igual a T_h e haja deteção de fluorescência. De forma geral, podemos considerar que quanto menor for o ciclo no qual é detetada fluorescência, maior a carga viral associada.²⁶

Em cada curva podia ser observada a fluorescência do controlo interno e da amostra, em simultâneo. O controlo interno permite a validação dos procedimentos analíticos e da qualidade da amostra, principalmente em termos de inibidores e contaminantes, uma vez que é processado em simultâneo com a amostra, nas mesmas condições.

Em termos de controlo negativo e positivo, ambos tinham uma curva de amplificação, em separado. No controlo positivo, havia deteção da sequência presente no controlo, com os dois genes a detetar (N e RdRp), o que garantia que a amplificação das sequências virais estava a ocorrer sem interferentes, que na amostra, quer nos reagentes, que pudessem interferir na amplificação da sequência alvo. Já no controlo negativo não havia qualquer tipo de amplificação, por não ter os genes alvo, encontrando-se, a sua deteção abaixo da linha *threshold*. Isto permitia averiguar possíveis contaminações e, assim, ajudar a minimizar os resultados “falsos positivos”.

A análise da amostra água sem RNAses foi um acrescento, uma vez que não era especificado pela casa comercial. Esta permitia ainda ter uma confirmação de possível contaminação, e também não era esperado qualquer tipo de amplificação e deteção.

O controlo da fluorescência (referência) era feito pela molécula fluorescente ROX, que permitia averiguar se a leitura de fluorescência estava a ser correta, uma vez que o seu

valor de fluorescência é constante. A interpretação da curva dava informação sobre o correto funcionamento do equipamento de leitura de fluorescência e, por ser adicionada juntamente com os restantes reagentes do KIT de amplificação, permitia saber se os reagentes foram adicionados corretamente.

Só quando estes controlos estão em concordância com o expectável é que é possível a validação da curva de amplificação.

A interpretação da curva de amplificação das amostras pode levar a 3 resultados: positivo, negativo ou inconclusivo. Para resultados positivos, há deteção de fluorescência das sequências alvo presentes na amostra e, por consequência, a linha de amplificação sobrepõe-se e ultrapassa a linha *threshold*. Para resultados negativos, não há emissão de fluorescência das sequências alvo, e a linha de amplificação mantém-se abaixo da linha *threshold*. Para resultados inconclusivos, temos um Ct da sequência alvo superior a 31,5. Este valor resulta de uma amplificação tardia, e que pode ser influenciada pela carga viral no momento da colheita. Isto pode ser explicado por uma carga viral baixa, resultante do início ou fim da infeção por SARS-CoV-2; O resultado inconclusivo também é dado em situações onde se obtém uma curva não padronizada e que não permite uma interpretação clara do resultado e se houver falha do controlo interno, não podendo ser validado o resultado.

Controlo de qualidade

Para cada técnica e equipamento, é necessário fazer o controlo de qualidade, de modo a podermos aceitar os resultados obtidos e dá-los como verdadeiros.

O controlo de qualidade interno era fornecido pela mesma empresa do equipamento utilizado no laboratório – *Abbott*. Consiste numa sequência de um gene de abóbora, em plasma negativo. A sequência é totalmente diferente das sequências alvo do SARS-CoV-2 e é adicionado ao regente de lise durante a sua preparação. Este controlo permite demonstrar que a análise ocorreu de forma correta em cada amostra e, por sua vez, houve amplificação das sequências alvo, sem a presença de interferentes que possam inibir a amplificação.

O controlo positivo consistia numa solução tampão com genes específicos para o SARS-CoV-2 (gene N e RdRp) inseridos num plasmídeo recombinante; o controlo negativo consiste também numa solução tampão, mas sem os genes específicos.

Na análise dos gráficos obtidos, a curva dos controlos tem de corresponder ao negativo e positivo, e a água também tem de dar negativo. Deste modo, a água permite também aferir se há contaminações no equipamento, que podem inibir a reação PCR.

O controlo externo da qualidade era feito em parceria com o *LabQuality*, que envia ao laboratório uma amostra cega, da qual não há nenhuma informação quanto ao resultado expectável. Era processada e o resultado era dado de igual forma às restantes amostras processadas em laboratório. Por fim, o resultado enviado para o laboratório externo que, passado algum tempo, indicava se o resultado obtido se encontra dentro dos valores de referência, esperados para aquela amostra. Este tipo de controlo permitia fazer uma comparação do método utilizado no nosso laboratório e restantes que tenham participado no plano de controlo de qualidade.

Deteção de antigénio

O teste rápido para deteção de antigénio é um imunoensaio qualitativo que deteta a proteína da nucleocápside do SARS-CoV-2.²⁷ É utilizado em amostras respiratórias da nasofaringe²⁸ e tem como base a reação entre antigénio viral, presente ou não na amostra e os anticorpos presentes na tira de teste.²⁹

O dispositivo de teste era composto por uma linha de teste (T) e uma linha de controlo (C). A linha de teste estava revestida com anticorpos anti-SARS-CoV-2 e a linha de controlo estava revestida com anticorpo monoclonal de murganho anti-galinha. Na membrana tinha ainda partículas de ouro conjugadas com anticorpo específico contra o Ag SARS-CoV-2 e partículas de ouro conjugadas com anticorpo de galinha. Se a amostra contivesse antigénio viral, este ligava-se ao anticorpo anti-SARS-CoV-2, que estava conjugado à partícula de ouro e migrava até à linha T, formando uma linha visível. O conjugado de ouro com o anticorpo de galinha migrava até à linha C e ocorria a ligação deste anticorpo com o anticorpo imobilizado na linha, provocando o surgimento da linha de controlo.³⁰

Na prática, depois de serem preparados os KITS para a colheita da amostra, que incluíam a preparação de cada tubo de extração com solução tampão, e depois de preparados todos os procedimentos de segurança, de forma a poderem ser manuseadas as amostras, eram colocadas 5 gotas da amostra, previamente misturada com tampão, no dispositivo de teste e o cronómetro era programado para 15 minutos. Após esta preparação, havia migração da amostra na janela teste e era possível proceder à leitura dos resultados, desde que se conseguisse observar a linha controlo. O aparecimento desta linha certificava que a amostra e o controlo tinham percorrido toda a janela do teste. A presença de uma linha de teste e controlo dava um resultado positivo.

Atualmente, esta técnica pode ser utilizada como meio de diagnóstico de infecção, em contexto de surto, uma vez tem um resultado muito mais rápido e permite a implementação de medidas necessárias de forma mais rápida e eficaz. No entanto, um resultado negativo, não exclui infecção por SARS-CoV-2²⁷

Controlo de qualidade

O controlo de qualidade interno era assegurado pela linha de teste e apenas quando esta linha surge é que podíamos validar o resultado.

Deteção de anticorpos

A deteção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 era feita de forma qualitativa, e permitia a deteção de imunoglobulinas IgG e IgM. Para estas determinações eram utilizados dois testes: VIDAS[®] SARS-CoV-2 IgM para deteção de IgM específicas e VIDAS[®] SARS-CoV-2 IgG para deteção de IgG específicas. Com estas determinações podíamos averiguar se indivíduos estiveram ou não expostos a SARS-CoV-2, se a vacinação permitiu ou não a produção de resposta humoral e se houve uma resposta imune específica IgM ou IgG.³¹

A deteção serológica é um imunoensaio do tipo *sandwich* em duas etapas com deteção final em fluorescência (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescence Assays*). O princípio de funcionamento do equipamento aplicava-se às duas determinações. As IgG e IgM eram capturadas por um domínio recombinante do SARS-CoV-2, mais especificamente da proteína *Spike*, que estava retido numa fase sólida, no cone (*Solid Phase Receptacle* - SPR). A amostra era colocada no primeiro poço da barrete, e era aspirada pelo cone. O anticorpo da amostra ligava-se ao antigénio do cone. O anticorpo secundário marcado com substrato enzimático ligava-se ao anticorpo primário, presente na amostra.³² No último poço tínhamos o substrato, que nos permitia a leitura do produto formado entre antigénio e anticorpo.

Estes testes têm como principais vantagens a celeridade no tempo de resposta³³ uma vez que é um ensaio automatizado simples, e a principal vantagem é o tipo de informação que nos fornece. Numa escala temporal, este teste foi adquirindo cada vez mais importância, uma vez que o de biologia molecular RT-qPCR ou a presença de antigénio no teste rápido, não deteta infeções passadas.³⁴ É também de elevada importância a avaliação da produção de anticorpos aquando da vacinação, de modo a verificar se está a ter a resposta imune pretendida. Os anticorpos resultantes da vacinação são anticorpos IgG e IgM produzidos contra a proteína S viral. Quando há infecção por SARS-CoV-2, os anticorpos produzidos são contra a proteína S, mas também contra outras proteínas virais, tais como a N

(Nucleocápside). Desta forma, e ao detetar simultaneamente as duas proteínas, será possível distinguir a origem dos anticorpos.

Atualmente, é possível a deteção de anticorpos que são produzidos através da vacinação, assim como a deteção de anticorpos produzidos durante a infeção por SARS-CoV-2. A duração destes anticorpos, e a rapidez com que baixam é ainda uma questão que não está totalmente esclarecida, e que será o próximo passo, para que sejam programados os novos reforços da vacinação, sempre que necessário.³⁵

Controlo de qualidade

O controlo de qualidade desta técnica é feito mensalmente, através da utilização de controlos positivo e negativo. São colocados nas *racks* como amostras e a sua leitura é feita no equipamento. Consoante os resultados obtidos, será importante perceber se os resultados obtidos são fidedignos e reproduzíveis e, assim, agir em conformidade.

Parte II – Laboratório Central do Porto do grupo Germano de Sousa

Caracterização do laboratório

O Laboratório Central do Porto do grupo Germano de Sousa faz parte da rede de laboratórios do grupo, que dá resposta a mais de 90 postos de colheita, espalhados pela zona norte do país. Todo o Grupo Germano de Sousa tem como princípio base a entreajuda e o contacto próximo entre o analista e o médico.

É administrado pelo professor Dr. Germano de Sousa, professora Dra. Maria José Rego de Sousa e Dr. José Germano de Sousa, todos eles médicos patologistas, que assumem um papel preponderante na ligação entre o laboratório e o médico. No Laboratório Central do Porto o diretor técnico é o Dr. José Fleming Torrinha, também médico patologista.

Organização laboratorial

O laboratório é constituído por várias secções: colheitas, triagem, hematologia, citometria de fluxo, bioquímica, imunologia, microbiologia e biologia molecular, incluindo esta última a área dedicada à deteção do SARS-CoV-2. Estas secções dão resposta a, aproximadamente, 2000 análises por dia. A equipa que permite dar resposta aos diferentes pedidos é constituída por técnicos de análises clínicas, técnicos superiores de saúde, farmacêuticos especialistas em análises clínicas, médicos patologistas, entre outros.

O departamento administrativo inclui a receção e sala de conferência e faturação, onde é feita a abertura, conferência e faturação dos estudos analíticos, para poderem ser processados e analisados nos respetivos setores.

O departamento de qualidade garante o cumprimento de todos os requisitos de qualidade, pelos quais se rege o laboratório. A norma de certificação do laboratório é a 9001:2015. A qualidade é garantida neste laboratório através de diversos parâmetros, com programas de qualidade interna e externa, sendo gerida por um gabinete próprio, que tem como responsável a Dra. Eduarda Figueiredo.

As diferentes amostras são encaminhadas através de um percurso denominado “clean”, que consiste na organização das bancadas consoante as amostras que utilizam, permitindo um circuito de amostras o mais direcionado possível.

A área laboratorial, tendo em conta este percurso, inicia-se na zona da triagem, onde se encontram todos os produtos biológicos, que serão registados no sistema informático e passarão para as diferentes secções.

Após a triagem, temos a secção da hematologia, que inclui a subsecção de coagulação, onde há o controlo dos hipocoagulados e determinação dos parâmetros da coagulação e a subsecção que faz a determinação do hemograma, plaquetas, velocidade de sedimentação e hemoglobina glicada (pertencente à secção da bioquímica). A secção de citometria funciona de forma independente.

De seguida, temos a secção da bioquímica e imunologia, que funcionam em conjunto, uma vez que o equipamento principal automatizado, *Atellica solution V*, e o respetivo produto biológico utilizado para determinação analítica é comum – soro. A bioquímica e a microbiologia utilizam frascos de urina e respetivas alíquotas, apesar de não se situarem na mesma bancada de trabalho, como explico a seguir.

Equipamentos utilizados

Todas as secções laboratoriais têm equipamentos automatizados específicos e adequados às suas determinações analíticas. Como existem determinações se complementam, existem equipamentos automatizados que funcionam em simultâneo para duas ou mais áreas laboratoriais (Anexo I).

Fase pré-analítica

Colheitas

Para se proceder à colheita da amostra biológica, há o registo do pedido de análise, tendo como objetivo a associação do estudo requisitado pelo médico ao tipo de colheita e material necessário. As salas para colheita de produtos biológicos são divididas em duas áreas distintas: área COVID e área não-COVID. Na área COVID são realizadas colheitas com zaragatoa seca na região nasofaríngea, nas duas narinas. Esta área não será abordada nesta parte do relatório, uma vez que consta na primeira parte referente ao LACUC. Na área não-COVID procede-se à colheita de sangue, urina, exsudados, etc., utilizando o material adequado.

Material de colheita

Os diferentes materiais de colheita são destinados às diferentes áreas laboratoriais, e são específicos para cada análise. Entre as amostras mais pedidas temos o sangue total de EDTA, plasma de citrato trissódico, soro proveniente de tubo com gel separador, urina (ocasional e de tempo determinado), fezes, exsudados (vaginal, uretral), expetoração e pus.

A escolha dos tubos e restante material de colheita é de extrema importância, uma vez que cada tubo tem especificações para cada determinação analítica. A secção de hematologia utiliza o tubo que contém ácido etilenoamino tetra-acético (EDTA), uma vez que este permite a preservação da morfologia das células, e impede a formação do coágulo. O tubo utilizado na secção de bioquímica/imunologia tem um gel separador, com ativador de coagulação que permite a separação do soro dos restantes constituintes sanguíneos. Por fim, o tubo utilizado nas provas de coagulação contém citrato trissódico, que impede a coagulação, ao atuar na cascata de coagulação, funcionando como conservante de plaquetas.³⁶

Após a colheita e transporte, as amostras são entregues à secção da triagem, para serem encaminhadas, consoante as análises pedidas, para a secção correspondente.

Triagem

Esta secção funciona como “porta de entrada” do laboratório, e é a este local que chegam todas as amostras que vão ser processadas nas diferentes áreas. As amostras são provenientes dos postos de colheita, da sala de colheitas do próprio laboratório, referida anteriormente, e de hospitais externos.

Entrada das amostras e distribuição pelos setores laboratoriais

A triagem dá entrada de todos os produtos e confirma que todos estão devidamente etiquetados e identificados, para que não haja erros analíticos provenientes de uma má identificação ou acondicionamento incorreto.

A identificação consiste numa etiqueta impressa aquando da abertura do estudo analítico e a cada utente corresponde uma sequência de três letras e quatro números, que varia consoante o posto de colheita/hospital onde foi realizada a colheita. No caso do Laboratório Central do Porto a sequência correspondente é LTP (Laboratório Trindade Porto). Consoante o pedido de análise, a etiqueta correspondente vai ter associada uma extensão de produto (por exemplo: soro 0100; EDTA 0200, etc.), para que seja mais facilmente associado o produto pedido à análise pretendida.

Conformidade das amostras

A importância desta secção prende-se muito pela verificação da conformidade das amostras, utilizando diferentes parâmetros.

Uma das principais falhas registadas é a troca de extensão de produto, ou seja, durante a identificação das diferentes amostras é colocada a etiqueta com uma extensão diferente da do produto correspondente (por exemplo tubo de EDTA com extensão 0100), o que resultaria no não processamento por parte do equipamento automatizado, por não reconhecer a extensão do produto.

Além da verificação destas falhas, há também a observação do aspeto macroscópico das amostras (pode observar-se hemólise ou presença de coágulos, que podem interferir nos resultados obtidos), e a verificação das condições de transporte e acondicionamento das amostras. Contudo, a decisão para rejeição ou não da amostra é da responsabilidade da secção que vai dar resposta às análises pedidas.

Assim, é assegurada a viabilidade, estabilidade e conformidade de todas as amostras, de forma a garantir que tudo o que entra dentro do laboratório está conforme, podendo ser processado e analisado.

Serviço ao exterior

A esta secção chegam, também, amostras de alguns hospitais, que têm protocolos com o laboratório. Juntamente com as amostras chegam também as requisições médicas e são criadas listas de trabalho que permitem o envio das diferentes amostras para os

diferentes setores e laboratórios que fazem parceria e complementam as análises realizadas no Laboratório do Porto.

Fase analítica

Depois de selecionadas as amostras conformes, estas encaminhadas para a área de processamento do laboratório, que funciona com um circuito limpo de amostras, mencionado anteriormente. Existem algumas particularidades no que diz respeito à organização das bancadas de trabalho dos diferentes setores, nomeadamente a subsecção de urinas. Esta subsecção abrange diferentes áreas e permite a separação de todos os pedidos de análises que podem ser realizados em amostra de urina, quer ocasional, quer de tempo determinado.

Os setores principais são: bioquímica, imunologia, hematologia e microbiologia. Todos eles serão abordados a seguir, e de forma mais aprofundada o setor da bioquímica e hematologia.

Bioquímica

A secção de bioquímica é a que tem maior volume de amostras diário, e todas as análises bioquímicas são feitas nesta área, à exceção da análise de urina, que é feita numa subsecção dedicada à preparação das urinas para as restantes secções. A determinação da hemoglobina glicada também é realizada na secção da hematologia, por uma questão de comodidade, uma vez que esta análise é feita em sangue total de EDTA, ao contrário das restantes, que são realizadas em soro.

A amostra mais utilizada é o soro, que é obtido por centrifugação a 3100 rpm, durante 10', utilizando um tubo com gel separador, com ativadores da coagulação. Quando a amostra chega a esta secção e, consoante os pedidos de determinações, esta é colocada nos diferentes equipamentos, referenciados anteriormente, e consoante o grau de prioridade, é definida a ordem de entrada no equipamento principal – *Atellica solution V*. Quando os estudos são abertos como imediatos, as amostras são colocadas em *racks* de urgência, lidas pelo equipamento, e processadas da forma mais rápida possível, ultrapassando as amostras cujos estudos têm prioridade normal. Depois de fazer a leitura e processar as amostras, funciona como uma pequena “triagem” desta secção. Para isso, consoante os restantes pedidos, as amostras são colocadas em diferentes posições das *racks* de saída, que correspondem ou aos restantes equipamentos: *Liaison* e *Minicap* ou aos estudos que já se encontram completos, cujas análises foram todas determinadas no próprio equipamento.

As determinações analíticas feitas nesta área permitem o estudo de alterações tanto nas vias metabólicas como funções de determinados órgãos, através da determinação de marcadores específicos. As determinações analíticas permitem, muitas vezes, compreender essas alterações e, juntamente com o clínico, chegar a um diagnóstico e possível tratamento da patologia.

Metabolismo dos hidratos de carbono

A fonte dos glúcidos/hidratos de carbono no organismo pode ser endógena e/ou exógena. Estas moléculas são utilizadas, maioritariamente, para a obtenção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), que é a maior fonte de energia utilizada no funcionamento dos órgãos e organitos celulares.

No contexto laboratorial, a glicose pertence à classe das determinações mais pedidas, uma vez que a sua homeostase é a chave para o metabolismo dos glúcidos. A sua determinação pode ser feita de forma direta ou indireta. Os níveis de glicose são regulados pelas hormonas insulina e glucagina. Quando a glicose aumenta na corrente sanguínea (momento pós-prandial), há produção de insulina pelo pâncreas, o que ativa as vias metabólicas que utilizam glicose. Ao ser utilizada, a sua concentração diminui na corrente sanguínea, regressando aos níveis basais. Quando há diminuição da glicose, há produção de glucagina, que vai levar a utilização de vias metabólicas que resultam na sua síntese.

As alterações neste metabolismo, em diferentes indivíduos podem ter diferentes causas e conduzir a situações distintas: níveis muito elevados de glicose (hiperglicémia) ou níveis baixos (hipoglicémia).

Tabela 2 - Determinações analíticas para avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Glicose	Hexoquinase-glicose-6-fosfato desidrogenase	70-110 mg/dL
Hemoglobina glicada	Cromatografia de alta eficiência (HPLC)	4,3-6,1 %
PTGO	Hexoquinase-glicose-6-fosfato desidrogenase aos 0', 30' e 120' após ingerir 75g de glicose	

Determinação da glicose

Ao determinar os níveis de glicose e com o auxílio das curvas de glicemia, é possível associar o mecanismo à diferentes situações. A hiperglicemia pode ser provocada por dois mecanismos: não produção de insulina (diabetes tipo 1) ou resistência à insulina (diabetes tipo 2). A curva elevada ao longo do tempo pode também estar associada a outras doenças que não a diabetes, onde há desregulação hormonal, e que provoca alterações nas vias de utilização da glicose, por exemplo na tirotoxicose, em que há uma produção excessiva das hormonas da tiroide – T3 e T4, responsáveis pelo aumento do metabolismo da glicose.³⁷ Os casos de hipoglicemia podem ocorrer quando há produção em excesso de insulina, por exemplo.

Determinação da hemoglobina glicada

Para fazer a diferenciação do tipo de hiperglicemia (diabetes ou tirotoxicose, por exemplo) faz-se a determinação da hemoglobina glicada, que aparece aumentada no caso da diabetes e quando os níveis de glicose estão aumentados durante grandes períodos. A sua permanência no organismo é mais prolongada que a glicose, uma vez que esta se liga à hemoglobina, o que permite uma avaliação retrospectiva dos níveis de glicemia durante 3 meses. Esta determinação permite o diagnóstico da diabetes (Se HbA1c > 6,5%) ou a monitorização destes pacientes.³⁸

Prova de tolerância oral à glicose (PTGO)

Quando não há um aumento dos níveis de glicose, e não existe um alerta para estes níveis, não é possível fazer o doseamento da glicose da forma convencional, uma vez que não há resposta fisiológica que contraria os níveis elevados ou baixos de glicose. Nestes casos, pode ser realizada a prova de tolerância à glicose para o diagnóstico da diabetes. O diagnóstico pode ser feito se forem obtidos valores superiores a: 125 mg/dL aos 30' ou 200 mg/dL após 60'.³⁹ Esta prova permite tirar conclusões sobre a resposta do utente a concentrações elevadas de glicemia ao longo do tempo.

Metabolismo lípidos

A avaliação do metabolismo lipídico também pertence à categoria de análises mais pedidas no setor da bioquímica. As alterações neste metabolismo podem ser avaliadas recorrendo a marcadores de risco de doença cardiovascular que, ao serem detetados precocemente, permitem uma intervenção atempada e uma consequente diminuição da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares.⁴⁰

Os elementos desta classe de moléculas têm diferentes funções no organismo, tais como: precursores hormonais, função estrutural e como fonte de energia. Por serem insolúveis nos fluidos biológicos, estes são transportados por moléculas – lipoproteínas.⁴¹

As lipoproteínas são separadas e classificadas tendo em conta a sua densidade, mobilidade eletroforética, tamanho, quantidade relativa de moléculas, tais como colesterol, triglicerídeos e proteínas expressas à superfície (apoproteínas). Dividem-se em cinco classes: quilomicron, *very-low-density lipoproteins* (VLDL), *intermediate-density lipoproteins* (IDL), *low-density lipoproteins* (LDL), *high density lipoproteins* (HDL).⁴²

As alterações no seu metabolismo são denominadas dislipidemias, e podem dever-se a alterações funcionais em qualquer fase do metabolismo lipídico.⁴² As dislipidemias estão associadas ao risco de doença cardiovascular aterosclerótica, traduzindo-se por um aumento dos níveis de LDL, colesterol, triglicerídeos e lipoproteína a (Lp(a)), assim como pela diminuição dos níveis de HDL. Os fatores secundários, como a diabetes tipo II, pancreatite e hepatosteatose também podem estar associados a estas alterações metabólicas.⁴³

No contexto laboratorial, é possível observar o aspeto macroscópico dos soros. Quando este é turvo, podemos inferir que tem uma quantidade de quilomicron superior à considerada normal. Isto acontece porque estas moléculas são consideradas grandes, e dispersam a luz, dando um aspeto “lipémico” ao soro.

Tabela 3 - Determinações analíticas utilizadas na avaliação do metabolismo lipídico

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Colesterol total	Método enzimático (conversão colesterol oxidase-esterase)	< 200 mg/dL
Colesterol HDL	Método enzimático colorimétrico direto	30-70 mg/dL
Colesterol LDL	Método enzimático colorimétrico direto	< 160 mg/dL
Triglicerídeos	Método enzimático (glicerol fosfato oxidase/peroxidase)	35-160 mg/dL

Determinação de colesterol total

O colesterol faz parte de uma classe de moléculas denominadas esteroides. Desempenha diversas funções no organismo tais como a regulação de vias metabólicas, precursor de hormonas esteroides e vitaminas e produção de ácidos biliares. O colesterol

total é uma soma de todos os tipos de colesterol que podemos ter presentes no nosso organismo.⁴⁴ Desta forma, e para diferenciar os tipos de colesterol, é imprescindível a realização de um perfil lipídico, que inclui a determinação do colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Para estas determinações analíticas é necessário jejum de 12h, para que a dieta do utente não influencie os seus valores.^{42,45}

Determinação de colesterol LDL

As lipoproteínas LDL provêm da remoção progressiva de triglicerídeos a partir das VLDL. Posteriormente, a partir da lipoproteína-lípase, são convertidas em IDL e depois em LDL, mas também podem ser sintetizadas diretamente pelos hepatócitos.⁴⁶

As LDL conseguem entrar no endotélio das artérias, podendo sofrer oxidação pelos radicais livres presentes, promovendo inflamação e dano na parede das artérias. Quando isto acontece, os macrófagos atuam, para fagocitar as lipoproteínas LDL, e há estimulação da aterogénese.⁴⁶ Como o endotélio se encontra fragilizado, permite que se depositem ainda mais lípidos, formando uma placa aterosclerótica que, em casos mais graves, pode levar a enfarte agudo do miocárdio, se esta placa obstruir a artéria coronária.⁴¹

Assim, a determinação do colesterol associado às lipoproteínas LDL torna-se mais relevante do que a determinação do colesterol total, uma vez que, por si só, estas moléculas constituem um fator de risco para a doença cardiovascular⁴⁷ Sendo um objetivo terapêutico a manutenção dos níveis LDL abaixo de determinados valores, consoante o risco de doença cardiovascular seja baixo, moderado ou alto.⁴⁸

Determinação de colesterol HDL

A determinação dos níveis de colesterol HDL é de extrema importância, uma vez que estas moléculas estão associadas a efeito protetor cardiovascular. Estas macromoléculas fazem o transporte reverso do colesterol, prevenindo a oxidação das LDL, têm também ação anti-inflamatória, assim como efeitos anti trombóticos⁴⁹ Quando há uma diminuição dos seus níveis, este indicador é também considerado um marcador de risco de doença aterosclerótica.⁴²

Determinação dos triglicerídeos

Os triglicerídeos são constituídos por 3 ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol, e são transportados no core das lipoproteínas. Encontram-se em maior quantidade nos quilomicron e nas VLDL.

São determinados em contexto laboratorial, em conjunto com o restante perfil lipídico, para avaliar o risco de aterosclerose. Quando em valores superiores a 1000 mg/dL também podem ser considerados fatores de risco para a pancreatite aguda.⁵⁰

Embora não possam ser descritos como fator de risco de doença cardiovascular, podem agravar a doença se já houver níveis elevados de LDL e/ou nível baixos de HDL, podendo, assim, ser chamados de marcadores de risco de doença cardiovascular.⁵¹

Metabolismo proteínas

As proteínas são macromoléculas constituídas por cadeias longas de aminoácidos ligados entre si, por ligações peptídicas. Têm diversas funções no organismo, desde moléculas transportadoras, recetores, moléculas antigénicas, hormonas e catalisadoras de reações. Desempenham, também, um papel fundamental estruturalmente, na manutenção da pressão colóide osmótica, e podem ser uma importante fonte nutricional no organismo.⁴¹

Tabela 4 - Determinações analíticas para avaliação do metabolismo das proteínas

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Proteínas totais	Reação de biureto a ponto final	6,0-7,8 g/dL
Albumina	Método de fixação - púrpura de bromocresol	3,5-5,5 g/dL
Proteína C reativa	Imunoturbidimetria reforçada com látex	< 10 mg/dL

Determinação das proteínas totais

As proteínas plasmáticas totais incluem a albumina, que constitui 54% das proteínas e pelas globulinas, que completam as restantes proteínas plasmáticas. A quantidade total de proteínas pode ser influenciada pelo estado nutricional e fisiológico do indivíduo. Como o valor total não dá indicação sobre as alterações na síntese, distribuição e eliminação, por se manter constante, é necessária a avaliação dos valores da albumina.⁴¹

Eletroforese das proteínas séricas

A realização do proteinograma, através da eletroforese das proteínas séricas, permite a sua diferenciação e fracionamento, dando informação sobre gamopatias monoclonais e policlonais.⁵²

O perfil eletroforético das proteínas séricas (Anexo 2) é feito utilizando dois capilares de sílica e permite a identificação das proteínas plasmáticas – albumina e globulinas.

As globulinas são divididas em: proteínas transportadoras, enzimas, complemento e imunoglobulinas.⁵³

Consoante o desenho da curva obtida através da mobilidade eletroforética, podemos ter informação sobre diferentes patologias, que provocam alteração no desenho da curva, como é o caso do mieloma múltiplo, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, infeção e perda proteica.⁵⁴

Determinação da albumina

A albumina é a proteína que se encontra em maior concentração no plasma. Como é considerada uma proteína pequena, é encontrada nos diferentes fluidos biológicos. É sintetizada no fígado, e a sua principal função é a manutenção da pressão osmótica nos espaços intra e extravasculares. Tem também um papel importante no transporte diferentes moléculas, como ácidos gordos, fosfolípidos, hormonas e bilirrubina.⁴¹

Os valores da albumina podem estar diminuídos em situações como: ascite, edema, insuficiência hepática, inflamação, síndrome nefrótico ou queimaduras. Por sua vez, a principal causa dos níveis aumentados de albumina é a desidratação.⁴¹

Determinação proteína C reativa

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado, durante uma resposta inflamatória.⁴¹ Atua na resposta anti-inflamatória não específica, ativando a via do complemento, resultando, na maioria dos casos, em fagocitose do invasor. Os níveis desta proteína estão aumentados quando existe uma resposta inflamatória em curso.⁵⁵

Nos casos em que o aumento é até 2000 vezes o valor normal, podemos estar na presença de enfarte agudo do miocárdio, stress, infeção, trauma, situações pós cirúrgicas e neoplasias. Nos casos em que o aumento se aproxima de 1000 vezes o valor normal, a causa pode ser de inflamação aguda. Os seus valores também se podem correlacionar com a extensão de lesão tecidual, nomeadamente queimaduras. Quanto maior a extensão, mais altos os valores desta proteína.⁴¹

No entanto, é sempre necessário proceder a exames complementares de diagnóstico, uma vez que os seus valores podem estar aumentados em diversas situações.⁵⁶ O seu aumento dá-se de 6 a 12h após o início da resposta inflamatória, e apresenta o seu pico máximo às 48h.⁴¹

Em situações de doença cardiovascular, como está associada a níveis basais de inflamação crónica, temos aumentos desta proteína, que se mantêm constantes ao longo do

tempo. Nestes casos, é importante a diferenciação, utilizando o marcador da proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-CRP).⁴¹

Avaliação da função hepática

O hepatócito desempenha diferentes funções no organismo, nomeadamente no metabolismo das principais moléculas – hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Também desempenha um papel fundamental na produção e excreção de biliar, através do metabolismo da bilirrubina, síntese proteica, destoxificação de xenobióticos e catabolismo de porfirinas.

A avaliação da função hepática ajuda o clínico a chegar a possíveis diagnósticos das diferentes hepatopatias, provocadas por alterações na capacidade de síntese e perturbações na regulação dos níveis de glicose no organismo.

Além da avaliação da função, também se faz a avaliação da lesão hepatocelular, que pode ocorrer em diversas situações. As lesões hepáticas mais comuns são a lesão citotóxica (inclui hepatite tóxica, necrose hepatocelular, cirrose e esteatose) e colestase, que pode ser provocada por perturbações no metabolismo da bilirrubina, desregulação na síntese proteica e hemólise.⁵⁷

Tabela 5 - Determinações analíticas para avaliação da função hepática

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Alanina aminotransferase (ALT)		10-40 U/L
Aspartato aminotransferase (AST)	Método colorimétrico ultravioleta	15-40 U/L
Gama-glutamil-transpeptidase (GGT)		8-78 U/L
Fosfatase alcalina	p-nitrofenilfosfato	Homem: 30-100 U/L Mulher: 45-115 U/L
Bilirrubina direta	Método de oxidação química	0,1-1,0 mg/dL
Bilirrubina total	(vanadato - agente oxidante)	0,0-0,3 mg/dL

Determinação das transaminases: ALT e AST

As enzimas responsáveis pela transferência do grupo amina de aminoácidos para cetoácidos são chamadas de transaminases. No fígado, as transaminases que têm maior relevância são a alanina aminotransferase, que faz a transferência do grupo amina do ácido

glutâmico para o oxaloacetato e a aspartato aminotransferase que faz a transferência do grupo amina do glutamato para o piruvato.⁵⁷

A determinação destas duas enzimas tem particular relevância na avaliação da lesão hepatocelular, uma vez que há um aumento sérico das transaminases quando ocorre lesão hepatocelular, aguda ou crônica. Tanto a AST como a ALT têm elevadas concentrações no fígado, sendo a ALT mais específica, funcionando como marcador da lesão hepatocelular. O seu aumento é classificado em leve, moderado e acentuado, e consoante o valor, é possível a orientação da investigação em diferentes sentidos.⁵⁷

Determinação da fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamil transferase (GGT)

A determinação da fosfatase alcalina e gama glutamil transferase é importante, uma vez que estas enzimas estão presentes nas vias biliares, e alterações nos seus valores dão indicação de lesões nestas vias. A fosfatase alcalina está associada às membranas e superfícies celulares, nomeadamente no hepatócito, fazendo parte da membrana das células dos canalículos biliares.

Em circunstâncias em que há lesão nas vias biliares, que pode ser causada por colestase ou acumulação de ácidos biliares, pode-se verificar um aumento da sua síntese e atividade. Como não é muito específica, e tem atividade em diferentes órgãos, nomeadamente osteoblastos (células que formam tecido ósseo), pode-se fazer uma determinação das isoenzimas da fosfatase alcalina ou a associação entre a fosfatase alcalina e a gama glutamil transferase, que é mais utilizado que a determinação das isoenzimas.

A gamaglutamil transferase está presente nos hepatócitos e é um marcador sensível, mas não específico da lesão hepática. No casos de alcoolismo, esta pode está aumentada até 10 vezes, e 2-3 vezes mais aumentada em casos de esteatose hepática.

Quando há elevação de ambas (GGT e ALP), podemos considerar que há lesão das vias biliares, que pode ser provocada por obstrução das vias biliares, cirrose, uso de fármacos, etc.⁵⁷

Determinação da bilirrubina

A bilirrubina é uma molécula que resulta do catabolismo da hemoglobina. Quando ocorre a sua biodegradação, esta liberta o grupo heme que, após algumas reações químicas, dá origem à bilirrubina não conjugada. Esta é transportada para o fígado pela albumina. Quando é captada pelo hepatócito, esta é conjugada com o ácido glucorónico, através da glucuronil transferase. Assim que é conjugada, é excretada pela biliar.

Em condições normais não temos a presença de bilirrubina conjugada na corrente sanguínea, e se estiver aumentada, o fígado já perdeu 50% da sua capacidade excretora.⁵⁷

Quando a bilirrubina está aumentada na corrente sanguínea (hiperbilirrubinémia) e excede a capacidade de eliminação do fígado, provoca icterícia, que se manifesta clinicamente pela coloração amarelada da pele e mucosas.⁵⁸

As situações de hiperbilirrubinémia, quando provocadas pela bilirrubina não conjugada podem-se dever ao aumento da produção de bilirrubina, ou à diminuição do aporte de bilirrubina não conjugada pelo fígado. A hemólise pode estar na base destas situações, assim como a síndrome de Gilbert, que consiste numa deficiência genética da enzima glucuronil transferase, não havendo conversão em bilirrubina conjugada. Também pode acontecer, de forma menos frequente a reabsorção de hematomas e uma eritropoiese ineficaz, que leve ao aumento da bilirrubina não conjugada.⁵⁷

A hiperbilirrubinémia também pode ocorrer devido ao aumento da bilirrubina conjugada, quando há comprometimento da captação hepática, ou quando há obstrução dos canalículos biliares.

De forma a facilitar o diagnóstico, é sempre necessário recorrer a outros biomarcadores, e entender o papel destes no hepatócito.

Avaliação da função pancreática

O pâncreas é um órgão que desempenha duas funções distintas – função endócrina e exócrina, funcionando como glândula mista.

O pâncreas endócrino, através dos Ilhéus de *Langerhans*, é responsável pela produção de hormonas, nomeadamente glucagina e insulina, cujo papel é fundamental na homeostase da glicose. O pâncreas exócrino, através das células acinares, que produzem suco pancreático, produz enzimas que participam ativamente na digestão, como é o caso da amílase e da lipase.⁴¹

As perturbações mais comuns associadas a este órgão são a pancreatite – aguda ou crónica, que consiste na inflamação do pâncreas, que pode ser provocada pela ativação das enzimas pancreáticas, o que provoca a lesão do próprio órgão. Dentro da pancreatite, a mais comum é pancreatite aguda, que pode ser provocada por cálculos biliares.

Para o diagnóstico da pancreatite aguda é necessário fazer a determinação laboratorial da amílase e lipase.⁴¹

Determinação da amílase sérica

No laboratório é feita a determinação analítica da amílase sérica, onde é utilizado o método cinético enzimático por inibição, cujos valores de referência são 6,0-7,8 g/dL.

A amílase é a enzima que converte hidratos de carbono complexos, como o amido, em hidratos de carbono mais simples, para que possam ser utilizados pelo organismo.⁵⁴

A sua determinação é feita em casos de pancreatite aguda, uma vez que esta enzima sofre um aumento (de 4 a 8 vezes o valor normal) após 2h – 12h do incidente, que provoca libertação desta enzima, e pode voltar ao seu valor basal 3 a 4 dias após os sintomas.⁴¹ Além das situações de pancreatite aguda, também pode ocorrer um aumento dos níveis da amílase (hiperamilasémia) devido a alcoolismo, obstrução biliar, nomeadamente devido à presença de cálculos (coledocolitíase).⁵⁴

Para fazer o despiste das diferentes causas, é sempre necessário usar outros biomarcadores e testes funcionais, que permitam diferenciar as diferentes situações.

Caso clínico I

Homem, 53 anos, com historial de alcoolismo. Soro apresentava aspeto ictérico. Os parâmetros analíticos determinados encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 6 - Determinações analíticas avaliados no caso clínico I

Determinação analítica	Resultado	Valores de referência
Colesterol total	<u>240</u> mg/dL	<190 mg/dL
Aspartato aminotransferase	<u>1499</u> U/L	15-37 U/L
Alanina aminotranferase	<u>599</u> U/L	16-63 U/L
Gama-glutamil-transpeptidase	<u>1174</u> U/L	15-85 U/L
Bilirrubina total	<u>30.20</u> mg/dL	0.20-1.00 mg/dL
Bilirrubina direta	<u>21.46</u> mg/dL	0.00-0.20 mg/dL
Amílase	108 U/L	25-115 U/L

Estes parâmetros analíticos são concordantes com o historial clínico apresentado – alcoolismo crónico. Uma das consequências do alcoolismo é insuficiência hepática, que se caracteriza por alteração nos valores das principais enzimas hepáticas, referidas na avaliação

da função hepática. Neste caso, como os valores de bilirrubina total e direta estão muito aumentados, pode-se concluir que o fígado perdeu 50% da sua capacidade excretora. No caso do aumento da GGT, superior a 10x é também concordante com o historial de alcoolismo crónico.

O aspeto macroscópico do soro, que se apresentava icterico (cor esverdeada) é também importante, uma vez que apoia os valores obtidos referentes à bilirrubina.

Avaliação da função renal

A avaliação da função renal faz-se através da avaliação da produção de urina (determinação de propriedades físico-químicas da urina: densidade, cor, turvação), equilíbrio ácido base, em que também há participação da respiração, equilíbrio hídrico e secreção hormonal e de vitaminas, produzidas no rim.⁴⁵

Tabela 7 - Determinações analíticas para avaliação da função renal

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Urina tipo II	Nefelometria	
Creatinina	Reação de Jaffé modificada	0,6-1,2 mg/dL
Clearance creatinina	Valor calculado	H: 75-115 mL/min/1,73 m ² M: 85-125 mL/min/1,73 m ²
Ureia (Azoto ureico sérico)	Método enzimático (urease e glutamato desidrogenase)	7-18 mg/dL
Microalbuminúria	Turbidimetria com polietilenoglicol	<30 mg/24h
Ácido úrico	Reação enzimática com a uricase (Fossati)	3,0-8,2 mg/dL

Determinação da análise sumária de urina (urina tipo II)

A análise sumária de urina divide-se em três determinações: física, química e microscópica. A análise física inclui a observação da cor, odor e turvação, é a determinação mais dependente do técnico, uma vez que os parâmetros são mais subjetivos. A análise química faz a determinação da densidade, pH, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, eritrócitos, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos. A análise microscópica permite a visualização ao microscópio do sedimento urinário, o que permite a pesquisa de células epiteliais, bactérias e leveduras, cristais, cilindros, leucócitos e eritrócitos.

O conjunto dos três parâmetros permite a avaliação da função renal e de patologias adjacentes, tais como diabetes *mellitus*, necrose tubular e pielonefrite. Esta determinação é considerada de *screening*, uma vez que permite uma distinção entre a patologia renal e outras patologias, que podem ser sistêmicas.⁴¹

Determinação da creatinina sérica

A creatinina é uma molécula que resulta do metabolismo do músculo esquelético, sendo produzida em quantidades equivalentes a 20 mg/kg em adultos. O valor da creatinina sérica pode ser influenciado por diferentes fatores, tais como a massa muscular, idade, etc. Como há pouca variação na massa muscular, de dia para dia, podemos considerar que a sua taxa de produção é quase constante. É por este motivo que a determinação pode ser utilizada para avaliação da função renal, uma vez que se trata de uma substância endógena, com taxa de produção constante e eliminação maioritariamente renal, por filtração glomerular ou secreção tubular.⁵⁹

Quando estamos na presença de problemas na eliminação de moléculas, ou na presença de diminuição da taxa de filtração glomerular, devido a redução do fluxo sanguíneo, ou diminuição da pressão arterial, vai haver um aumento plasmático de moléculas que são eliminadas maioritariamente pelo rim, tais como creatinina e ureia. Por este motivo, a creatinina sérica é um importante biomarcador da taxa de filtração glomerular e, por conseguinte, da função renal.⁶⁰

Determinação da *clearance* da creatinina

Apesar do surgimento de novos marcadores da função renal mais específicos e sensíveis, tais como a cistatina C, a determinação da creatinina continua a ser muito utilizada no contexto clínico para a avaliação da função renal. Como a concentração plasmática da creatinina não é muito sensível, uma vez que varia com o peso, quantidade de massa muscular, faz-se a determinação da *clearance* da creatinina (mL/min), que tem em conta a idade, massa corporal e concentração da creatinina sérica.

Equação 1 - *Clearance* da creatinina

$$\text{Clearance da creatinina} = \frac{[\text{creatinina urinária}] \times \text{débito urinário}}{[\text{creatinina sérica}]} \times \frac{1,73 \text{ m}^2}{\text{Área corporal}}$$

A determinação da *clearance* da creatinina é mais sensível do que a determinação da creatinina sérica e, por isso, é mais utilizada no contexto laboratorial e clínico para a avaliação da função renal.⁵⁹

Determinação ureia sérica

A ureia é o principal metabolito do metabolismo das proteínas e aminoácidos, através da síntese enzimática que resulta do ciclo da ureia/amónia. A maioria da sua eliminação é feita pelo rim. Por isso, quando há uma disfunção renal, há uma acumulação de ureia no sangue. Atualmente, a determinação da creatinina é mais utilizada na avaliação da função renal, uma vez que os valores da ureia são fortemente influenciados por fatores externos, tais como dieta rica em proteína, aumento do seu catabolismo, ou alterações na perfusão renal.⁶⁰

Determinação microalbuminúria urinária

A microalbuminúria define-se pela eliminação de albumina entre 30 mg a 300 mg/dia via renal. A determinação desta molécula na urina é de extrema importância, uma vez que se trata do primeiro marcador para a nefropatia diabética.⁶¹ Os pacientes com diabetes têm um risco acrescido de sofrer lesão renal, provocado por diferentes fatores, tais como, níveis elevados e prolongados de glicose no sangue, que se tornam tóxicos para o nefrónio, hipertensão, diabetes prolongada, etc.⁶²

A determinação deste parâmetro além da monitorização da diabetes, e da evolução da lesão renal, é útil em utentes não diabéticos, pois dá informações relevantes acerca do risco de doenças coronárias.⁶¹

Determinação ácido úrico sérico

O ácido úrico provém do catabolismo dos nucleótidos, tais como purina, adenosina e guanidina. As purinas provenientes dos ácidos nucleicos são convertidas diretamente em ácido úrico. As purinas que estão presentes no organismo podem ser provenientes da dieta, ou endógenas, por degradação dos ácidos nucleicos. A sua eliminação é feita por via renal (2/3), e está dependente de quatro fases: filtração, reabsorção túbulo proximal, secreção e reabsorção túbulo distal, o que resulta na excreção, através da urina, de 6-12% da quantidade de ácido úrico filtrado. O intestino é responsável pela eliminação de 1/3 do ácido úrico.⁶³

A avaliação da sua concentração pode auxiliar no diagnóstico de diferentes alterações nomeadamente no seu metabolismo, tais como gota, disfunção renal, ingestão excessiva ou deficiente de purinas ou outro tipo de patologias que alterem a sua concentração.⁶⁰

Equilíbrio hidroeletrólítico

O equilíbrio hidroeletrólítico permite, dentro do contexto laboratorial, definir desidratação e ajudar no diagnóstico de algumas patologias, que podem levar a desequilíbrios hidroeletrólíticos. Para o seu cálculo, é necessária a determinação dos iões potássio, sódio e cloreto. Esta determinação pode também ser chamada de ionograma, e é feita por potenciometria indireta.

Os eletrólitos são classificados em aniões (ião com carga negativa) ou catiões (iões com carga positiva). Os eletrólitos mais importantes a nível fisiológico são: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^- . Os principais eletrólitos, que se encontram em condições fisiológicas como iões livres, e são determinados de forma rotineira no contexto laboratorial, são: Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- . O Ca^{2+} , Mg^{2+} , em condições fisiológicas, encontram-se ligados a proteínas, nomeadamente à albumina.⁶⁰

Determinação do sódio

O sódio é o catião mais abundante no fluído extracelular, e é responsável por metade da pressão osmótica do plasma. O organismo necessita de 1-2 mmol/dL de sódio, e o restante sódio presente (essencialmente proveniente da dieta) é eliminado via renal, sendo o rim o responsável pela regulação de sódio no organismo e, por sua vez, da água.⁶⁰

As alterações nas concentrações de sódio, designam-se por hiponatremia, quando há diminuição da sua concentração (<135 mEq/L) e hipernatremia, quando há aumento da sua concentração (>146 mEq/L). As situações de hiponatremia podem ser provocadas por efeito de diluição, quando há hipervolemia, ou por diminuição da sua excreção. Já a hipernatremia pode ser provocada por hipovolemia, ou por administração excessiva de sódio, relativamente à quantidade de água.⁶⁴

Determinação do potássio

O potássio é o catião mais abundante do espaço intracelular, e a sua concentração é mantida pela bomba sódio/potássio ATPase, que necessita de energia oxidativa, e que faz o seu transporte do potássio contra o gradiente de concentração.⁶⁰ A sua absorção dá-se pela via intestinal, sendo distribuído e absorvido em pequena quantidade pelas células e o restante eliminado via renal. As alterações nos níveis de potássio sérico designam-se hipocaliémia, quando as concentrações no espaço extracelular estão abaixo do normal (<3.5 mEq/L), ou hipercaliémia, quando as concentrações estão acima dos valores do intervalo de referência (>5.0 mEq/L).⁶⁵

A hipocaliémia pode ser causada por: ingestão diária insuficiente, alteração no transporte para o espaço intracelular ou eliminação excessiva via renal ou gastrointestinal. Pode provocar diferentes alterações, nomeadamente musculares, função renal e gastrointestinal, provocando alcalose metabólica.

A hipercaliémia pode ser provocada por: ingestão excessiva, alteração no transporte para o espaço intracelular, e deficiente eliminação via renal ou gastrointestinal. As manifestações clínicas são mais generalizadas, tais como fraqueza generalizada, sintomas gastrointestinais, dores musculares e que podem ser mais graves, podendo ocorrer fibrilação ventricular ou assístole, que pode levar à morte.⁶⁵

Determinação do cloreto

O cloro é o anião mais abundante no espaço extracelular e, juntamente com o sódio, faz a manutenção do equilíbrio da água, pressão osmótica e equilíbrio entre anião/catião. A sua absorção dá-se a nível intestinal e é eliminado via renal. A sua determinação permite fazer o diagnóstico diferencial dos desequilíbrios ácido base.⁶⁰

As perturbações na concentração sérica do cloreto podem resultar no aumento da sua concentração sérica (hiperclorémia, se >105 mEq/L), devido a perda de água sem eletrólitos ou em estados hipermetabólicos, o que resulta no excesso deste ião no compartimento extracelular.⁶⁶ A hiperclorémia também pode ocorrer devido a alcalose metabólica, devido à compensação renal ao excretar HCO_3^- .⁶⁰

A hipoclorémia (concentração <95 mEq/L) pode acontecer quando há diminuição da ingestão de cloreto de sódio, perda de fluídos gastrointestinais, uso de diuréticos ou quando há retenção de água, aumentando a quantidade de água no espaço extracelular. ⁶⁶ A hipoclorémia também pode ocorrer devido a acidose respiratória, sendo acompanhada de aumento do ião HCO_3^- .⁶⁰

Biomarcadores do metabolismo do ferro

O ferro é fundamental para a sobrevivência do ser humano. Começou por ser estudado pela importância que desempenha na síntese do grupo heme da hemoglobina. Atualmente, é estudado pela importância que o seu aporte e biodisponibilidade têm no organismo, uma vez que, quando baixo, pode ser responsável por diferentes doenças. Como não existe uma forma de excreção do ferro, o controlo dos seus níveis séricos é feito essencialmente no passo da absorção.⁶⁷

Tabela 8 - Determinações analíticas para avaliação do metabolismo do ferro

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Ferro	Método colorimétrico	50-170 g/dL
Capacidade total de ligação do ferro (TIBC)	Teste Ferene	0,25-4,25 mg/dL
Transferrina	Turbidimetria com polietilenoglicol	H: 215-365 mg/dL M: 250-380 mg/dL
Ferritina	Quimioluminescência	H: 30-100 U/L M: 45-115 U/L

Determinação do ferro

O ferro é responsável pelo transporte de oxigénio no organismo, encontrando-se na forma oxidada (Fe^{3+}), por estar em contacto com o oxigénio.⁶⁸

Este elemento existe, na dieta, sob a forma de ferro heme e ferro não-heme. O ferro não-heme é o maior componente ingerido na dieta (90%) e existe, essencialmente, em frutas e vegetais. O ferro na forma não-heme tem ainda de ser solubilizado, a pH ácido no estômago, de modo a poder ser absorvido no organismo, sob a forma de Fe^{2+} .⁶⁸ O ferro heme está presente principalmente em carnes vermelhas, sob a forma de mioglobina e hemoglobina, e apresenta maior biodisponibilidade que o ferro não-heme.⁶⁰

As alterações nos seus níveis séricos devem-se ou à sua deficiência ou sobrecarga no organismo, e podem estar na origem de diferentes doenças, sendo as mais comuns: anemia ferropénica (por deficiência de ferro) e hemocromatose (quando há sobrecarga), onde há depósito de ferro nos tecidos.⁶⁰

Determinação da capacidade total de ligação ferro

A capacidade total de ligação de ferro (TIBC) dá-nos informação da quantidade total de ferro que se pode ligar à transferrina, sendo uma medida indireta dos níveis de transferrina livres no plasma e locais de ligação disponível para o ferro no plasma.⁴¹

Determinação da transferrina

A transferrina é uma proteína de baixa massa molecular, responsável pelo transporte do ferro para o hepatócito e restante organismo. É formada pela ligação da apotransferrina

ao ferro livre (Fe^{3+}). Cada molécula de transferrina transporte dois átomos de ferro (Fe^{3+}), tendo um tempo de meia-vida de 8 a 10 dias.

Os níveis de transferrina variam juntamente com os níveis de ferro. Quando há deficiência de ferro, temos valores altos de transferrina. O contrário também se verifica quando há sobrecarga de ferro, e temos níveis baixos de transferrina.

Os valores mais elevados de transferrina podem dever-se a anemia por deficiência de ferro, ou na toma de contraceptivos orais. Também podemos ter níveis baixos de ferritina quando estamos na presença de síndromes de perda proteica, nomeadamente síndrome nefrótica, alterações genéticas, doença hepática severa e em situações em que há um estado inflamatório generalizado sendo considerada, por este motivo, proteína de fase aguda negativo. Os seus níveis de saturação são calculados da seguinte forma:

Equação 2 - Cálculo da saturação da transferrina

$$\text{Saturação transferrina (\%)} = \frac{\text{Ferro sérico}}{\text{TICB}} \times 100^{41}$$

Determinação da ferritina

A determinação da ferritina é o teste laboratorial mais pertinente quando se pretende avaliar os níveis de armazenamento de ferro no organismo.⁶⁷ A ferritina é uma proteína globular constituída por dois tipos de cadeias – L (leves) e H (pesadas) que, no seu todo, totalizam 24 subunidades. No centro, tem capacidade de ligar até 4500 iões de ferro. Esta molécula apesar de ser considerada uma proteína de fase aguda, normalmente encontra-se em baixas concentrações no plasma e normalmente acompanha os valores séricos de ferro. No entanto, há a sua libertação em situações não relacionadas com o ferro, como é caso de doença hepatocelular, alcoolismo, tumores, pelo que o seu valor isolado pode não ter significado clínico.⁶⁸

A determinação da ferritina é muito útil no diagnóstico diferencial dos diferentes tipos de anemia, nomeadamente por deficiência de ferro uma vez que, ainda antes do valor de hemoglobina descer, a sua síntese já está afetada. Neste caso, os valores séricos de ferritina diminuem, uma vez que as reservas de ferro no organismo são gastas.⁵⁴ Quando os valores estão abaixo de 12-15 $\mu\text{g/L}$, pode-se considerar que as reservas de ferro no organismo estão muito baixas.⁶⁸

Avaliação da função muscular

A avaliação da função muscular é de extrema importância, especialmente quando direcionado para a avaliação da função cardíaca, uma vez que a doença cardíaca isquêmica continua a ser das principais causas de morte em Portugal.⁶⁹

O sistema muscular é responsável pelo movimento corporal, manutenção da postura, respiração, produção de calor corporal, comunicação, constrição de órgãos e vasos e pelo batimento cardíaco. O músculo além das diferentes propriedades, tais como contratilidade, excitabilidade, extensibilidade e elasticidade, pode ser classificado em diferentes tipos – músculo esquelético, músculo cardíaco e músculo liso.⁷⁰ O músculo cardíaco está presente no coração, e possui determinadas características que permitem a sua contração rítmica e involuntária.⁶⁰

Os biomarcadores utilizados para a avaliação da função cardíaca podem ser divididos em diferentes categorias, tais como: biomarcadores de necrose, onde se insere a creatina quinase, biomarcadores de isquemia, biomarcadores de stress hemodinâmico e marcadores de prognóstico e de inflamação.⁷¹

Tabela 9 - Determinações analíticas para avaliação da função muscular

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Creatinina quinase (CK)	Método colorimétrico ultravioleta	Homem: 25-90 U/L
		Mulher: 10-70 U/L
Lactato desidrogenase		45-90 U/L

Determinação da creatinina quinase

A creatina quinase é uma enzima, que se encontra em diferentes tecidos, nos quais tem diferente atividade. A creatina quinase divide-se em três subtipos diferentes – creatina quinase MM, MB e BB.⁶⁰ A isoenzima que tem maior atividade no músculo cardíaco é a fração creatina quinase MB. A sua determinação pode ser utilizada para a deteção do enfarte agudo do miocárdio, uma vez que os valores séricos desta enzima aumentam 3 a 4h após o episódio de enfarte agudo do miocárdio e podem retornar aos valores basais após 36h.⁴¹

Determinação da lactato desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase (LDH) está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sob a forma de isoenzimas, que têm presenças relativas diferentes nas diferentes células e tecidos. Como a sua concentração nos tecidos é muito superior à

concentração plasmática, quando esta está presente em elevada quantidade, pode-se considerar que há lesão celular. Por isso, apesar de não ser muito específica, permite a detecção de pequenas lesões, e pode ser importante na detecção de diferentes patologias ou condições, como é o caso do enfarte agudo do miocárdio.⁶⁰

Metabolismo mineral ósseo

O sistema músculo-esquelético é responsável pela forma e estrutura do organismo, pela proteção dos órgãos e pelo movimento. É constituído pelos ossos, articulações e músculo esquelético.⁴¹

O osso é constituído por uma fase mineral, cuja constituição principal é hidroxiapatite e fase orgânica, que é constituída por colagénio, proteínas não colagénicas, lípidos e água.⁷² Do ponto de vista celular, o osso está em constante renovação, tendo dois tipos de células com atividades complementares, que permitem a remodelação óssea, que é necessária para a reparação e adaptação da estrutura óssea ao meio e para a homeostase do cálcio plasmático. Os osteoclastos fazem a reabsorção, sendo removidos do tecido ósseo pelos macrófagos, que provoca a libertação dos seus constituintes para a corrente sanguínea. Por sua vez, os osteoblastos fazem a síntese do osso novo.⁶⁰

Tabela 10 - Determinações analíticas para avaliação do metabolismo mineral ósseo

Determinação analítica	Técnica utilizada	Valores de referência
Cálcio	Método colorimétrico	8,4-10,2 mg/dL
Fósforo		3,0-4,5 mg/dL
Magnésio		1,5-2,0 mEq/L

Determinação do cálcio

O cálcio é o ião inorgânico mais abundante no organismo, e 90% está armazenado nos ossos. Por isso, é importante a sua determinação no contexto da avaliação do metabolismo mineral ósseo. No organismo existe em 3 formas distintas: ionizado, livre (50%) e ligado a proteínas (albumina) (40%) ou aniões difusíveis (fosfato, bicarbonato, lactato ou citrato) (10%). A ligação do cálcio à albumina depende do pH sanguíneo, uma vez que o ião cálcio (Ca^{2+}) se liga à parte da molécula de albumina com carga negativa. Por isso, quando há um aumento do pH sanguíneo, há menos cálcio livre na corrente sanguínea. O contrário se verifica quando há diminuição do pH sanguíneo.⁴¹

O cálcio desempenha um papel importante em diferentes processos no organismo, nomeadamente como mensageiro intracelular, ajudando no processo de contração muscular, na secreção hormonal, cascata de coagulação, como co-fator, etc. O osso é responsável por parte da homeostase de cálcio, sendo responsável pelo seu armazenamento, libertação, reabsorção, através do metabolismo mineral ósseo. A regulação da concentração de cálcio é feita por hormonas – paratormona (PTH) e 1,25 hidroxivitamina D (forma ativa da vitamina D).

Quando as concentrações de cálcio decrescem – em situações de hipocalcémia, a glândula paratiróide secreta paratormona e há libertação do cálcio dos ossos para a corrente sanguínea e também incita a reabsorção de cálcio no rim e intestino. Nas situações de hipocalcémia, pode ocorrer tetania muscular. Estas situações podem ser provocadas por alterações na glândula paratiróide (hipoparatiroidismo), deficiência de vitamina D, malabsorção gastrointestinal, falha renal crónica ou deficiência de magnésio.

A hipercalcémia, que consiste no aumento da concentração de cálcio, é mais comum na prática clínica, e pode ser assintomática. Em situações mais leves pode provocar fadiga, mal-estar e fraqueza.⁶⁰ Quando o organismo está exposto a grandes concentrações de cálcio, em situações mais graves, e por longos períodos, há deposição de sais de cálcio insolúveis nos tecidos e há produção de cálculos renais. Pode ser provocado por cancro, hiperparatiroidismo, concentrações elevadas de vitamina D, doença renal crónica e doença de Paget.⁴¹

Determinação do fosfato

A maioria do fósforo presente no organismo encontra-se nos sais insolúveis de cálcio presentes nos ossos, o restante está presente nos tecidos sob a forma de ésteres de fosfato. O fosfato orgânico está presente nos ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas e em moléculas como ATP. Como o fósforo está presente na maioria dos alimentos, a sua suplementação não é difícil, tal como a sua excreção pelos rins, quando em excesso.

Uma vez que o cálcio e fosfato estão ligados no osso como fosfato de cálcio, as hormonas que regulam o cálcio, também têm influência na concentração de fosfato. Quando há estimulação para a reabsorção de cálcio, há estímulo pela PTH para excreção de fosfato. Por isso, quando há aumento da concentração de cálcio, vai haver uma diminuição de fosfato.⁴¹

Quando há diminuição de fosfato na corrente sanguínea, dá-se o nome de hipofosfatémia. A hipofosfatémia que pode ser provocada por diminuição da absorção do fosfato pelos rins ou intestino, que pode ser devido a doenças renais, hiperparatiroidismo, etc. Esta condição pode provocar distúrbios neuromusculares, anemia hemolítica e outras alterações nas células sanguíneas.⁴¹

Em situações em que há o aumento da concentração de fosfato na corrente sanguínea, dá-se o nome de hiperfosfatémia, e pode ser causada por hipocalcémia, metástases ósseas, hipotiroidismo, falha renal ou intoxicação por vitamina D. Normalmente, as crianças e adolescentes têm valores mais elevados do íon fosfato, devido aos níveis elevados da hormona de crescimento.⁴¹

Determinação magnésio

O cátion magnésio encontra-se no organismo, na sua maioria presente no osso, complexado com o cálcio e fosfato. A sua concentração é mais alta no espaço intracelular e existe, essencialmente, sob a forma ionizada (70%), e o restante está ligado à albumina (30%). No organismo desempenha diferentes funções, nomeadamente como cofator de inúmeras reações enzimáticas.⁴¹

Este cátion é absorvido a nível intestinal, e eliminado a nível renal. Assim, o rim é responsável pela manutenção do seu balanço no organismo. Quando há diminuição do nível sérico de magnésio, o rim absorve o magnésio disponível, se o seu nível sérico estiver aumentado, o rim excreta mais magnésio, retendo potássio e excretando sódio.⁴¹

A diminuição dos níveis séricos de magnésio, denominada hipomagnesémia, pode ser provocada por vômitos, diarreia, uma vez que nestes casos há uma maior excreção de magnésio. Também pode ocorrer devido a terapêutica com diuréticos, em situações de alcoolismo, diabetes mellitus ou doença renal. Os níveis baixos normalmente resultam de terapêutica ou doença associada. Esta condição pode provocar tetania, tal como quando na presença de níveis baixos de cálcio. Em situações mais graves, pode provocar taquicardia e fibrilação, quando não é feito um tratamento adequado.⁴¹

A hipermagnesémia ocorre quando os níveis séricos de magnésio estão acima dos valores de referência. Pode ser provocada por ingestão de sais de magnésio, usados no tratamento de obstipação, quando existe doença renal, desidratação severa ou deficiência de aldosterona. Esta condição manifesta-se muscularmente, com paralisia dos músculos, desaparecimento de reflexos tendinosos e, em situações mais graves, pode levar a paragem

respiratória, quando há paragem do miocárdio. Devido a aumento dos níveis de magnésio, há diminuição dos níveis de paratormona e, por consequência, diminuição dos níveis de cálcio.⁴¹

Controlo de qualidade

De modo a garantir a precisão e exatidão dos resultados obtidos, são utilizados dois tipos de controlo – interno e externo. Nesta secção, o controlo interno é feito diariamente, sendo utilizadas amostras com concentrações conhecidas, cujas determinações resultam num gráfico *Levey Jennigs*, que vai ser avaliada pelo responsável da secção. São utilizados três níveis de controlo: baixo, médio e alto. As determinações dos diferentes níveis são alternadas e estão calendarizadas, de forma a ser mais fácil este controlo.

Quando os valores obtidos se encontram fora dos limites padronizados previamente, é efetuado um ajuste, designado calibração. Este ajuste também é feito quando um novo lote de reagentes é colocado a uso, ou quando o calibrador a uso expira o prazo de validade. Desta forma, é possível garantir a rastreabilidade e fiabilidade dos resultados obtidos.

Além do controlo de qualidade, são feitas manutenções diárias, semanais, quinzenais e mensais, em todos os equipamentos utilizados nesta secção cuja complexidade varia consoante a regularidade com que é feita (a limpeza mensal é a mais completa). Isto inclui a mudança de reagentes, dos resíduos (sólidos e líquidos), por exemplo.

Equipamentos utilizados

Atellica solution V

O equipamento *Atellica solution V* é um equipamento automatizado com dois módulos distintos: química e imunologia. Faz a maioria das determinações analíticas pedidas nesta área, através de diferentes metodologias, tais como ensaio fotométrico (ensaio cinéticos, enzimáticos), imunoturbidimetria, potenciometria (ISE) e quimioluminescência. Este faz o transporte magnético e bidirecional das amostras, depositando-as na *rack* de saída, após terem percorrido o circuito de amostras.⁷³

Sebia MINICAP

O *Sebia MINICAP* é um equipamento totalmente automatizado que permite uma separação precisa das diferentes proteínas plasmáticas, utilizando a eletroforese por capilaridade. Permite duas migrações em simultâneo, contando com uma capacidade total de 28 amostras, podendo ser em ciclo contínuo. O equipamento tem uma zona de consumíveis,

com as soluções de lavagem, água e despejos (sólidos e líquidos) e uma zona de amostras, que inclui controlo e respetivas amostras.⁷⁴

Aution max™ AX-4030

O *AUTION MAX™ AX-4030* é um equipamento totalmente automatizado, que permite a análise sumária de urina, por nefelometria, utilizando tiras-teste *Uriflet S* e análise do sedimento urinário, utilizado para o exame microbiológico de urina. Estas tiras determinam os valores semiquantitativos de glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, sangue, cetonas, nitritos e leucócitos. Dá também a cor, densidade e turvação da amostra^{75,76}

Premier Hb9210 Resolution

Este equipamento utiliza cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e está integrado na secção da hematologia. Este equipamento faz a quantificação da hemoglobina A2, hemoglobina F e variantes da hemoglobina mais comuns ou raras. É especialmente utilizado na deteção da hemoglobina glicada, especialmente relevante do diagnóstico da diabetes.⁷⁷

Hematologia

A secção de hematologia é a secção do laboratório que contabiliza mais pedidos de determinações analíticas, sendo a principal o hemograma (com ou sem plaquetas).

Nesta área a organização de trabalho e bancada baseia-se em listas de trabalho. Como em quase todos os estudos analíticos é pedida a determinação do hemograma, todos os tubos que entram nesta secção entram no equipamento que faz esta determinação – *Sysmex XE 2100*. Depois, consoante as análises pedidas, que fazem parte da lista de trabalho (que inclui a velocidade de sedimentação e hemoglobina glicada), são encaminhados para os restantes equipamentos. No caso da velocidade de sedimentação, esta é feita no equipamento *VesMatic Cube 200*.

No fim do dia, são selecionados os estudos analíticos que necessitam de lâmina para observação do esfregaço de sangue periférico, e os que têm pedidos de determinação de grupo sanguíneo e teste de *Coombs*. Os esfregaços sanguíneos são feitos apenas para os estudos que apresentem parâmetros com valores alterados no hemograma cujo gráfico de dispersão apresente valores discrepantes dos referenciados são realizadas, utilizando a coloração de *Wright* e são observados diariamente pelo médico patologista. Relativamente à

determinação de grupo sanguíneo e teste de *Coombs*, estes são realizados numa subsecção, que realiza estas determinações manualmente, e por lista diária de trabalho.

Nesta secção também há a determinação das provas da coagulação e hemóstase, no equipamento *BCS-XP System*, no qual se realiza a determinação do tempo de protrombina, fibrinogénio e tempo de tromboplastina parcial ativada. Além da determinação dos fatores de coagulação, há também o controlo de pacientes sujeitos a terapêuticas com anticoagulantes, que necessitam de um controlo mais rigoroso, e controlo da janela terapêutica. Quando necessário, há ajustes nas doses, e existe o contacto entre paciente e o analista, consoante os valores obtidos nas determinações analíticas.

Formação das células sanguíneas

A determinação de células sanguíneas e elementos do sangue permite verificar as principais alterações nos diferentes elementos, e prever as patologias que possam advir dessas alterações. Os elementos do sangue incluem as células sanguíneas e o plasma. As células sanguíneas – eritrócitos, leucócitos e plaquetas podem sofrer alterações quantitativas e qualitativas. O plasma faz o transporte das células e outros componentes necessários ao organismo.

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais numerosas, responsáveis pelo transporte do oxigénio dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono no sentido inverso. Estas células têm uma vida média de 120 dias.⁷⁸ Os leucócitos são constituídos por quatro tipos de fagócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos – que têm diferentes funções, nomeadamente a proteção contra infeções bacterianas e fúngicas e linfócitos – células B, envolvidas na produção de anticorpos e células T, envolvidas na resposta imune e proteção contra infeções. O tempo de vida média destas células é variável. As plaquetas, por sua vez, participam na coagulação e têm como função a hemostasia. O seu tempo de vida média é de 10 dias.⁷⁸

Todas as células sanguíneas são formadas por um processo designado hematopoiese (Figura 1) que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Este processo está dividido em duas fases – primitiva e definitiva, que são ativadas em diferentes fases do desenvolvimento.⁷⁹

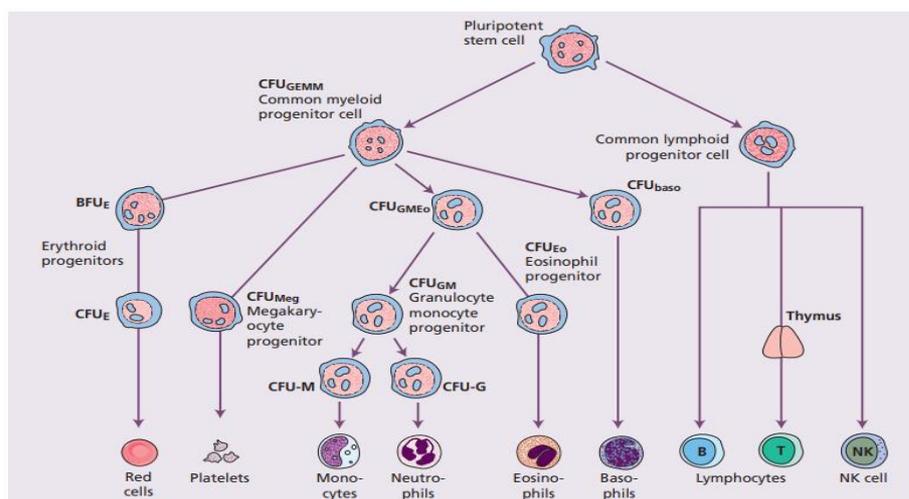


Figura 1 - Hematopoiese - diagrama da formação das diferentes linhagens a partir de células-tronco pluripotente (Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2016). Hoffbrand's Essential Haematology (Seventh ed). Chichester, West Sussex; UK: Wiley Blackwell).

A hematopoiese no adulto dá-se, essencialmente, na medula óssea, podendo ser feita noutros órgãos, nomeadamente fígado e baço, designada hematopoiese extramedular. Este processo inicia-se na célula tronco pluripotente, que tem capacidade de originar qualquer célula pertencente às diferentes linhagens celulares, através de uma célula progenitora, com o estímulo de fatores de crescimento, dando origem à célula madura final.

Todo este processo é possível, na medula óssea, através da criação de um ambiente adequado, constituído por estroma e rede microvascular, espaço esse que é essencial para a sobrevivência, autorrenovação e formação de células progenitoras diferenciadas.⁷⁸

As células progenitoras hematopoiéticas, denominadas células estaminais, podem seguir duas linhagens celulares diferentes: mielóide e linfóide. Dentro da linhagem mielóide, podem ser seguidas a linhagem eritróide, que resulta na produção de eritrócitos, regulada pela eritropoietina; megacariocítica, que resulta na produção de plaquetas, com regulação da trombopoietina; granulocítica, que pode originar a neutrófilos, eosinófilos e basófilos e monocítica, que dá origem aos monócitos. A linhagem linfóide, pela linfopoiese, resulta na produção de linfócitos B e T, que sofrem o seu processo de maturação na medula e no timo.⁷⁸

As diferentes linhagens têm diferentes estádios, que podem ser observados num esfregaço de medula óssea, que pode contemplar as diferentes células em diferentes fases de cada linhagem. Ao contrário do esfregaço de sangue periférico que, em condições consideradas normais, permite a visualização de células maduras. Caso seja possível observar células imaturas no esfregaço de sangue periférico, isto pode ter relevância clínica e laboratorial, pois pode ser indicador de patologia.

Hemograma

O hemograma é o parâmetro analítico que faz a melhor avaliação da hematopoiese no organismo, permitindo a detecção de doenças do sistema hematopoiético.⁵⁴ Este subdivide-se em três partes fundamentais: eritrograma, leucograma e trombocitograma.

Eritrograma

O eritrograma faz a contagem dos glóbulos vermelhos, determinação da concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e distribuição dos eritrócitos (RDW).

Contagem de eritrócitos

A contagem de eritrócitos dá-nos o número de glóbulos vermelhos por unidade volume de sangue total, sendo expressa em nº células por L ou μL de sangue. Os eritrócitos têm um tempo de meia vida de 80 a 120 dias, e esta determinação é um indicador da sua produção e do seu tempo de meia vida.

Quando há um aumento do valor de eritrócitos, acima dos valores de referência, é dado o nome de policitemia. Quando os valores se encontram abaixo dos referenciados, podemos estar na presença de anemia. No entanto, para a definição de anemia é necessário fazer a determinação de outros parâmetros, nomeadamente a concentração da hemoglobina.⁵⁴

Concentração da hemoglobina

A hemoglobina é constituída por uma molécula heme – que contém ferro e porfirina, e quatro cadeias de globina. No adulto, estas cadeias são de dois tipos: duas cadeias alfa e duas cadeias tipo beta.⁷⁸

A determinação da concentração de hemoglobina permite, de forma indireta, determinar a capacidade de transporte de oxigénio no organismo. Por outro lado, é através da concentração de hemoglobina que se é definida a anemia, quando as suas concentrações se encontram abaixo dos valores estipulados consoante o género, idade ou estilo de vida do paciente.^{54,78} A concentração da hemoglobina é expressa em g/dL, e pode ser influenciada por hábitos tabágicos, hemorragia intensa, anemia, etc.⁵⁴

Hematócrito

O hematócrito é calculado com base na razão entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume de sangue total, expresso em percentagem. Este valor pode ser

influenciado pelo tamanho das células, pelo que deverá ser tido em consideração quando for interpretado o seu valor.

Também é necessário ter em consideração o histórico do doente, uma vez que, quando associado a grandes perdas sanguíneas, o seu valor pode estar dentro do considerado normal, uma vez que há perda tanto de células como de plasma. A sua determinação é muito importante como auxílio no diagnóstico diferencial de inúmeras patologias.⁵⁴

Classificação dos eritrócitos

Os eritrócitos transportam o oxigénio através das moléculas de hemoglobina. A quantidade de oxigénio fornecida está dependente da quantidade e função dos eritrócitos e da sua concentração em hemoglobina.

A classificação dos eritrócitos é feita tendo em conta as constantes eritrocitárias: volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e variação do tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW). Esta classificação permite determinar se o eritrócito contém a concentração adequada de hemoglobina ou se o seu tamanho é considerado normal.⁵⁴

Volume corpuscular médio

O volume corpuscular médio determina o tamanho médio dos glóbulos vermelhos, sendo expresso em fentolitros (fL). Esta determinação permite a diferenciação dos diferentes tipos de anemias.

A classificação dada pelo volume corpuscular médio é: anemia microcítica – quando o VCM é inferior a 80 fL. Pode dever-se a deficiência na síntese da hemoglobina, deficiência de ferro, talassémia ou anemia sideroblástica (deficiência na síntese do heme)⁸⁰; anemia normocrómica – quando o VCM está dentro dos valores considerados normais (80 a 97 fL); ou anemia macrocítica – quando o VCM é superior a 100 fL, e pode ter duas etiologias diferentes: deficiência na membrana dos eritrócitos, quando há doença hepática ou hipotireoidismo ou deficiência na síntese de DNA, no caso da anemia megaloblástica ou quimioterapia. Uma das maiores causas de anemia macrocítica é a presença de reticulócitos, cujo tamanho se aproxima dos 160 fL.

Hemoglobina corpuscular média

A hemoglobina corpuscular média dá-nos informação do conteúdo médio de hemoglobina em cada glóbulo vermelho, e é expressa em picogramas (pg). Este valor pode

ser útil no diagnóstico diferencial de anemias, mas preferencialmente deverá ser utilizada a concentração de hemoglobina corpuscular média.⁸¹

Concentração de hemoglobina corpuscular média

A concentração de hemoglobina corpuscular média dá-nos indicação da concentração média de hemoglobina presente em cada eritrócito, e é expressa em g/dL. Esta determinação permite classificar as anemias em: hipocrômicas, quando o valor de CHCM é inferior a 32 g/dL, o que pode ocorrer em situações de deficiência de ferro ou talassémia; normocrômicas, se os valores da CHCM estiverem entre 32-36 g/dL ou hipercrômicas, se valor superior a 36 g/dL, o que não ocorre normalmente. Quando os valores de CHCM se encontram entre 36-38 g/dL, há indicação para estudo de esferócitos. Também se poderá dever à presença de aglutininas frias, o que poderá ser resolvido com a incubação da amostra a 37 °C, durante 15 minutos.⁸¹

Distribuição do tamanho dos eritrócitos

O valor da distribuição do tamanho dos eritrócitos dá-nos informação sobre o grau de heterogeneidade, no que diz respeito ao tamanho dos glóbulos vermelhos. É calculado a partir do volume corpuscular médio e a contagem de eritrócitos, é expresso em percentagem, e dá-nos informação do grau de anisocitose (condição em que os eritrócitos não são todos do mesmo tamanho).⁵⁴

O aumento do valor de RDW é indicativo desregulação da homeostase do eritrócito, implicando uma alteração da eritropoiese, que pode ser resultante de perturbações fisiológicas, tais como stress oxidativo, inflamação ou alteração na função da eritropoietina.⁸² Este parâmetro permite fazer a distinção entre a anemia e talassémia. Tanto na anemia como talassémia, o valor do volume corpuscular médio é baixo, mas no caso da anemia por deficiência de ferro, esta tem um valor alto de RDW, ao contrário da talassémia, que apresenta valores normais para RDW.⁵⁴

No caso de VCM alto e RDW também alto, pode sugerir deficiência de folato e/ou vitamina B12 ou mielodisplasia.⁸¹

Contagem de reticulócitos

Os reticulócitos são células imaturas, representando o último estadio antes da maturação dos eritrócitos. Normalmente, passam dois dias na medula óssea e um dia no sangue periférico até atingirem a maturação. Estas células ainda contêm ácidos ribonucleicos

remanescentes e organelos, tais como mitocôndria e ribossomas. A contagem de reticulócitos é utilizada para avaliar a atividade eritropoética na medula óssea.⁸¹

A contagem pode ser feita de forma percentual ou absoluta. Nos casos em que se verifique anemia, a contagem de reticulócitos estará acima do considerado normal, devido ao aumento da eritropoietina.⁷⁸

Leucograma

Os leucócitos podem ser classificados em fagócitos ou linfócitos. Os fagócitos fazem parte do sistema imune inato, que tem uma ação rápida após uma infecção. Os linfócitos medeiam uma resposta imune adaptativa, que pode desenvolver células de memória. Dentro dos fagócitos, estes podem ser divididos em granulócitos e monócitos. Os granulócitos incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos.⁵⁴

A função destas células é a proteção contra agentes externos, e possíveis lesões. Ao termos um valor reduzido de leucócitos, podemos designar de leucopenia. Quando os valores estão aumentados, designa-se leucocitose. Como os diferentes tipos de leucócitos têm diferentes funções no organismo, a sua contagem total é importante, mas é limitada, uma vez que devem ser avaliados os diferentes tipos de leucócitos no sangue.

Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos inclui todos os leucócitos mencionados anteriormente (neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos) e células imaturas ou não típicas no sangue. É expressa em n° células/L ou n° células/ μ L.

A leucocitose e leucopenia podem ser observadas nas mais diversas situações, incluindo as situações benignas e malignas. Por este motivo, é sempre necessário fazer exame diferencial e morfológico, de forma a conseguir determinar qual a linha celular desta linhagem que está alterada.⁸³

Fórmula leucocitária

A fórmula leucocitária consiste na percentagem e número absoluto de cada linhagem leucocitária, o que inclui neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. É feita a contagem absoluta (n° células/L ou n° células/ μ L) e relativa (%).

Trombocitograma

As plaquetas são pedaços do citoplasma de megacariócitos, que são formados na medula. Circulam na corrente sanguínea durante 8 a 12 dias, sendo removidas pelo baço. Estas células são essenciais para a hemóstase e coagulação. Quando há lesão celular, são

responsáveis pela formação de um tampão plaquetário, que impede a hemorragia.⁵⁴ A contagem de plaquetas dá informações importantes sobre a produção plaquetária, e permite a monitorização de fármacos.

Os valores aumentados de plaquetas (superiores a 400000/ μ L) designam-se trombocitose, e podem ser provocados por infeção aguda, leucemia crónica, cirrose, entre outros. Já os valores diminuídos, designado trombocitopenia (inferiores a 150000/ μ L), podem ser devidos a leucemia aguda, aplasia medular, esplenomegalia, entre outros.⁵⁴

Esfregaço sanguíneo

O esfregaço de sangue periférico é um meio complementar no estudo de alterações nas células sanguíneas. É realizado obrigatoriamente, desde que os valores do hemograma não estejam concordantes, ou se for previamente solicitado pelo clínico. Na observação do esfregaço é possível fazer a contagem e identificação de células e possíveis anormalidades na forma, tamanho ou cor.

O procedimento para a preparação do esfregaço consiste na colocação de uma gota de sangue colhido num tubo de EDTA, devidamente homogeneizado, a fim de formar uma fina camada de sangue estendida sobre a lâmina, para posterior coloração e observação ao microscópio. A coloração utilizada é a coloração de *Wright*, que utiliza o corante de *Wright*, que consiste numa mistura de corante ácido (eosina) e corante alcalino (azul de metileno) que cora os componentes celulares e citoplasmáticos de todas as células, facilitando, visualmente, a diferenciação dos tipos celulares. Após a preparação da lâmina, pode ser observado o esfregaço ao microscópio, utilizando a objetiva de 40x, de forma a ser possível encontrar um campo adequado. A zona de visualização deverá ser a meio do esfregaço, para que a densidade celular seja média, e seja possível observar as células sem sobreposições. Assim que seja encontrado esse campo, deverá ser colocada a objetiva de 100x, na qual é possível fazer a contagem diferencial de leucócitos, plaquetas e observação da morfologia das células sanguíneas.⁸¹

Morfologia dos eritrócitos

Os eritrócitos, por serem discos bicôncavos sem núcleo, quando corados com a coloração de *Wright*, apresentam uma coloração rosada, devido à hemoglobina presente, que se liga à eosina presente no corante. Além das alterações no seu tamanho, designada anisocitose, que pode ser classificada como microcítica ou macrocítica, também podem sofrer alterações na forma, com aparecimento de células com formas características de

determinadas patologias, tais como drepanócitos (células em forma de foice) e *target cells* (células em alvo), características da anemia falciforme.⁸⁴

A cor dos eritrócitos também pode sofrer alteração, nomeadamente a perda de cor, sendo a concentração de hemoglobina responsável por esta alteração, e de acordo com os índices MCH e CHCM, pode ser classificada em hipocrômica ou normocrômica.⁸⁴

Morfologia dos leucócitos

Os diferentes leucócitos apresentam colorações diferentes consoante o seu tipo, mas mantêm todos o núcleo azul-escuro, o que varia é a coloração das diferentes granulações.

A alteração na morfologia dos leucócitos é comum em muitas patologias. Normalmente, por campo, é possível observar até de 2-5 leucócitos. Quando se observa mais do que 5 leucócitos por campo, suspeita-se de leucocitose, e a leucopenia é quando o número de leucócitos por campo é inferior a 2.⁸⁴

A proporção de células polimorfonucleares (PMN) no sangue periférico é de 40-75% leucócitos, 20-45% nos linfócitos, 1-6% nos eosinófilos, 2-10% nos monócitos e <1% nos basófilos.

As principais alterações verificadas são: neutrofilia verifica-se quando neutrófilo tem pelo menos 6 segmentos nucleares. Pode dever-se a resposta a infeções bacterianas, inflamação aguda ou queimaduras. Dá-se o nome de desvio à esquerda quando há aumento da proporção de precursores de neutrófilos. A linfocitose deve-se a diferentes tipos de patologias, tais como doença do tecido conjuntivo, tireotoxicose e insuficiência adrenocortical. A eosinofilia pode ser observada em situações de alergia ou infeção por parasitas. Quando existe eosinofilia acentuada, sugere-se síndrome hipereosinofílica ou neoplasia, especialmente quando há displasia celular associada (leucemia eosinofílica crónica). A basofilia verifica-se em casos de hipersensibilidade e em casos de malignidade, como nos linfomas e leucemia mieloide crónica. A monocitose é comum nas infeções bacterianas crónicas, como a tuberculose, doença de Chron, neoplasias hematológicas (leucemia mieloide crónica e aguda).⁸⁴

Morfologia plaquetar

As alterações mais comuns na morfologia de plaquetas, observadas no esfregaço sanguíneo são os agregados plaquetares, que provocam uma falsa diminuição do número de plaquetas, ou a presença de coágulo na amostra de sangue.⁸¹ Também podem ser observadas

plaquetas gigantes, que são características de doenças hereditárias ou devido a patologias adquiridas, como é o caso da anemia megaloblástica.⁸⁴

Caso clínico 2

Homem, 73 anos. Sem historial clínico associado. Os parâmetros analíticos determinados encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 11 - Parâmetros analíticos avaliados no caso clínico 2

Determinação analítica	Resultado	Valores de referência
Hemoglobina	<u>9.3</u> g/dL	13.0-17.0 g/dL
Eritrócitos	<u>4.12</u> ×10 ⁶ /μL	4.50-5.50 ×10 ⁶ /μL
Hematócrito	<u>31.2</u> %	40.0-50.0 %
VCM	<u>75.7</u> fL	80.0-97.0 fL
HCM	<u>22.6</u> pg	27.0-32.0 pg
CHCM	<u>29.8</u> g/dL	32.0-36.0 g/dL
RDW	<u>19.5</u> %	11.6-14.0 %
Leucócitos	<u>3.6</u> ×10 ³ /μL	4.0-10.0 ×10 ³ /μL
Neutrófilos	62.5 ×10 ³ /μL	40.0-80.0 ×10 ³ /μL
Eosinófilos	2.5 ×10 ³ /μL	1.00-6.00 ×10 ³ /μL
Basófilos	0.0 ×10 ³ /μL	0.00-2.00 ×10 ³ /μL
Linfócitos	29.2 ×10 ³ /μL	20.00-40.00 ×10 ³ /μL
Monócitos	5.8 ×10 ³ /μL	2.00-10.00 ×10 ³ /μL
Plaquetas	199 ×10 ³ /μL	150-400 ×10 ³ /μL

Este boletim analítico é concordante com caso de anemia microcítica (VCM < 80fL) e hipocrômica (CHCM < 32 g/dL). Apesar de não ter presente no boletim analítico o valor sérico de ferro, para o diagnóstico diferencial da anemia, seria relevante a sua determinação.

Os parâmetros analíticos determinados no hemograma com plaquetas são concordantes com a observação do esfregaço sanguíneo, que apresenta anisocitose eritrocitária, concordante com os valores de RDW que, em casos de anemia por deficiência

de ferro, está aumentado. O esfregaço também apresentava hipocromia, o que apoia os valores de CHCM e, mais uma vez, suportam a hipótese de anemia por deficiência de ferro.

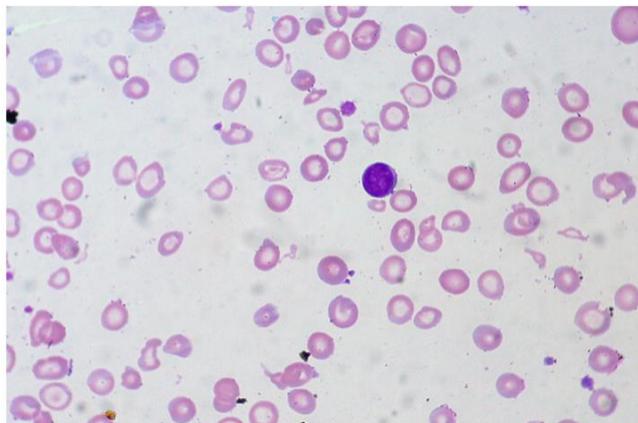


Figura 2 - Esfregaço sanguíneo concordante com boletim analítico. (Warner MJ, Kamran MT. Iron Deficiency Anemia. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.)

Velocidade de sedimentação

Este teste baseia-se no princípio da sedimentação dos glóbulos vermelhos no plasma de amostra de sangue de colhido em tubo de EDTA, durante um período específico e é expressa em milímetros/hora. A velocidade de sedimentação é influenciada por diferentes fatores, incluindo alterações dos eritrócitos e proteínas plasmáticas.

A velocidade de sedimentação é um teste pedido em contexto laboratorial para detetar e monitorizar processos inflamatórios, tais como artrite reumatoide, infeção e processos cancerígenos. Também pode ser utilizado no diagnóstico de artrite temporal e polimialgia reumática. No entanto, este teste não é muito específico para doenças inflamatórias, e este parâmetro está muitas vezes aumentado noutras circunstâncias, tais como, mieloma plasmócitos, gravidez, anemia e com o envelhecimento.⁸¹

Hemóstase

A hemóstase define-se como o conjunto de eventos mecânicos e bioquímicos que ocorrem desde a lesão de um vaso sanguíneo até à sua reparação. Os principais elementos celulares necessários para este processo são as células endoteliais, fator tecidual extravascular e plaquetas. Os elementos do plasma necessários são as proteínas fibrinolíticas e da coagulação e os seus inibidores.

Esta divide-se em duas fases: hemóstase primária, em que há vasoconstrição e a chamada de plaquetas, que vão ser ativadas e vão aderir ao local da lesão, para a formação

do trombo primário (não estável). Pode haver falhas nesta fase se houver alterações dos níveis de colagénio, trombocitopenia ou alterações em qualquer um dos elementos necessários neste processo e hemóstase secundária, em que o trombo primário é transformado em fibrina, pela cascata de coagulação, em que há ativação das proteínas da coagulação, nomeadamente enzimas proteolíticas, para a formação do coágulo de fibrina. Estas proteínas circulam sob a forma inativa (zimogénios), sendo ativadas no processo de coagulação, e formam complexos com outras proteínas para a formação da trombina, que é a enzima que converte o fibrinogénio no coágulo de fibrina localizado. O último passo da hemóstase é a digestão gradual e remoção do coágulo, assim que haja a regeneração do tecido.

Apesar de haver elementos que são característicos de cada uma das fases da hemóstase, nomeadamente as plaquetas e células endoteliais há a interação contínua de todos estes elementos quer na fase primária, quer na secundária.⁸¹

Testes de coagulação sanguínea

Os testes de coagulação permitem a avaliação de determinados parâmetros ou fases da hemóstase, nomeadamente defeitos na via intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação, indicadas na figura 4. No laboratório os principais testes pedidos são o tempo de tromboplastina parcial ativados, tempo de protrombina e o fibrinogénio, como indicado na figura 3.

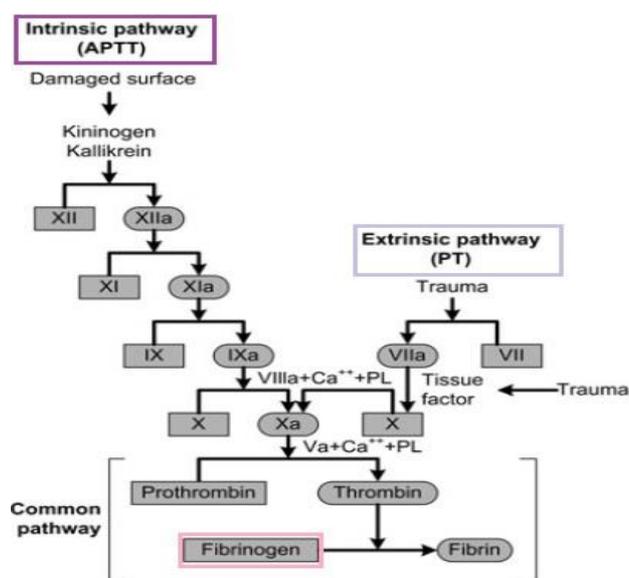


Figura 3 - Cascata da coagulação simplificada (ADAMS, R.L.C. and BIRD, R.J. (2009), Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part I: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. Nephrology, 14:)

Tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT)

O tempo de tromboplastina parcial ativado mede o tempo necessário à formação da fibrina, desde a via intrínseca. Esta determinação permite a avaliação da via intrínseca e via comum da coagulação. Permite a detecção de distúrbios hemorrágicos, devido a deficiência dos fatores VII, IX, XI, XII (via intrínseca), e II (protrombina), V e X (via comum).⁸¹

Esta determinação é útil como auxiliar de diagnóstico de diferentes patologias, nomeadamente as associadas a alterações genéticas, herdados ou adquiridos, nos ativadores de coagulação e na monitorização da terapêutica com heparina.⁸¹

Tempo de protrombina

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca, sendo sensível a alterações na via intrínseca, nomeadamente fator VII e fator II, V e X da via comum da coagulação e ao fibrinogénio.⁸⁵ Esta determinação é muito utilizada no controlo da terapêutica com varfarina. No entanto, e devido à sua sensibilidade ao reagente utilizado, varia consoante o fornecedor e equipamento utilizados. É necessário, por isso, normalizar o resultado obtido, utilizando uma medida internacional – INR (índice normalizado internacional), que permita comparar os valores obtidos em todos os laboratórios.⁸¹

Equação 3 - Determinação do INR

$$INR = \left(\frac{\text{Tempo de protrombina paciente}}{\text{Tempo de protrombina referência}} \right)^{\text{International sensitivity index (ISI)}}$$

Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma macromolécula solúvel, conhecido como fator I, é o precursor insolúvel da fibrina, pela ação da trombina. Esta molécula também é necessária para a agregação plaquetar, na fase primária da hemóstase. Os coágulos de fibrinogénio são dissolvidos pelo sistema fibrinolítico, através de reações enzimáticas.⁸⁶ A determinação do fibrinogénio permite a avaliação da hemóstase de forma eficaz, e permite o diagnosticar possíveis alterações, tais como coagulação intravascular disseminada, fibrinólise primária e outras alterações.⁸¹

Determinação do grupo sanguíneo

A determinação do grupo sanguíneo é uma determinação analítica muito pedida e útil na prática clínica, principalmente nas transfusões sanguíneas, quando necessário. Baseia-se na determinação do sistema AB0 e Rh. O sistema AB0 inclui quatro grupos diferentes, que se baseiam nas glicoproteínas expressas à superfície dos eritrócitos: A, B, AB e 0. A sua

determinação é feita com base na presença ou ausência dos antígenos A e B, nos eritrócitos. Na prática, o princípio da técnica baseia-se na reação anticorpo (presente na coluna) com o antígeno (presente na membrana dos eritrócitos).⁸⁷

A determinação do sistema Rh é feita tendo como base a presença ou ausência ao antígeno D. Para esta determinação é utilizado um anticorpo anti-D, que vai, ou não reagir com o antígeno presente nos eritrócitos. Quando há essa reação, é considerado Rh positivo.⁸⁷ Neste caso, é utilizado o sistema *ORTHO BioVue*[®], que se baseia no princípio de aglutinação, em coluna, com os anticorpos, para a determinação do sistema AB0 e Rh.

Teste de Coombs

O teste de *Coombs* também é feito utilizando o sistema *ORTHO BioVue*[®]. Este teste permite a detecção de anticorpos presentes na superfície dos eritrócitos. É principalmente útil na investigação de anemias hemolíticas, nomeadamente a do recém-nascido ou autoimune.

A determinação pode ser feita de forma direta, quando se determina a presença de anticorpos ligados aos eritrócitos na amostra do paciente.⁵⁴ Pode ser feita de forma indireta, quando se deteta anticorpos circulantes no sangue do paciente, que podem reagir contra eritrócitos, por exemplo, em transfusões sanguíneas.⁵⁴

Controlo de qualidade

À semelhança da secção da bioquímica, são feitos dois tipos de controlo: interno e externo. Nesta secção, o controlo interno é feito diariamente, ao início do dia, sendo utilizadas amostras com concentrações conhecidas. O controlo realizado tem três níveis: baixo, médio e alto. Os valores obtidos são confirmados e verificados através de cartas de controlo, que seguem as regras de *Westgard*.

Quando os valores obtidos se encontram fora dos limites padronizados previamente, é efetuado um ajuste, designado calibração. Este ajuste também é feito quando um novo lote de reagentes é colocado a uso.

Além do controlo de qualidade, são feitas manutenções diárias, semanais, quinzenais e mensais, em todos os equipamentos.

Equipamentos utilizados

Sysmex XE2100

O equipamento Sysmex XE2100 faz a determinação do hemograma com plaquetas, de forma automatizada. Utiliza diferentes métodos, que permitem as diferentes determinações, dentro do mesmo equipamento.

Este equipamento utiliza três técnicas distintas: impedância e foco hidrodinâmico – a contagem de plaquetas e eritrócitos é feita num canal, que faz a sua medição com base na alteração da corrente elétrica. A alteração gera um pulso elétrico proporcional ao volume da célula. Este método também faz a determinação do hematócrito; método cianometahemoglobina, onde há a lise dos eritrócitos, para que a hemoglobina seja libertada. O grupo heme da hemoglobina liga-se ao complexo laurilsulfato de sódio sem cianeto, e é posteriormente quantificado por fotometria, sendo a luz absorvida proporcional à concentração de hemoglobina na amostra; e citometria de fluxo com fluorescência, em que há marcação das células com marcador fluorescente, que faz a diferenciação das diferentes populações celulares. A leitura é feita por laser, cuja dispersão de luz é feita lateralmente e frontalmente. A dispersão lateral permite verificar a complexidade celular e a dispersão frontal permite verificar o tamanho celular e rugosidade da superfície.⁸⁸

Para os resultados que se encontrem fora dos valores de referência, é impressa uma folha, de forma automática que, normalmente, corresponde aos estudos em que é necessário a realização do esfregaço sanguíneo.

Ves-Matic Cube 200

O equipamento *Ves-Matic Cube 200* é um equipamento automatizado que faz a velocidade de sedimentação dos eritrócitos. Antes de ser colocado o tubo de EDTA na *rack*, este é homogeneizado e, já dentro do equipamento, fica em repouso, para que ocorra a sedimentação dos eritrócitos. A leitura da sedimentação é feita por sensores analógicos, e a velocidade de sedimentação é calculada automaticamente e dada em mm/h.⁸⁹

Quando as amostras têm pouco volume, ou são colhidas em tubos pediátricos, esta determinação é feita pelo método manual, que segue o método de *Westergren* modificado. Nesta metodologia é utilizada uma pipeta graduada, que é colocada na vertical, numa superfície nivelada, utilizando um suporte específico. Após 1 hora, é medida a distância que os eritrócitos percorreram, ao depositarem, e o resultado é dado em milímetros por hora.

BCS XP System

O equipamento *BCS XP System* permite executar os ensaios da formação de coágulo, utilizando ensaios fotométricos, cromogénicos (com diferentes comprimentos de onda – 405 nm ou 560 nm). Faz a determinação de diferentes parâmetros que permitem a avaliação da hemóstase, tais como tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e fibrinogénio.⁹⁰

Imunologia

A área da imunologia baseia-se na determinação de anticorpos ou antigénios presentes no analito, incluindo autoanticorpos. Dentro desta secção, temos as análises imunoquímicas e as de imunoserologia.

Consoante a determinação analítica pedida, é utilizado um equipamento distinto, nomeadamente o *Atellica solution V* através do módulo de imunologia, que utiliza quimioluminescência, o *Liaison XL*, que também utiliza quimioluminescência e o *Immunocap unicap*, que utiliza ensaios fluoroenzimáticos, para determinação de alergénios.

Na subsecção de imunoserologia são ainda realizados testes serológicos e de *screening*, que incluem a pesquisa de anticorpos, antigénios e autoanticorpos (Anexo 4).

Microbiologia

Nesta secção do laboratório são feitas todas as análises microbiológicas e esta funciona de forma isolada, por exigir um nível de segurança mais elevado, devido ao risco de contaminação de determinados agentes patogénicos.

O tipo de amostra e processamento varia consoante a análise pedida. As amostras biológicas incluem urina, expetorações, exsudados (purulentos, vaginais, uretrais, etc. – colhidos com zaragatoas secas ou com meio de transporte) e fezes.

A análise de rotina mais pedida é a determinação de urina assética. As urinas são semeadas em meio de cultura CPS, indicada para a identificação de agentes patogénicos urinários, depois de determinado o seu sedimento, no equipamento *Aution Max AX-4030*. No dia seguinte, são observadas as placas e, consoante o seu crescimento, são repicadas as colónias, em meio de isolamento ou seletivo, a fim de identificar o microrganismo responsável pela infeção. As restantes determinações analíticas desta área laboratorial, seguem os mesmos passos, com diferentes alterações consoante o produto biológico.

A identificação dos microrganismos, e respetivo antibiograma, é feita nos equipamentos automatizados *Walkaway* e *Vitek 2*. O equipamento *Walkaway* utiliza um sistema fotométrico automatizado que faz a identificação bacteriana e teste de sensibilidade aos antibióticos, sendo utilizado na rotina, para dar resposta aos pedidos de análise bacteriológica de urina. O *Vitek 2* é um equipamento automatizado, que faz a identificação bacteriana e de suscetibilidade antimicrobiana através de um método fluorimétrico ou colorimétrico, sendo utilizado em situações de urgência ou em casos em que seja necessário fazer repetições de identificação ou antibiograma, realizadas previamente no *Walkaway*.

Controlo de qualidade

No controlo de qualidade são avaliados diferentes parâmetros para as diferentes técnicas e áreas do laboratório. A exatidão e precisão dos métodos são avaliadas diariamente no controlo de qualidade interno. Cada setor do laboratório tem diariamente um controlo, para todos os parâmetros que pretendem executar, sendo monitorizadas as cartas de controlo pelos responsáveis de cada setor, seguindo as regras de Westgard.⁹¹

O controlo de qualidade interno inclui a manutenção dos equipamentos e determinação dos diferentes níveis de controlos, para cada área, que são definidos de acordo com um mapa mensal que determina qual o nível a determinar em cada dia. Deste modo, os resultados obtidos poderão ser aceites e validados, garantindo a fiabilidade do método utilizado.

Estes controlos têm um intervalo de valores conhecidos, que nos permitem contruir uma curva e posterior carta de controlo. Se o valor se encontrar fora dos parâmetros esperados, e fora do desvio considerado aceitável (isto de acordo com as regras estabelecidas pelo laboratório) é necessário verificar qual origem da falha. Esta falha pode ser provocada por falta de estabilidade, validade, preparação do controlo com material ou água contaminados ou calibração do equipamento expirada.

Os diferentes setores estão também sujeitos a uma avaliação externa da qualidade, normalmente mensal, em que os diferentes parâmetros são determinados “às cegas”, para depois poderem ser comparados com os diferentes laboratórios que utilizam o mesmo método ou o mesmo equipamento. Consoante a área da análise, estão inseridos em diferentes programas de avaliação externa da qualidade (AEQ).

No caso da secção da bioquímica o controlo de qualidade externo é feito através de um programa que permite a avaliação inter-laboratorial (p.e. SEQC). Na hematologia, o

controlo de qualidade externo é o UKNEQAS, que funciona como entidade externa, que faz o envio de amostras de concentração desconhecida a diferentes laboratórios. Este controlo permite a avaliação dos diferentes laboratórios, fazendo uma comparação inter-laboratorial, atribuindo um lugar no ranking dos laboratórios que participam nos programas de controlo de qualidade externo.

O laboratório adota um sistema de Gestão da Qualidade de forma a melhorar o seu desempenho e capacidades globais, para cumprir requisitos, numa perspetiva de melhoria contínua.

Fase pós-analítica

A fase pós analítica inclui a validação biopatológica pelo médico patologista, ou especialista em análises clínicas. Nesta fase os resultados obtidos em contexto laboratorial são assinados, é feito o seu processamento pelos serviços administrativos e o seu envio para o utente, médico ou entidade de saúde responsável.

Conclusão

A realização do estágio curricular e do presente relatório permitiu a consolidação de conhecimentos, fundamentais para a compreensão dos conteúdos abordados ao longo do mestrado, nas diferentes áreas laboratoriais.

A componente realizada no LACUC deu-me uma perspetiva muito próxima da realidade que vivemos durante o confinamento imposto no início de janeiro 2021, o que foi desafiante, mas ao mesmo tempo muito gratificante.

Uma vez que o LACUC tem apenas a área dedicada à deteção do SARS-CoV-2, foi necessário integrar num outro laboratório, neste caso o CMLGS-Porto, onde me receberam de braços abertos. Por ter sido um ano atípico, esta componente do estágio foi encurtada, de forma a conseguir passar por todas as valências em tempo útil.

O período de estágio, e posterior período de escrita, permitiu um crescimento tanto a nível pessoal como profissional, tendo tido oportunidade de conhecer de perto e melhor o funcionamento do laboratório de análises clínicas.

Por fim, e a lição mais importante que levo destes últimos anos – a resiliência é a chave para o sucesso, a todos os níveis.

Bibliografia

1. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD) D of VD. SARS | Basics Factsheet | CDC. Published 2020. Acedido Agosto 24, 2021. <https://www.cdc.gov/sars/about/fs-sars.html>
2. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Published online 2022. Acedido Agosto 24, 2021. https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1
3. COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer. Acedido Agosto 28, 2022. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536–544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z.
5. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157–160. doi:10.23750/abm.v91i1.9397.
6. Human Coronavirus Types | CDC. Acedido Agosto 24, 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>
7. HASÖKSÜZ M, KILIÇ S, SARAÇ F. Coronaviruses and SARS-COV-2. *TURKISH J Med Sci.* 2020;50(SI-1):549–556. doi:10.3906/sag-2004-127.
8. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(November):1–17. doi:10.3389/fcimb.2020.587269.
9. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727–733. doi:10.1056/nejmoa2001017.
10. Wang LF, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton BT. Review of bats and SARS. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(12):1834–1840. doi:10.3201/eid1212.060401.
11. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100–1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004.
12. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117(21):11727–11734. doi:10.1073/pnas.2003138117.
13. Grigoryan L, Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin Immunol.* 2020;50(September):101422. doi:10.1016/j.smim.2020.101422.

14. Plano Vacinação COVID19 - Covid 19 estamos ON. Acedido Agosto 24, 2021. <https://covid19estamoson.gov.pt/plano-vacinacao-covid-19/>
15. DGS - Direção-Geral da Saúde. Campanha de Vacinação contra a COVID-19 Vacina SPIKEVAX®. *Norma nº 001/2021 14/01/2021 atualizada a 03/11/2021*. Published online 2021:1–25. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0012021-de-14012021-pdf.aspx>
16. DGS - Direção-Geral da Saúde. Campanha de Vacinação contra a COVID-19 Vacina COMIRNATY®. *Norma nº 021/2020 23/12/2020 atualizada a 10/10/2021*. Published online 2021:1–19. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0212020-de-23122020-pdf.aspx>
17. DGS - Direção-Geral da Saúde. Campanha de Vacinação contra a COVID-19 Vacina VAXZEVRIA. *Norma nº 003/2021 08/02/2021 atualizada a 17/06/2021*. Published online 2021:1–22. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0032021-de-08022021-pdf.aspx>
18. DGS - Direção-Geral da Saúde. Campanha de Vacinação contra a COVID-19 COVID-19 Vaccine Janssen®. *Norma nº 004/2021 30/04/2021 atualizada a 08/06/2021*. Published online 2021:1–24. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0042021-de-30042021-pdf.aspx>
19. DGS - Direção-Geral da Saúde. Orientação nº 015/2020, 24 de abril - COVID-19: Diagnóstico Laboratorial. Published online 2020:1–7.
20. ECDC. Options for the use of rapid antigen detection tests for COVID-19 in the EU/EEA – first update, 26 October 2021. *Ecdc. 2021;(October)*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Options-for-the-use-of-rapid-antigen-tests-for-COVID-19-first-update.pdf>
21. WHO. Laboratory biosafety manual Third edition World Health Organization. *World Heal Organ*. Published online 2004:1–178. doi:10.1007/SpringerReference_61629.
22. Corman V, Bleicker T, Brünink S, et al. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. *Charité Virol Berlin, Ger*. Published online 2020:13.
23. Cai D, Behrmann O, Hufert F, Dame G, Urban G. Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. *PLoS One*. 2018;13(1). doi:10.1371/journal.pone.0190041.

24. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
25. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559–1582. doi:10.1038/nprot.2006.236.
26. Waudby-West R, Parcell BJ, Palmer CNA, Bell S, Chalmers JD, Siddiqui MK. The association between SARS-CoV-2 RT-PCR cycle threshold and mortality in a community cohort. *Eur Respir J*. 2021;58(1):10–13. doi:10.1183/13993003.00360-2021.
27. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol*. 2020;133(October):3–6. doi:10.1016/j.jcv.2020.104659.
28. Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;538:226–230. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.069.
29. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. 2016;(June):111–120. doi:10.1042/EBC20150012.
30. Porte L, Legarraga P, Vollrath V, et al. International Journal of Infectious Diseases Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. 2020;99:328–333. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.098.
31. Renard N, Daniel S, Cayet N, et al. Performance Characteristics of the Vidas SARS-CoV-2 IgM and IgG Serological Assays. *J Clin Microbiol*. 2021;59(4). doi:10.1128/JCM.02292-20.
32. Chandrasekaran B, Fernandes S. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(4)(January):337–339.
33. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2027–2034. doi:10.1093/cid/ciaa344.
34. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(7):758–759. doi:10.1016/S1473-3099(20)30322-4.
35. Xia S, Duan K, Zhang Y, et al. Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical

- Trials. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;324(10):951–960. doi:10.1001/jama.2020.15543.
36. BD. BD Vacutainer® Tube Guide Trust BD Vacutainer® Brand System of products you can rely on. Published online 2007. <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=11068>
 37. Gouveia S, Leitão F, Ribeiro C, Carrilho F. Fatores de interferência no estudo da função tiroideia. *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab.* 2016;11(2):277–286. doi:10.1016/j.rpedm.2016.02.008.
 38. McCowen KC, Smith RJ. *Diabetes Mellitus: Classification and Chemical Pathology.* Vol 2–4. Elsevier Ltd.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00072-6.
 39. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Norma da Direção Geral da Saúde.* Published online 2011:1–13.
 40. Santos P. The Role of Cardiovascular Risk Assessment in Preventive Medicine: A Perspective from Portugal Primary Health-Care Cardiovascular Risk Assessment. *J Environ Public Health.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/1639634.
 41. Larson D, Hayden J, Nair H. *Clinical Chemistry: Fundamentals and Laboratory Techniques.*; 2015.
 42. Cox RA, García-Palmieri MR. Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. *Clin Methods Hist Phys Lab Exam.* Published online 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250192>
 43. Berberich AJ, Hegele RA. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev.* 2021;XX(Xx):1–43. doi:10.1210/endrev/bnab037.
 44. Sonal Sekhar M, Marupuru S, Reddy BS, Kurian SJ, Rao M. *Physiological role of cholesterol in human body.* INC; 2020. doi:10.1016/b978-0-12-816918-6.00021-4.
 45. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation.* Mosby/Elsevier; 2010. <https://books.google.pt/books?id=WsRPPgAACAAJ>
 46. Freeman MW, Walford GA. *Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders.* Vol 1–2. Seventh Ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-323-18907-1.00041-X.
 47. Wadhera RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP, Foody JM. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J Clin Lipidol.* 2016;10(3):472–489. doi:10.1016/j.jacl.2015.11.010.
 48. Direção-Geral da Saúde. Abordagem Terapêutica das Dislipidémias no Adulto. *Norma*

019/2011. Published online 2011:17.

49. Bardagjy AS, Steinberg FM. Relationship between HDL functional characteristics and cardiovascular health and potential impact of dietary patterns: A narrative review. *Nutrients*. 2019;11(6). doi:10.3390/nu11061231.
50. Kota S, Kota S, Krishna SVS, Modi K, Jammula S. Hypertriglyceridemia-induced recurrent acute pancreatitis: A case-based review. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(1):141. doi:10.4103/2230-8210.91211.
51. Murtagh IBAMG, Cooney VMMT, Tomkin IMGG. Dyslipidemia Therapy Update : the Importance of Full Lipid Profile Assessment. 2009;26:711–718. doi:10.1007/s12325-009-0052-3.
52. Gwladys Ekwe Priso J, Pierre Nda Mefo'o J, Okalla Ebongue C, et al. Electrophoretic Profile of Serum Proteins Using Capillary Technique in Patients Attending the Douala General Hospital, Cameroon. *Avicenna J Med Biochem*. 2018;6(2):50–55. doi:10.15171/ajmb.2018.11.
53. H Kenneth Walker, MD, W Dallas Hall M. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd editio. (J Willis Hurst M, ed.). Butterworth-Heinemann; Subsequent edition; 1990. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK201/#_ncbi_dlg_cpyrght_NBK201.
54. Wilson DD. *Manual of Laboratory & Diagnostic Tests*. The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008. doi:10.1036/0071481524.
55. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;112(2):299–299. doi:10.1172/jci18921cl.
56. Nehring SM, Goyal A BP. C Reactive Protein. Em: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441843>.
57. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Cmaj*. 2005;172(3):367–379. doi:10.1503/cmaj.1040752.
58. J. Larry Jameson et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 20th editi. New York: McGraw-Hill Education; 2018.
59. Pasala S, Carmody JB. How to use... serum creatinine, cystatin C and GFR. *Arch Dis Child - Educ Pract Ed*. 2017;102(1):37–43. doi:10.1136/archdischild-2016-311062.

60. Burtis, CA., Bruns D. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7th Editio. Elsevier; 2016.
61. Direção Geral de Saúde. Orientação n° 005/2011 Prevenção e Avaliação da Nefropatia Diabética. *Orientação n° 005/2011*. Published online 2011:1–7.
62. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, et al. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(July):1–20. doi:10.1038/nrdp.2015.18.
63. Li F, Guo H, Zou J, et al. Urinary excretion of uric acid is negatively associated with albuminuria in patients with chronic kidney disease: a cross-sectional study. *BMC Nephrol*. 2018;19(1):95. doi:10.1186/s12882-018-0892-7.
64. Bagshaw SM, Townsend DR, McDermid RC. Disorders of sodium and water balance in hospitalized patients. *Can J Anesth Can d'anesthésie*. 2009;56(2):151–167. doi:10.1007/s12630-008-9017-2.
65. Schaefer TJ, Wolford RW. Disorders of potassium. *Emerg Med Clin North Am*. 2005;23(3 SPEC. ISS.):723–747. doi:10.1016/j.emc.2005.03.016.
66. Morrison G. *Serum Chloride.*; 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250151>.
67. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164–174. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778671>
68. Hinzmann R. Iron Metabolism , From Diagnosis to Treatment and Monitoring. *Sysmex J Interntational*. 2004;13(2):65–74.
69. OCDE. *Health at a Glance 2021*. OECD; 2021. doi:10.1787/ae3016b9-en.
70. Stewart G. *The Skeletal and Muscular Systems (Your Body, How it works).*; 2004.
71. Jacob R, Khan M. Cardiac Biomarkers: What Is and What Can Be. *Indian J Cardiovasc Dis Women WINCARS*. 2018;03(04):240–244. doi:10.1055/s-0039-1679104.
72. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and anti-osteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013;4:11. doi:10.1038/bonekey.2015.79.
73. Solução Atellica de Analisadores de Imunoensaio e Química Clínica - Siemens Healthineers Portugal. Acedido Julho 12, 2022. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers>
74. MINICAP FLEX-PIERCING | Sebia | PT. Acedido Julho 12, 2022.

<https://www.sebia.com/pt-pt/instruments/minicap-flex-piercing/>

75. Galimany R, Arambarri M, Biosca C, et al. European multicentre evaluation of the super aution SA-4220 urinalysis analyser. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(12):947–957. doi:10.1515/CCLM.1998.164.
76. Aution Max-4030. <http://www.arkray.eu/english/upload/docs/ax-4030.pdf>
77. HB9210 RESOLUTION. Acedido Agosto 21, 2022. <https://www.menarini-diagnostics.com/en-us/Home/Laboratory-products/Haemoglobin-Analysis/Hb9210-Resolution/Features>
78. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Hoffbrand's Essential Haematology*. Seventh ed. Chichester, West Sussex; UK: Wiley Blackwell; 2016.
79. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463–2467. doi:10.1242/dev.083147.
80. Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia. *Med Clin North Am*. 2017;101(2):263–284. doi:10.1016/j.mcna.2016.09.003.
81. Keohane EM, Otto CN, Walenga JM. *Rodak's Hematology*. 6th Editio. Elsevier; 2020. doi:10.1016/C2013-0-19483-4.
82. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(2):86–105. doi:10.3109/10408363.2014.992064.
83. Chabot-Richards DS, George TI. White Blood Cell Counts. Reference Methodology. *Clin Lab Med*. 2015;35(1):11–24. doi:10.1016/j.cll.2014.10.007.
84. Nwogoh B, Transfusion B, State E, Transfusion B, State R. The Peripheral Blood Film. *Peripher Blood Film*. 1974;12(2):71–79. doi:10.1016/c2013-0-06261-5.
85. Raber MN. Coagulation tests. Em: Walker HK, Hall WD HJ, ed. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd editio. ; 1990:9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK265/?report=reader>
86. Weisel JW. Fibrinogen and Fibrin. Em: *Advances in Protein Chemistry*. Vol 70. Elsevier; 2005:247–299. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70008-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70008-5).
87. Li H, Guo K, Guo K. Blood Group Testing. 2022;9(February):1–11. doi:10.3389/fmed.2022.827619.

88. XE-2100. Acedido Julho 17, 2022. <https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>
89. Perovic E, Bakovic L, Valcic A. Evaluation of Ves-Matic Cube 200 – an automated system for the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. Published online 2010:88–94. doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01135.x.
90. BCS XP System https://nacce.siemens-info.com/wp-content/uploads/2022/05/T05001.0002-BCS-XP-Quick-Ref-Guide_eff-date-03-14-22.pdf
91. Westgard Sigma Rules - Westgard. Acedido Agosto 21, 2022. <https://www.westgard.com/westgard-sigma-rules.htm>
92. File:1913 ABO Blood Groups.jpg - Wikimedia Commons. Acedido Setembro 7, 2022. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1913_ABO_Blood_Groups.jpg

Anexos

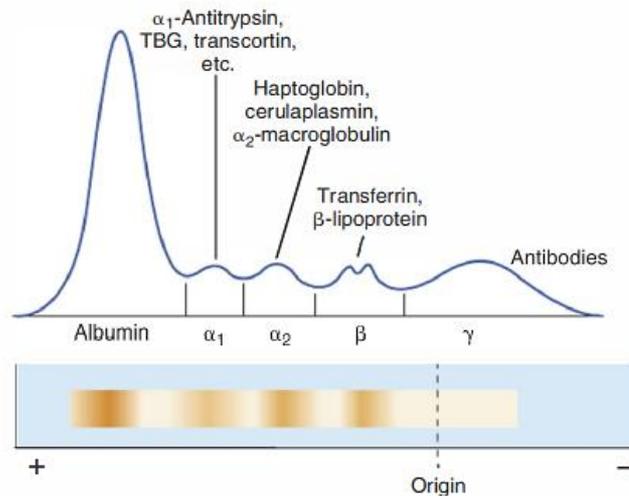
Anexo I

Equipamentos utilizados nas diferentes áreas no CML-Porto

Área laboratorial	Equipamento utilizado	Determinações analíticas
Triagem/Colheitas	Centrífuga	Centrifugação de amostras
Bioquímica	Minicap	Eletroforese das proteínas séricas
	Aution Max AX-4030	Urina tipo II Sedimento urinário
	Premier Hb9210 Resolution	Hemoglobina glicada
	Atellica solution V	
Imunologia	Atellica solution V	Parâmetros imunoquímicos
	Liaison XL	
	Immunocap	Determinação dos níveis de IgE totais e específicos
Hematologia	BCS XP	Hemóstase
	Sysmex XE 2100	Hemograma
	Ves-Matic Cube 200	Velocidade de sedimentação
Citometria de fluxo	BDFacs Canto II	Análises de parâmetros celulares
Microbiologia	Vitek 2	Identificação e antibiograma de microrganismos
	Walkaway	

Anexo 2

Perfil eletroforético normal das proteínas séricas. ⁴¹



Anexo 3

Sistema ABO. ⁹²

Blood Type				
	A	B	AB	O
Red Blood Cell Type				
Antibodies in Plasma	 Anti-B	 Anti-A	None	 Anti-A and Anti-B
Antigens in Red blood Cell	A antigen	B antigen	A and B antigens	None
Blood Types Compatible in an Emergency	A, O	B, O	A, B, AB, O (AB ⁺ is the universal recipient)	O (O is the universal donor)

Anexo 4

Equipamentos automatizados utilizados na secção da imunologia e determinações analíticas

Equipamento utilizado	Determinações analíticas
Atellica solution V	Antigénio específico da próstata (PSA); Triiodotironina Livre (FT3); Tiroxina Livre (FT4); Gonadotrofina coriónica humana (hCG); Hormona foliculoestimulante (FSH); Insulina; Progesterona; Prolactina; Hormona paratiroideia intacta (PTH); Testosterona; Ferritina; Vitamina B12; Folato
Immucap unicap	imunoglobulina IgE total (PRIST); níveis de IgE específica; Phadiatop (alergia inalante); RAST <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (d1); RAST <i>Dermatophagoides farinae</i> (d2); RAST múltiplo de Gramíneas (gx1)
Liaison XL	Anti-tiroglobulina (Ac-TG); Anti-tireoperoxidase (Ac-TPO); Anti-citomegalovírus IgG e IgM; Anti-rubéola IgG e IgM; Anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM; Anti-toxoplasma IgG e IgM; 25-hidroxivitamina D

Determinações analíticas realizadas na subsecção da imunoserologia

Determinação analítica	Método/Técnica utilizada
Pesquisa de anticorpos para <i>Treponema pallidum</i>	Teste de screening VDRL (<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>) Teste de hemoaglutinação para o <i>Treponema pallidum</i> (TPHA)
Identificação de fatores reumatoides	Reação de Waaler-Rose RA teste
Pesquisa de anticorpos para Epstein-Barr	Teste Paul-Bunnell
Pesquisa de aglutininas específicas para a <i>Brucella</i>	Teste da brucelose
Pesquisa de anticorpos para <i>Rickettsia</i> sp	Reação de aglutinação de Weil-Felix
Pesquisa de anticorpos para <i>Salmonella</i> sp	Reação de aglutinação de Widal