



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Rebelo Viegas

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pelo Dr. João Pedro Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

Marta Rebelo Viegas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado
pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pelo Dr. João Pedro Fernandes e
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Marta Rebelo Viegas, estudante do Mestrado em Análises Clínicas com o nº2014214536, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Relatório de Estágio apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio – Projeto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 6 de setembro de 2023.

Índice

Índice.....	4
Lista de abreviaturas.....	7
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas.....	11
Resumo.....	12
<i>Abstract</i>	12
1. Introdução	13
2. Método analítico	14
2.1 Fase pré-analítica	14
2.1.1 Colheita de amostras	14
2.1.1.1 Punção venosa	14
2.1.1.2 Colheita de urina.....	16
2.1.1.3 Colheita de fezes.....	17
2.1.1.4 Colheita de esperma	17
2.1.1.5 Colheita de zaragatoas e exsudados.....	18
2.1.2 Pré-tratamento e triagem.....	18
2.2 Fase analítica	19
2.3 Fase pós-analítica.....	21
3. Bioquímica Clínica	21
3.1 Instrumentação analítica	21
3.1.1 Cobas 6000 – módulo c501	21
3.1.1.1 Espectrofotometria/Colorimetria.....	22
3.1.1.2 Potenciometria.....	22
3.1.1.3 Turbidimetria e nefelometria.....	23
3.1.2 Arkray Adams HA-8190V	23
3.1.3 Helena SAS-1 SAS-2 Plus.....	24
3.1.4 Aucion Max AX-4060.....	24
3.2 Estudo da função renal	24
3.2.1 Creatinina.....	25
3.2.2 Ureia	25
3.2.3 Ácido úrico.....	26
3.2.4 Microalbuminúria	26
3.3 Estudo do equilíbrio hidroeletrolítico	27
3.3.1 Sódio.....	27

3.3.2 Potássio	28
3.3.3 Cloreto.....	28
3.4 Estudo do metabolismo dos hidratos de carbono.....	29
3.4.1 Glicose.....	29
3.4.2 Hemoglobina glicada.....	30
3.5 Estudo do metabolismo lipídico	30
3.5.1 Colesterol total	31
3.5.2 Colesterol LDL.....	31
3.5.3 Colesterol HDL.....	31
3.5.4 Triglicerídeos	32
3.6 Estudo da função hepática	33
3.6.1 Bilirrubina.....	34
3.6.2 Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase.....	34
3.6.3 Gamaglutamiltranspeptidase.....	34
3.6.4 Fosfatase alcalina	35
3.7 Estudo da função pancreática	36
3.7.1 Amilase	36
3.7.2 Lipase.....	37
3.8 Estudo do sistema músculo-esquelético	37
3.8.1 Cálcio.....	37
3.8.2 Fósforo	38
3.8.3 Magnésio	38
3.8.4 Creatinafosfocinase	39
3.9 Estudo do metabolismo do ferro e anemias	39
3.9.1 Ferro.....	40
3.9.2 Transferrina.....	40
3.9.3 Lactato desidrogenase	41
3.10 Estudo do metabolismo das proteínas	42
3.10.1 Proteínas totais	42
3.10.2 Albumina.....	42
3.10.3 Imunoglobulinas.....	43
3.10.4 Proteína C Reativa.....	43
3.10.5 Eletroforese das proteínas.....	44
3.11 Pesquisa de sangue oculto nas fezes.....	45
3.12 Espermograma.....	46
3.13 Análise sumária da urina.....	47

4. Imunologia.....	48
4.1 Instrumentação analítica	48
4.1.1 Cobas 6000 – e601 e Cobas e411	48
4.2 Estudo da função tiroideia.....	49
4.3 Estudo da função endócrina.....	50
4.4 Marcadores tumorais	51
4.5 Vitaminas e outros elementos.....	52
4.6 Serologia infecciosa.....	53
4.6.1 Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus.....	53
4.6.2 Vírus da Imunodeficiência Humana.....	54
4.6.3 Hepatites virais	54
4.6.4 Sífilis	55
4.7 Imuno-hematologia	56
4.7.1 Grupo sanguíneo.....	56
4.7.1.1 Tipagem A, B, 0.....	56
4.7.1.2 Sistema Rhesus	57
4.7.2 Teste de Coombs direto e indireto	57
4.8 Imunoalergologia	57
5. Hematologia	58
6. Microbiologia	59
7. Caso Clínico.....	61
8. Conclusão.....	64
9. Bibliografia	65

Lista de abreviaturas

ACTH – Hormona adenocorticotrófica

AEFA - Asociación Española del Laboratorio Clínico

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT – Alanina Aminotransferase

aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

AST – Aspartato Aminotransferase

ATG – Anti-tiroglobulina

ATPO – Anti-tiroperoxidase

B-HCG – hormona gonadotrofina coriônica humana

CK - Creatinafosfocinase

CQI – Controlo de Qualidade Interno

CRH – Hormona Libertadora de Corticotrofina

DRC – Doença Renal Crónica

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

ECLIA – Eletroquimioluminescência

EPO - Eritropoietina

FSH – Hormona Folículoestimulante

FTA-ABS - Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test

FT4 – T4 livre

HCV – Vírus da Hepatite C

HDL – *High Density Lipoproteins*

HPLC -Cromatografia Líquida de elevada eficiência

INSA – Instituto Nacional de Saúde Pública Doutor Ricardo Jorge

ISE – Eléctrodo Seletivo de Iões

IST – Índice de Saturação da Transferrina

ITU – Infeção do Trato Urinário

LDL – *Low Density Lipoproteins*

LDH -Desidrogenase láctica

LH – Hormona Luteinizante

MAC – Mestrado em Análises Clínicas

PTOG – Prova de Tolerância Oral à Glicose

PTH - Paratormona

PCR – Proteína C Reativa

RAST – Radioalergosorbent Test

Rh - Rhesus

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RPR – Rapid Plasma Reagin

SEQC – Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

SLS – Laurisulfato de Sódio

SNS – Serviço Nacional de Saúde

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TIBC – Capacidade Total de Fixação do Ferro

TP – Tempo de Protrombina

TPHA – Treponema Pallidum Hemagglutination assay

TRABS – Anticorpo Anti-Recetor TSH

TRH – Hormona Libertadora da Tireotrofina

TSH – Hormona Tiroestimulante

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

VDRL – Veneral Disease Research Laboratory

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VLDL – Very Low Density Lipoproteins

Índice de Figuras

Figura 1 - esquematização de um espectrofotómetro.....	17
Figura 2 - diagrama esquemático comparativo do método turbidimétrico com o método nefelométrico.....	19

Índice de Tabelas

Tabela 1 – equipamentos utilizados em cada valência laboratorial.....	14
Tabela 2 – parâmetros analíticos utilizados para o estudo da função renal.....	22
Tabela 3 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do equilíbrio hidroeletrólítico.....	24
Tabela 4 – parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono.....	26
Tabela 5 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do metabolismo lipídico.....	28
Tabela 6 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação da função hepática.....	31
Tabela 7 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação da função pancreática.....	32
Tabela 8 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do sistema músculo-esquelético.....	34
Tabela 9 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do metabolismo do ferro e anemias.....	37
Tabela 10 - parâmetros analíticos utilizados para avaliação do estudo das proteínas.....	39
Tabela 11 – tabela representativa de situações patológicas que podem ser causadoras de alterações na eletroforese de proteínas.....	40
Tabela 12 – tabela resumo dos marcadores tumorais avaliados no laboratório e o seu significado clínico.....	47
Tabela 13 – tabela resumo da interpretação dos marcadores serológicos na infecção pelo vírus da hepatite B.....	56
Tabela 14 – resultados analíticos obtidos a 13/7/2023.....	63

Resumo

O presente relatório de estágio foi elaborado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e descreve de forma sucinta as atividades desenvolvidas entre dezembro de 2022 e junho de 2023 no Laboratório de Análises Clínicas ACM.

O laboratório de análises clínicas cada vez mais se apresenta como uma ferramenta útil no diagnóstico clínico de várias patologias, o que demonstra a relevância do trabalho realizado nestes locais.

Ao longo do relatório são abordadas as três fases do método analítico, assim como a sua importância na garantia de qualidade dos resultados analíticos. Posteriormente é feita uma apresentação geral de todas as valências laboratoriais, com um maior destaque para as áreas de Bioquímica Clínica e Imunologia, onde são descritas de forma mais exaustiva as análises clínicas efetuadas, metodologias e processos de trabalho.

Palavras-chave: análises clínicas; diagnóstico; método analítico; bioquímica clínica; imunologia; qualidade.

Abstract

This report was elaborated as a result of the Masters Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra and it describes, in a succinct way, the activities developed between December 2022 and June 2023 at ACM Clinical Analysis Laboratory.

The clinical analysis laboratory presents itself as a useful tool in the diagnosis of several diseases, which highlights the work done in these places.

Throughout the report the three phases of the analytical method are referenced, as well as their importance for the quality assurance of the analytical results. Following, a general presentation of all the laboratory areas, focusing in Clinical Chemistry and Immunology, where a more complete description of the clinical analysis executed, methodologies and workflows is made.

Key-words: clinical analysis; diagnosis; analytical method; clinical chemistry; immunology; quality.

I. Introdução

Os laboratórios de análises clínicas privados convencionados com o Serviço Nacional de Saúde (SNS) encontram-se inseridos na área dos meios complementares de diagnóstico, constituindo um serviço essencial aos prestadores de cuidados de saúde primários, nomeadamente no auxílio ao diagnóstico clínico e à monitorização de várias patologias.

O Mestrado em Análises Clínicas (MAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permite aos seus estudantes o contacto com a profissão antes do ingresso no mercado de trabalho, o que possibilita o aprofundamento e consolidação dos conhecimentos do ponto de vista técnico-laboratorial.

O estágio curricular decorreu de dezembro de 2022 a junho de 2023 no Laboratório ACM, Lda. Este laboratório está sediado em Tondela e possui unidades de colheita em vários locais do distrito de Viseu, recebendo uma média de 150 utentes por dia. Além de técnicos de análises clínicas, a equipa de recursos humanos é composta por dois especialistas em análises clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, a Dra. Cidália Mariluz Teixeira, diretora técnica do laboratório, e o Dr. João Pedro Fernandes, orientador do meu estágio.

Com a realização deste estágio foi possível contactar com as diferentes valências do laboratório de análises clínicas, como a hematologia, bioquímica clínica, imunologia e microbiologia. O presente relatório de estágio irá fazer referência a todas as valências laboratoriais, com destaque para as áreas de bioquímica clínica e imunologia, sendo feita uma abordagem mais pormenorizada a ambas.

Os objetivos do estágio são a consolidação de conhecimentos adquiridos durante o MAC, aquisição de novos conhecimentos do ponto de vista prático, desenvolver a capacidade de decisão, interpretação e validação de resultados e a correta integração do método analítico, com a aplicação de melhorias nas três fases já conhecidas (fase pré-analítica, analítica e pós-analítica).

2. Método analítico

O método analítico engloba todo o processo de realização do teste laboratorial, desde o pedido do teste a realizar, até à sua validação analítica e biopatológica. De um modo geral o método analítico está dividido em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Todas estas fases estão sujeitas a erros e o fluxo de trabalho num laboratório de análises clínicas deve ser realizado de modo a minimizar estes erros de forma a que os resultados reportados sejam fiáveis e possam efetivamente ajudar ao objetivo clínico.

2.1 Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inclui todos os processos realizados antes da execução do teste laboratorial propriamente dito. Embora todas as fases do método analítico sejam consideradas de igual importância, devemos dar especial atenção a esta já que é uma fase tipicamente manual, sujeita ao erro humano, sendo responsável por 18,5 a 47,0% dos erros laboratoriais.¹ A colheita das amostras é uma das etapas da fase pré-analítica mais sujeita à ocorrência de erros.

2.1.1 Colheita de amostras

Para a realização de análises clínicas podem ser utilizados vários tipos de amostras biológicas mediante a análise requisitada. Amostras como sangue, fezes, urina e esperma são frequentemente requisitadas, assim como os vários tipos de exsudados, entre outras. A correta realização da colheita destas amostras é essencial para minimizar os erros decorrentes da fase pré-analítica. Nem todas estas colheitas estão dependentes do pessoal qualificado do laboratório (como é o caso da urina, fezes e esperma), devendo nesses casos ser dada uma explicação simples e clara ao utente sobre a forma correta de obter as amostras.

2.1.1.1 Punção venosa

A colheita de sangue por punção venosa é um dos tipos de colheitas que está dependente do profissional de saúde. Esta pode ser realizada por 2 sistemas: o sistema aberto – agulha acoplada a uma seringa – ou o sistema fechado, também chamado de sistema a vácuo. O

sistema fechado é preferível já que é mais seguro para o profissional de saúde e também facilita a extração de múltiplos tubos com uma só punção.

Durante a realização da colheita sanguínea deve ser confirmada a identidade do utente. Deve também ser confirmado o seu estado de jejum, consoante os testes laboratoriais a serem realizados. Para efetuar a colheita deve ser identificada a veia a puncionar, idealmente na fossa cubital. O garrote deve ser colocado no braço, um pouco acima do local a puncionar e pede-se ao utente para fechar a mão. O local tem de ser desinfetado com álcool a 70%, devendo aguardar-se a sua secagem após a qual se punciona a veia, fazendo a colheita da quantidade de sangue necessária para as análises a realizar, não esquecendo de retirar o garrote. Após a colheita, no caso de ter sido usado o sistema aberto, o sangue deve ser distribuído pelos vários tubos necessários às análises a realizar, devendo ser cumprido o volume de enchimento de cada tubo. Todos os tubos colhidos devem ser agitados, corretamente identificados com as etiquetas correspondentes e todo o material utilizado deve ser corretamente descartado.

De entre os erros associados à colheita da amostra podem destacar-se:

- Incorreta identificação da amostra - com o intuito de minimizar este erro o nome do utente deve ser sempre confirmado com o próprio, devendo também ser confirmada a concordância do mesmo com o nome impresso nas etiquetas;
- Colheita dos tubos errados - Para evitar a colheita dos tubos errados, estes possuem tampas de cores diferentes que permitem a sua fácil identificação. No entanto, este código de cores ainda não está harmonizado entre todos os fornecedores e, por isso, não pode ser considerado universal.²
- Colheita dos tubos na ordem errada - Os tubos possuem diferentes constituintes no seu interior e, por isso, existe uma ordem correta para fazer a colheita com recurso ao sistema fechado, para evitar a contaminação da amostra com um anticoagulante que possa provocar um erro pré-analítico. A título de exemplo, o tubo utilizado nas determinações bioquímicas (tubo contendo ativador de coágulo e gel de separação) deve ser sempre colhido antes do tubo utilizado na hematologia para realização do hemograma, que contém como anticoagulante o EDTA K2. Aquando da colheita do tubo contendo EDTA K2, vai haver solubilização dos sais de EDTA conforme o sangue vai entrando no tubo; o sangue com o anticoagulante solubilizado vai entrar em contacto com a agulha, contaminando-a com o EDTA. A colheita posterior do tubo de bioquímica vai contaminar a amostra, podendo provocar hipercaleiémia ou hipocalcemia erróneas.²

- Colheita traumática / Uso de calibre de agulha inadequado – estas duas situações conduzem à hemólise da amostra. Esta corresponde à rutura da membrana dos eritrócitos e outras células sanguíneas, com libertação do conteúdo citoplasmático para o plasma sanguíneo, podendo levar à alteração da concentração de alguns analitos. A hemólise é a causa mais frequente de erros pré-analíticos que resultam na rejeição da amostra e pedido de nova colheita.

2.1.1.2 Colheita de urina

A urina é um tipo de amostra cuja colheita não está dependente do profissional de saúde, mas sim do próprio utente. O correto aconselhamento relativamente às precauções a implementar durante a colheita são essenciais à obtenção de uma amostra de qualidade. Estas recomendações são diferentes consoante a análise a ser realizada. As análises urinárias são inúmeras, mas podemos destacar a urina tipo II, microalbuminúria aleatória/urina de 24 horas e a urocultura.

Para as análises de urocultura e urina tipo II, deve ser colhida, idealmente, a primeira urina da manhã, já que esta é a mais concentrada. Caso isto não seja possível e a realização da análise seja urgente, deve aguardar-se pelo menos 3 horas após a última micção para realizar a colheita. A colheita deve ser efetuada após higienização e descartando sempre o primeiro jato de urina.³

A colheita da urina para realização da análise da microalbuminúria aleatória, tal como o nome indica, pode ser feita a qualquer hora do dia, representando, por isso, uma amostra aleatória.² No caso de a análise prescrita ser a microalbuminúria em urina de 24 horas, deve ser colhida a urina ao longo de um dia inteiro para um recipiente fornecido pelo laboratório. A amostra deve ser guardada no frigorífico e, uma vez finalizada a colheita, prontamente entregue ao laboratório para análise. As mesmas recomendações de colheita devem ser seguidas para a determinação de qualquer outro analito num espaço de tempo determinado. A análise deste tipo de urina permite minimizar a influência das pequenas flutuações biológicas que vão ocorrendo ao longo do dia.²

2.1.1.3 Colheita de fezes

A amostra de fezes é utilizada em vários tipos de análises. As mais usuais num laboratório de análises clínicas em contexto de ambulatório são a pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF), coprocultura e exame parasitológico das fezes.

Na PSOF o pedido médico prevê, usualmente, a colheita de 3 amostras em dias diferentes. A dejeção deverá ser efetuada para um local limpo e seco, após a qual o utente deverá fazer a colheita de uma amostra representativa de fezes. O utente não deverá estar a realizar terapêutica com ferro, já que este pode ser um interferente para a análise.

A coprocultura corresponde ao exame bacteriológico das fezes. Geralmente, uma única amostra é suficiente para fazer o diagnóstico de uma infeção. De igual modo, as fezes devem ser colhidas para um local limpo e seco e o utente deve ser instruído a colher uma pequena porção; se verificar a presença de muco, pus ou sangue, estes deverão fazer parte da colheita.³

No exame parasitológico das fezes, é geralmente requisitada a colheita de 3 amostras em dias alternados, já que a libertação de formas parasitárias não ocorre de forma contínua. O utente deve ser informado dos medicamentos e compostos químicos que interferem no exame (anti-diarreicos, anti-ácidos, derivados de bismuto e bário, vaselina, etc), assim como dos alimentos que podem dificultar a visualização das formas parasitárias e produzir resultados falsos negativos (alimentos ricos em resíduos como legumes secos, frutos com cutícula resistente e frutos com inúmeros grãos de pequeno tamanho).³

2.1.1.4 Colheita de esperma

A colheita de esperma é necessária sempre que é prescrito pelo médico a realização de um espermograma ou espermocultura. Devem ser dadas instruções claras ao utente sobre como realizar a colheita da amostra.

A amostra deve ser obtida por masturbação, após um período de abstinência entre 2 a 7 dias. O ejaculado deve ser colhido na sua totalidade para o frasco asséptico fornecido, sendo que qualquer perda de volume deve ser reportada ao laboratório. Após realização da colheita, a amostra deve ser de imediato entregue no laboratório, devendo o transporte ser feito de forma a manter a temperatura da amostra entre os 20-37°C. A celeridade na sua entrega é essencial para que os resultados sejam fidedignos.⁴

2.1.1.5 Colheita de zaragatoas e exsudados

Para o estudo de infeções por microrganismos, podem ser colhidas vários tipos de amostras, consoante o local da infeção e a suspeita de microrganismos causadores da infeção. De um modo geral, nestas colheitas devemos ter em conta que além do potencial microrganismo causador de infeção, temos presente a microbiota local. A colheita deve ser sempre realizada de forma a minimizar a presença da microbiota na amostra colhida. No laboratório ACM, as colheitas realizadas com maior frequência são o exsudado vaginal, exsudado nasofaríngeo e exsudado orofaríngeo.

O exsudado vaginal pode ser colhido no contexto da rotina de gravidez para a pesquisa de estreptococos grupo B ou para a pesquisa de agentes infecciosos. Nas grávidas, a colheita deve ser realizada sem introdução de espéculo, inserindo uma zaragatoa em meio de transporte simples na porção distal do canal vaginal, seguido da sua inserção na região anorretal. No caso da pesquisa de agentes infecciosos, a utente deve ser instruída a não realizar a higiene no dia da colheita; com recurso a um espéculo são colhidas as zaragatoas na porção mais alta da mucosa vaginal. Deve ser colhida uma zaragatoa seca para fazer dois esfregaços em lâmina no momento da colheita e uma zaragatoa em meio de transporte adequado.³

O exsudado orofaríngeo é frequentemente requisitado para pesquisa de estreptococos do grupo A. O utente deve estar em jejum e sem realizar a higiene oral. A colheita é realizada com recurso a uma zaragatoa que deverá ser rodada sob zonas com inflamação, pus e pontos brancos nas amígdalas e faringe posterior, evitando tocar na língua, úvula e paredes da cavidade oral.³ Poderá ser colhida uma zaragatoa seca no caso de a análise requisitada ser a pesquisa de estreptococos do grupo A através de um teste rápido.

2.1.2 Pré-tratamento e triagem

Uma vez colhidas, as amostras podem necessitar de um pré-tratamento antes de proceder à sua análise. O pré-tratamento mais comum é a centrifugação, sendo que o número de rotações por minuto e o tempo necessário dependem do tipo de amostra a obter.

Tanto o plasma como o soro devem ser separados dos restantes constituintes celulares com recurso à centrifugação, que deve ser efetuada num prazo máximo de duas horas após a colheita para evitar flutuações de alguns parâmetros por contacto com os eritrócitos (alguns parâmetros, por exemplo a paratormona (PTH), devem ser centrifugados o mais rapidamente possível). No entanto, no caso do soro, a centrifugação prematura também pode provocar

problemas por permitir a formação de fibrina que posteriormente pode provocar resultados errôneos e danos nos equipamentos durante a pipetagem da amostra.

Após finalização do pré-tratamento necessário, as amostras são alvo de uma triagem para serem direcionadas para o setor laboratorial em que irão ser analisadas. No laboratório ACM esta triagem é feita manualmente com recurso ao sistema informático. A realização desta triagem permite otimizar o fluxo de trabalho do laboratório.

2.2 Fase analítica

A fase analítica engloba a realização da análise propriamente dita, com recurso a instrumentação e metodologia adequadas. É uma fase do método analítico tipicamente automatizada e que, por isso, está sujeita a uma menor incidência de erros.

Os equipamentos usados nas diferentes valências laboratoriais no laboratório ACM são apresentados na tabela I. São também utilizadas algumas técnicas manuais.

Área	Equipamento	Metodologia
Hematologia	Sysmex XN-1000	Citometria de fluxo fluorescente; Impedância; Método SLS
	Stago Start	Deteção eletromecânica
Bioquímica Clínica	Cobas 6000 - c501	Espectrofotometria; ISE; Turbidimetria; Nefelometria
	Helena SAS-1 SAS-2 Plus	Eletroforese em gel de agarose
	ADAMS HA-8190V	HPLC
	Aution Max AX-4060	Refletância; Refractometria; Dispersão de luz
Imunologia	Cobas 6000 - e601	Eletroquimioluminescência
	Cobas e411	Eletroquimioluminescência
Microbiologia	Vitek 2 Compact	Espectrofotometria; Nefelometria

Tabela I – equipamentos utilizados em cada valência laboratorial.

Durante a fase analítica é de elevada importância a garantia de qualidade, para que haja fiabilidade nos resultados obtidos. Em todos os laboratórios deve existir um sistema de garantia de qualidade que define responsabilidades, procedimentos, processos e recursos para a garantia de qualidade.⁵ No laboratório ACM é realizado o controlo de qualidade interno (CQI) e avaliação externa de qualidade (AEQ).

O controlo de qualidade interno (CQI) serve para garantir que os resultados produzidos pelo equipamento são corretos, permitindo identificar possíveis erros antes de os resultados emitidos poderem afetar a decisão clínica. São utilizados controlos fornecidos pelas casas comerciais, que têm uma concentração previamente conhecida para os vários parâmetros, descritas nas cartas de controlo; os controlos são analisados e é realizada uma comparação entre o valor obtido e o valor expectável. A título de exemplo, o plano de CQI para o Cobas 6000 – módulo c501 passa pela execução diária de um nível de controlo para todos os parâmetros. A *Roche Diagnostics* fornece dois níveis de controlo, um normal e um patológico. Sempre que se verifique uma calibração, mudança de reagente e/ou lote ou for detetada alguma anomalia nos resultados obtidos ao longo do dia de trabalho, deve ser feito um novo controlo de qualidade. Os valores obtidos devem encontrar-se entre o -2SD e o +2SD relativamente ao valor médio expectável; no entanto, as cartas de controlo devem ser analisadas como um todo, devendo ser observadas as tendências e podem ser aplicadas as regras de Westgard para fazer a análise e decidir sobre eventuais ações corretivas a implementar.

A avaliação externa da qualidade (AEQ) é outra forma de garantia de qualidade laboratorial. É realizada a partir de amostras fornecidas por promotores externos que conhecem rigorosamente a concentração dos vários analitos. Vários laboratórios participam nestes programas e enviam os seus resultados. No final é feita uma análise estatística dos resultados pelo promotor, permitindo a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes laboratórios, usando o mesmo método ou métodos diferentes. Este tipo de controlo permite detetar falhas nos equipamentos e reagentes que poderiam não ser detetadas de outra forma, nomeadamente erros sistemáticos, desencadeando ações corretivas que melhoram a performance do laboratório. O laboratório ACM participa em diversos programas de AEQ:

- RIQAS (Randox International quality assessment scheme) – programa para a bioquímica clínica, hemoglobina glicada, imunologia, hemograma e coagulação.
- SEQC (Sociedad Española de Medicina de Laboratorio) – Proteínas (inclui eletroforese das proteínas) e serologia.

- INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) – Hematologia (observação de lâminas), anticorpos anti-tiroideus, anticorpos anti-citomegalovírus, diagnóstico imunológico da gravidez, PSOF e grupo sanguíneo.
- AEFA (Asociación Española del Laboratorio Clínico) – urianálise qualitativa e quantitativa, microbiologia e espermograma.

2.3 Fase pós-analítica

A fase pós-analítica é a última fase do método analítico e pressupõe a validação analítica dos resultados, que é feita por pessoal técnico qualificado sob supervisão de um especialista, e a validação biopatológica dos resultados, efetuada por um especialista em análises clínicas.⁵ Para que possa ser feita a validação analítica dos resultados, é imprescindível que o técnico seja conhecedor dos resultados do CQI.

A validação biopatológica corresponde à análise final e validação do boletim de análises por um especialista em análises clínicas. Ao olhar para as várias análises dos diferentes setores do laboratório de análises clínicas como um todo é possível perceber se existe compatibilidade entre os resultados obtidos e o histórico do utente e, no caso de existirem variações abruptas, se é concordante com terapêutica efetuada ou com variações no seu estado clínico.⁵

3. Bioquímica Clínica

A bioquímica clínica é uma valência laboratorial muito abrangente. Nesta são determinados uma grande variedade de parâmetros, essenciais ao diagnóstico clínico e ao controlo de patologias pré-existentes, com recurso a vários equipamentos automatizados com diferentes técnicas instrumentais de análise, mas também com recurso a técnicas manuais.

3.1 Instrumentação analítica

3.1.1 Cobas 6000 – módulo c501

O Cobas 6000 – módulo c501 é o equipamento responsável por grande parte das determinações analíticas efetuadas no laboratório. É constituído pela unidade core, onde são carregadas as amostras para análise e descarregadas pelo próprio aparelho após pipetagem, e

o módulo c501. Este módulo é constituído por uma unidade fotométrica, onde são realizadas grande parte das determinações, e uma unidade ISE (eléctrodo seletivo de iões).⁶ Entre as técnicas instrumentais de análises utilizadas por este equipamento temos a espectrofotometria/colorimetria, potenciometria, turbidimetria e nefelometria.

3.1.1.1 Espectrofotometria/Colorimetria

A espectrofotometria é um método que se baseia na medição da absorção e emissão de luz quando uma solução é irradiada por um feixe de luz com um determinado comprimento de onda. É utilizada luz da região do ultravioleta à região do visível (290-750nm).² Através do espectrofotómetro é possível medir a quantidade de luz absorvida, de forma indireta, através da luz transmitida após incidência numa solução, com recurso a um fotodetector.² Através da lei de Beer-Lambert é possível calcular a concentração do analito de interesse.² Esta equação estabelece que a concentração do analito na amostra é diretamente proporcional à absorção e inversamente proporcional ao logaritmo da luz transmitida.²

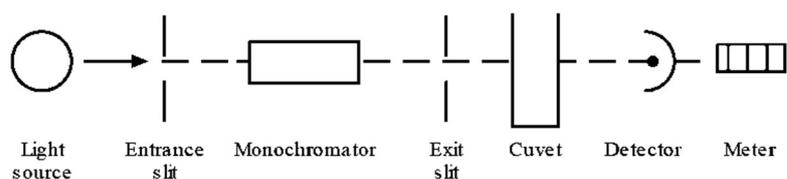


Figura 1 – esquematização de um espectrofotómetro.²

A construção de uma curva de calibração permite aplicar à lei de Beer-Lambert um fator de calibração que posteriormente é usado para o cálculo da concentração do analito de interesse numa determinada amostra. É também importante nesta técnica estabelecer o “branco” da cuvete para eliminar a absorção que possa ocorrer na parede da cuvete e no solvente utilizado.²

3.1.1.2 Potenciometria

A potenciometria é um método eletroquímico que se baseia na medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos, conectados por uma solução eletrolítica, constituindo este conjunto uma célula eletroquímica. Estes dois eléctrodos são o eléctrodo de referência e o eléctrodo indicador.²

O método ISE utilizado pelo módulo c501, utiliza uma membrana semipermeável que permite desenvolver um potencial elétrico gerado por diferentes concentrações iônicas nos dois lados da membrana. A diferença de potencial entre os dois eletrodos gera uma força eletromotriz que permite calcular a concentração iônica com recurso à equação de *Nernst*.⁷

3.1.1.3 Turbidimetria e nefelometria

A turbidimetria e a nefelometria são técnicas analíticas que se baseiam na medição da dispersão de luz. Esta ocorre quando um feixe de energia, ao incidir numa solução, encontra moléculas e, numa colisão elástica, dispersa a luz em diferentes direções.²

No método turbidimétrico, a determinação da concentração do analito é feita medindo a luz transmitida no mesmo ângulo do feixe de luz incidente.² A concentração do analito é inversamente proporcional à quantidade de luz que chega ao detetor num ângulo de 180°. A nefelometria difere do método turbidimétrico porque mede, efetivamente, a dispersão de luz. O detetor (nefelómetro) encontra-se num ângulo entre 30° e 90° em relação à luz incidente.² Nesta técnica a concentração do analito vai ser proporcional à dispersão da luz.

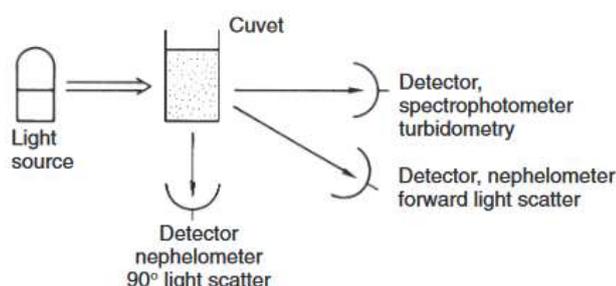


Figura 2 – diagrama esquemático comparativo do método turbidimétrico com o método nefelométrico.⁷

Ambos os métodos estão limitados pelo efeito matriz, já que macromoléculas e partículas que possam estar naturalmente presentes na amostra vão também provocar dispersão de luz. A lipemia é um dos interferentes nesta metodologia.

3.1.2 Arkray Adams HA-8190V

O Arkray Adams HA-8190V é o equipamento utilizado no laboratório para fazer a determinação da hemoglobina glicada através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este separa as várias frações da hemoglobina, utilizando uma coluna

composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa: o sangue total é diluído num reagente de hemólise, que expõe o conteúdo dos eritrócitos; as diferentes frações de hemoglobina são separadas através de diferentes interações eletrostáticas que têm com a coluna sendo posteriormente feita a eluição com três buffers de fosfato de força iónica crescente; a leitura é feita entre os 415 e os 500 nm e os resultados são quantificados pela integração da área sob a curva.

3.1.3 Helena SAS-I SAS-2 Plus

O Helena SAS-I SAS-2 Plus é um equipamento que realiza a metodologia de eletroforese. Separa as proteínas plasmáticas de acordo com o peso molecular e carga eléctrica através da aplicação de um campo eléctrico. Posteriormente faz a coloração do gel de modo a poder visualizar esta separação e poder estimar a concentração sérica de cada fração.

3.1.4 Aution Max AX-4060

O Aution Max AX-4060 é o equipamento utilizado para a análise sumária da urina, através da utilização de tiras teste. Os vários parâmetros são analisados através de refratometria, refletância, medição da fototransmissão e da dispersão da luz. Trata-se de um equipamento totalmente automatizado.

3.2 Estudo da função renal

O rim é um órgão vital responsável por 3 funções primordiais: excreção de produtos do metabolismo corporal, manutenção da homeostase de água, eletrólitos e equilíbrio ácido-base e síntese hormonal.⁷ A avaliação da função renal torna-se essencial de forma a detetar decréscimo na atividade renal atempadamente, já que a diminuição da função renal está associada a aumento da morbidade e mortalidade.

Compostos nitrogenados não-proteicos como a creatinina, ureia e ácido úrico são eliminados pelo rim na urina após filtração glomerular. O doseamento destes metabolitos no soro é um bom indicador do estado da função renal, podendo a creatinina ser também usada para calcular a taxa de filtração glomerular (TFG).²

3.2.1 Creatinina

A creatinina forma-se espontaneamente através da creatina e da fosfocreatina no músculo durante processos metabólicos de contração muscular. Deste modo, a quantidade de creatinina produzida diariamente por um indivíduo está dependente da sua massa muscular e é, regra geral, constante, havendo pouca influência da dieta nos seus níveis séricos.²

Como a filtração glomerular é o principal método de eliminação da creatinina, esta é um indicador bastante específico do estado da função glomerular; no entanto, falha na sensibilidade já que os seus valores séricos podem manter-se dentro dos valores de referência quando já existe perda significativa de função renal. Por isso, grandes oscilações na concentração sérica de creatinina num indivíduo, ainda que dentro dos valores de referência, devem ser sinal de alarme uma eventual diminuição da função renal.²

A *clearance* da creatinina é definida como o volume de plasma do qual a creatinina é completamente eliminada num determinado período de tempo. É normalmente expressa em ml/min. O seu cálculo é feito com recurso a uma fórmula utilizando o valor da concentração sérica da creatinina e da concentração de creatinina excretada na urina num determinado período de tempo (geralmente 24 horas) e o volume total de urina:

$$\text{Clearance creatinina} = [\text{creatinina urinária}] \times \text{volume} / [\text{creatinina sérica}]^7$$

Esta pode ser utilizada para estimar a TFG, no entanto pode resultar numa sobrestimação devido à secreção tubular de que a creatinina pode ser alvo.² Por isso, hoje em dia começam a ser utilizadas fórmulas para calcular a *clearance* da creatinina estimada (ex: fórmula de Cockcroft-Gault) que têm em consideração a creatinina sérica, idade, sexo, peso e raça. O facto de ter em conta estas variáveis e de não necessitar da colheita de urina de 24 horas fazem com que este método seja o ideal para calcular a TFG e avaliar a função renal em conjunto com o doseamento da creatinina sérica.²

3.2.2 Ureia

A ureia é o principal produto resultante do catabolismo proteico. A sua síntese ocorre no fígado, como resultado da hidrólise de proteínas, resultando em aminoácidos, que posteriormente são transformados em amónia. De forma a evitar a toxicidade por acumulação de amónia, esta é transformada em ureia por ação de enzimas hepáticas do ciclo da ureia.⁷ É eliminada por via renal e pelo suor. A taxa de formação de ureia está dependente do

catabolismo das proteínas provenientes de fontes endógenas, mas também das proteínas provenientes da dieta.² Por isso, trata-se de um marcador com fraca sensibilidade e especificidade para isoladamente avaliar a função renal. Ainda assim, é utilizada para avaliar a adequação do tratamento em hemodialisados, em conjunto com a creatinina.²

3.2.3 Ácido úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, adenina e guanina. Estes nucleótidos derivam maioritariamente da produção endógena, mas também, em menor extensão, da dieta.²

Trata-se também de um marcador da função renal com fraca sensibilidade e especificidade. A hiperuricemia pode ser provocada por um aumento na formação de ácido úrico - associado a doenças metabólicas que possam aumentar a produção de purinas, aumento da ingestão de purinas, aumento do turnover dos ácidos nucleicos (leucemia, mieloma múltiplo, quimioterapia, etc), entre outros -, ou devido a uma diminuição na sua excreção, e nesta é que se inclui a doença renal crónica (DRC).² O aumento do ácido úrico sérico é responsável pela gota, patologia em que cristais de urato monossódico se formam nas articulações, provocando uma resposta inflamatória intensa.² O doseamento do ácido úrico é, por isso, também utilizado para monitorizar doentes com gota.

3.2.4 Microalbuminúria

A microalbuminúria é definida como a eliminação de pequenas quantidades anormais de albumina na urina.⁷ É um marcador utilizado para detetar precocemente alterações da função renal, previamente a serem detetados outros tipos de alterações, como o aumento da creatinina sérica, entre outros. Trata-se de uma análise de elevada importância no acompanhamento de doentes com diabetes mellitus, que têm um risco muito elevado de desenvolver nefropatia.⁷ Durante a fase inicial da nefropatia diabética, já existe lesão renal, mas ainda não é possível detetá-la com a realização de outras análises; torna-se, por isso, de elevada importância a realização da microalbuminúria. Esta pode ser realizada em urina de 24 horas ou numa amostra de urina aleatória, fazendo-se nesta última a razão albumina/creatinina.

Parâmetro	Método	Valores de referência
Creatinina	Reação de Jaffé modificada.	H- 0,60-1,10 mg/dL M- 0,50-0,80 mg/dL
Ureia	Método cinético com urease e glutamato desidrogenase.	17-49 mg/dL
Ácido úrico	Método colorimétrico com uricase.	H- 3,5-7,2 mg/dL M- 2,6-6,0 mg/dL
Microalbuminúria	Imunoturbidimetria	< 30 µg/24h ou < 30 µg/mg creatinina

Tabela 2 – parâmetros analíticos utilizados para o estudo da função renal.²

3.3 Estudo do equilíbrio hidroeletrolítico

Os eletrólitos são definidos como aniões e catiões com importantes funções fisiológicas, entre as quais a regulação osmótica, manutenção do ritmo e contração cardíaca, manutenção do equilíbrio ácido-base, coagulação sanguínea, excitação neuromuscular, entre outros.⁷ Entre os vários eletrólitos podemos destacar os de maior importância: sódio, potássio e cloreto. Tratam-se de determinações muito sujeitas a interferentes pré-analíticos, nomeadamente a hemólise e a utilização de um tubo de colheita inadequado, devendo as amostras com este tipo de erros ser descartadas, com solicitação de nova colheita.

3.3.1 Sódio

O sódio é o principal catião dos fluídos extracelulares, sendo responsável pela manutenção dos níveis de água e a pressão osmótica nos compartimentos extracelulares. O sódio é filtrado a nível glomerular, sendo 70-80% reabsorvidos ativamente nos túbulos proximais e 20-25% reabsorvidos na ansa de Henle.²

A regulação da concentração de sódio sérico depende da ingestão e excreção de água e sódio e também da regulação renal do sódio. A sua concentração vai ser regulada maioritariamente pelo rim com base na sua concentração sérica e na volemia, no entanto podem ocorrer distúrbios nesta regulação. Retenção de líquidos, desequilíbrios de hidratação,

doença tubular renal, terapêutica com diuréticos tiazídicos, vômitos e diarreia podem provocar hiponatremia. Desidratação, aumento da ingestão de sódio e vômitos e diarreias severos são causas de hipernatremia.⁷

3.3.2 Potássio

O potássio é o principal catião intracelular, exercendo funções cruciais na contratilidade do músculo esquelético e cardíaco. A sua elevada concentração no interior das células é mantida pela bomba Na^+/K^+ ATPase, que o transporta para o seu interior contra um gradiente de concentração. A alteração dos valores séricos de potássio é indicativa de lesão renal.

A hipercalemia é uma situação grave devido às alterações que pode provocar na contratilidade cardíaca, podendo desencadear arritmias ou até paragem cardíaca. Entre as causas estão o uso de alguns medicamentos, ou patologias como a diabetes, insuficiência renal ou acidose metabólica.⁷ Já a hipocaliemia pode ocorrer por perda renal (utilização de diuréticos tiazídicos, nefrite, síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo, etc), perda gastrointestinal através de vômitos e diarreia severos, alcalose, entre outros; esta pode provocar fraqueza muscular e o risco de paragem cardíaca em doentes com problemas cardiovasculares.⁷

Os eritrócitos, tais como as restantes células, têm uma elevada concentração intracelular deste ião e, por isso, a hemólise constitui um interferente desta determinação. O modo de realização da colheita é também muito importante para não produzir resultados erradamente elevados.⁷

3.3.3 Cloreto

O cloreto é o principal anião dos fluídos extracelulares. Entre as suas funções estão a manutenção da distribuição da água corporal, manutenção da pressão osmótica e da eletroneutralidade nos fluídos extracelulares.²

As alterações na concentração plasmática de cloreto são normalmente acompanhadas por alterações na concentração do sódio e, portanto, as causas subjacentes à hipocloridemia e hipercloridemia são as mesmas que foram enunciadas para o sódio. Isto acontece porque o cloreto acompanha o sódio nos seus movimentos entre os meios extra e intracelular de forma a manter a eletroneutralidade.²

Parâmetro	Método	Valores de referência
Sódio	Potenciometria	135-145 mmol/L
Potássio	Potenciometria	3,5-5,0 mmol/L
Cloreto	Potenciometria	95-110 mmol/L

Tabela 3 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do equilíbrio hidroeletrólítico.²

3.4 Estudo do metabolismo dos hidratos de carbono

3.4.1 Glicose

A glicose é um monossacarídeo utilizado pelo corpo humano como principal fonte de energia. Todos os tecidos, incluindo o sistema nervoso central, dependem da glicose e a maior parte não tem capacidade de armazenar. Por esta razão, os níveis séricos de glicose têm de ser mantidos constantes dentro de um determinado intervalo de valores, de forma assegurar o correto aporte de energia às células e para não danificar os tecidos com o excesso de glicose no sangue. A regulação da glicémia é feita através de várias vias, tornando-se num processo complexo e altamente regulado por hormonas: insulina (hipoglicemiante) e glucagon (hiperglicemiante), ambas sintetizadas no pâncreas.²

A determinação da concentração sérica de glicose deve ser feita em jejum e é normalmente prescrita para detetar erros no metabolismo dos hidratos de carbono. O mais comumente encontrado é a hiperglicemia, associada, normalmente, à diabetes mellitus. Menos frequentemente, podem ser encontrados defeitos no metabolismo da glicose que conduzem à hipoglicémia, como a existência de tumores pancreáticos produtores de insulina, distúrbios endócrinos, insuficiência hepática, entre outros.

O diagnóstico da diabetes mellitus pressupõe, em alguns casos e de acordo com a norma nº002/2011 da Direção Geral de Saúde⁸, a realização da prova da tolerância oral à glicose (PTOG). Esta deve ser realizada após período de jejum superior a 8 horas e inferior a 16 horas. É realizada uma colheita de sangue em jejum após a qual são administrados 75 g de glicose em solução por via oral, aguardando-se 2 horas para realizar segunda colheita de sangue, sendo feito o diagnóstico se o valor da glicémia às 2 horas for superior a 200 mg/dL.

A PTOG também é realizada rotineiramente nas grávidas entre as 24-28 semanas de gravidez para despiste de diabetes gestacional, sendo os valores de referência diferentes neste caso.

3.4.2 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada resulta da condensação da glicose com o N-terminal do resíduo de valina da cadeia β que constitui a hemoglobina, formando uma base instável de Schiff que sofre rearranjo de Amadori, formando uma cetoamina estável. Esta glicação da hemoglobina é irreversível, mantendo-se durante o tempo de vida do eritrócito (média de 120 dias).² Por esta razão, esta análise é realizada para a monitorização dos doentes com diabetes mellitus. O seu interesse prende-se com a sua visão retrospectiva dos níveis de glicose no sangue nas últimas 8 a 12 semanas, já que esta alteração à hemoglobina se mantém durante todo o tempo de vida do eritrócito e a sua taxa de formação é diretamente proporcional à concentração de glicose no sangue, sendo os períodos de hiperglicemias acentuadas refletidos no seu valor.

Parâmetro	Método	Valores de referência
Glicose	Método enzimático com hexoquinase.	< 100 mg/dL
Hemoglobina glicada	HPLC	<5,7%

Tabela 4 – parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono.^{2,8,9}

3.5 Estudo do metabolismo lipídico

Os lípidos são moléculas que desempenham importantes funções no nosso organismo, nomeadamente na síntese hormonal e de vitaminas, constituição de membranas celulares, fonte energética e auxílio ao processo de digestão.² No entanto, quando em excesso, os lípidos e as lipoproteínas podem ser responsáveis por processos como a aterosclerose, a principal causa de enfarte agudo do miocárdio, doenças vasculares periféricas e doenças cerebrovasculares. A regulação dos seus níveis séricos é de extrema importância para manter o equilíbrio entre as necessidades fisiológicas e o excesso que pode ser causador de doença.²

3.5.1 Colesterol total

O colesterol é uma molécula encontrada quase exclusivamente em animais, exercendo importantes funções fisiológicas. Os níveis séricos de colesterol resultam do equilíbrio entre o que é sintetizado a nível hepático, aquele que é ingerido e a sua catabolização.² O significado clínico do colesterol total, assim como de todos os lípidos, prende-se com o seu papel no desenvolvimento de doenças coronárias, e daí advém o interesse no seu doseamento.

3.5.2 Colesterol LDL

O colesterol LDL corresponde ao colesterol transportado por lipoproteínas de baixa densidade. Este resulta da lipólise das VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) e é facilmente utilizado pelas células sendo removido da corrente sanguínea através da sua ligação ao recetor LDL. Além disso, devido ao seu tamanho reduzido (quando comparadas aos quilomícrons e às VLDL) e quando em elevada concentração no sangue, as LDL conseguem penetrar na parede dos vasos sanguíneos, nomeadamente de artérias. Aqui podem ser alvo de vários processos oxidativos, nomeadamente por parte de macrófagos. Os macrófagos ficam, assim, com um grande conteúdo lipídico intracelular, formando as “células esponjosas”, principais precursores das placas ateroscleróticas.⁷ Assim, o colesterol LDL é o que mais contribui para o desenvolvimento da aterosclerose e níveis séricos elevados estão associados a um aumento do risco de ocorrência de doença coronária e AVC isquémico e daí advém o interesse no seu doseamento a nível laboratorial.

A determinação do colesterol LDL pode ser feita de forma indireta através da fórmula de Friedewald:

$$\text{C-LDL} = [\text{Colesterol total}] - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicerídeos}]/5$$

Esta fórmula não é válida se a concentração de triglicerídeos for superior a 200 mg/dL, se a amostra tiver uma concentração elevada de quilomícrons (amostra pós-prandial) e se a concentração de LDL for muito baixa (inferior a 70 mg/dL). Nestes casos deve optar-se pela determinação direta.²

3.5.3 Colesterol HDL

O colesterol HDL corresponde ao que se encontra nas lipoproteínas de alta densidade, que são as principais intervenientes na via de transporte reverso do colesterol, que tem como

objetivo remover o colesterol em excesso dos tecidos periféricos e retorná-lo ao fígado para que seja excretado, maioritariamente, sob a forma de sais biliares.²

Existe uma relação inversa entre os níveis de HDL e o risco de doença cardiovascular, podendo considerar este tipo de lipoproteínas como protetoras, não só pelo transporte reverso do colesterol de que são responsáveis, mas também pelas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que possuem, podendo inibir a oxidação extravascular do colesterol LDL, por promoverem a angiogénese e também pelas propriedades antitrombóticas.¹⁰ Assim, é de elevada importância clínica a monitorização dos níveis séricos de HDL para avaliar o risco de doença cardiovascular, em conjunto com o restante perfil lipídico.

3.5.4 Triglicerídeos

Os triglicerídeos são obtidos através da dieta; após absorção vão constituir os quilomícrons, em conjunto com o colesterol e apoproteínas, podendo ser utilizados pelas células para obtenção de energia, caso contrário são armazenados no tecido adiposo.² Os triglicerídeos também fazem parte da constituição das VLDL, sendo estas produzidas pelo fígado através dos triglicerídeos provenientes da síntese endógena ou dos armazenados no tecido adiposo.

A determinação sérica dos triglicerídeos torna-se importante para determinar o risco de doença cardiovascular, quando avaliada em conjunto com o restante perfil lipídico. No entanto, esta pode ser usada para monitorizar doenças como a diabetes *mellitus* e outras patologias pancreáticas, glândulas suprarrenais e hipófise.

Parâmetro	Método	Valores de referência
Colesterol total	Método colorimétrico enzimático	< 190 mg/dL.
Colesterol LDL	Método colorimétrico enzimático	Risco cardiovascular baixo: < 115 mg/dL Risco cardiovascular alto: < 100 mg/dL Risco cardiovascular muito alto: < 70 mg/dL
Colesterol HDL	Método colorimétrico enzimático	M - > 45 mg/dL H - > 40 mg/dL
Triglicerídeos	Método colorimétrico enzimático	< 150 mg/dL.

Tabela 5 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do metabolismo lipídico.^{2,11}

3.6 Estudo da função hepática

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano, exercendo importantes funções orgânicas das quais podem ser destacadas quatro: excreção, síntese, metabolização e armazenamento.⁷ No que diz respeito à excreção, o fígado é responsável pela biotransformação de compostos endógenos e exógenos que são posteriormente excretados na urina e biliar.² Relativamente à função de síntese hepática, estão nela incluídas as proteínas, fatores de coagulação, lípidos e lipoproteínas, entre outros.² A função metabólica é de extrema importância e são alvo destas moléculas exógenas, como fármacos e álcool, mas também moléculas endógenas, como a amônia.² Na função de armazenamento, importa referir o fígado como reservatório de glicogénio, tornando-se essencial na homeostase da glicose.²

Trata-se de um órgão com grande capacidade de regeneração celular quando sofre pequenas lesões. No entanto, se sofrer estas lesões continuamente ao longo do tempo, pode sofrer mudanças irreversíveis que vão comprometer o seu funcionamento normal. Torna-se essencial a monitorização laboratorial da função hepática de forma a detetar alterações que podem ter graves consequências para o funcionamento de todo o organismo. Além da determinação dos compostos sintetizados e excretados pelo fígado, é também importante a avaliação de enzimas hepáticas que são libertadas para o plasma.

3.6.1 Bilirrubina

A bilirrubina é um dos exemplos da função excretória e de biotransformação do fígado. Resulta da catabolização do grupo heme, proveniente maioritariamente do *turnover* eritrocitário feito pelo sistema retículo-endotelial.² Devido à sua insolubilidade, ela é transportada no sangue pela albumina, constituindo a bilirrubina não conjugada/bilirrubina indireta. Sob a forma de bilirrubina indireta ela é transportada no sangue até ao fígado onde se dissocia da albumina de forma a entrar no hepatócito. Aí é conjugada com o ácido glucorónico formando a bilirrubina conjugada que é mais hidrossolúvel.² Nestas condições a bilirrubina conjugada pode ser eliminada através dos canalículos biliares para a vesícula biliar.²

Existem vários fatores que podem levar ao desenvolvimento de hiperbilirrubinémia, sendo a determinação da bilirrubina total e bilirrubina direta essencial para apurar a sua origem, que pode ser pré-hepática, hepática ou pós-hepática.

A nível laboratorial é feita de forma direta a determinação da bilirrubina total e da bilirrubina direta. A quantificação da bilirrubina indireta é feita de forma indireta, já que a bilirrubina total resulta da soma dos dois tipos de bilirrubina.

3.6.2 Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase

A alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são duas enzimas intracelulares responsáveis pela interconversão de aminoácidos em 2-oxo-ácidos, por transferência do grupo amina.² O aumento dos seus níveis séricos indica *turnover* celular aumentado de vários tecidos onde estas enzimas se encontram em maior quantidade. Não são específicas do tecido hepático, sendo a AST encontrada também no coração, músculo esquelético e rim, enquanto que a ALT é encontrada no rim, além do fígado. Soros hemolisados podem produzir valores erroneamente elevados de AST, constituindo a hemólise um interferente a este doseamento.⁷

3.6.3 Gamaglutamiltranspeptidase

A gamaglutamiltranspeptidase (GGT) é uma enzima que catalisa a transferência de aminoácidos entre diferentes peptídeos. Está presente em vários tecidos, nomeadamente (em ordem decrescente de abundância) no rim, fígado, pâncreas e intestino.

Embora a GGT se encontre em maior quantidade no tecido renal, aquela que é encontrada no plasma parece ser maioritariamente originária do tecido hepático, sendo, por isso, considerada um marcador sensível de lesão hepática, mas não específico.⁷ No fígado a GGT está localizada maioritariamente nas células dos ductos biliares e, por isso, podemos encontrar níveis séricos elevados desta enzima em todas as doenças hepatobiliares, sendo os valores mais elevados detetados em casos de obstrução das vias biliares. No entanto, esta enzima também existe nas células do parênquima hepático e é passível de ser induzida por fármacos, drogas e álcool, sendo detetados valores elevados no alcoolismo crónico.⁷

3.6.4 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que catalisa a hidrólise alcalina de várias substâncias endógenas e exógenas. Está presente em vários tecidos, nomeadamente no fígado, intestino delgado, placenta e osso. A ALP encontrada no soro de adultos é maioritariamente proveniente do tecido hepático e uma pequena parte do tecido ósseo.²

Aumentos dos níveis séricos de ALP estão associados a doenças hepatobiliares. Em casos de colestase, diminuição ou interrupção total do fluxo de biliar, o aumento da ALP é acompanhado de um aumento da atividade da GGT. Noutras doenças de origem hepatocelular, o valor da ALP pode estar só ligeiramente aumentado ou mesmo normal.² O aumento da ALP também pode estar associado a patologias ósseas, sendo o doseamento simultâneo da GGT e da ALT essencial para o diagnóstico diferencial.²

Como a concentração de ALP nos eritrócitos é seis vezes superior aquela que é encontrada no soro, a hemólise constitui um interferente ao teste, podendo provocar um falso aumento dos níveis séricos.⁷

Parâmetro	Método	Valores de referência
Bilirrubinas	Método diazo colorimétrico	Bilirrubina total: 0,20-1,00 mg/dL Bilirrubina direta: < 0,20 mg/dL
AST ALT	Método colorimétrico enzimático	AST: 5-30 U/L ALT: 6-37 U/L
GGT	Método colorimétrico enzimático	H - 6-45 U/L M - 5-30 U/L
ALP	Método colorimétrico enzimático	30-90 U/L.

Tabela 6 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação da função hepática.^{2,7}

3.7 Estudo da função pancreática

O pâncreas é um órgão do aparelho digestivo com funções endócrinas e exócrinas. A porção endócrina é responsável pela produção de insulina e glucagon. A porção exócrina produz enzimas auxiliares da digestão, essenciais no processo de absorção.^{2,12}

Distúrbios na porção endócrina do pâncreas estão associados à diabetes mellitus e o seu estudo já foi referido na secção 3.4. Os problemas pancreáticos da porção exócrina mais comuns são a pancreatite aguda, pancreatite crónica e carcinoma pancreático, nomeadamente o adenocarcinoma da cabeça do pâncreas. A determinação de enzimas pancreáticas como a amilase e a lipase são essenciais no diagnóstico destas patologias.

3.7.1 Amilase

A amilase é encontrada em maior quantidade nas glândulas salivares, iniciando a digestão do amido na cavidade oral, e no pâncreas. Pode ainda ser encontrada noutros tecidos e existem casos de tumores que produzem hiperamilasemia, nomeadamente do ovário e pulmão.²

A amilase sérica é normalmente baixa e sofre um aumento abrupto nos casos de pancreatite aguda, mas também nos casos de inflamação das glândulas salivares. Embora as isoformas de amilase presentes nestes dois tecidos sejam de diferentes tipos, a nível laboratorial é normalmente feita a quantificação total, o que a torna um teste de baixa especificidade no diagnóstico da pancreatite aguda, devendo a sua análise ser acompanhada do doseamento da lipase.²

3.7.2 Lipase

A lipase é uma enzima pancreática essencial à digestão lipídica, sendo responsável por hidrolisar os triglicerídeos em glicerol e ácidos gordos. A lipase encontrada no soro é maioritariamente pancreática.

O doseamento da lipase sérica tem interesse no diagnóstico diferencial da pancreatite aguda, sendo um marcador com elevada sensibilidade e especificidade e, por isso, é preferível o seu uso relativamente ao da amilase. Durante uma pancreatite aguda a atividade sérica da lipase começa a aumentar entre 4-8 horas, atingindo o pico às 24 horas; mantém-se elevada durante algum tempo e começa a decrescer entre os 7-14 dias. Os valores que atinge podem estar entre 2 a 50 vezes o limite superior da normalidade.²

Parâmetro	Método	Valores de referência
Amilase	Método colorimétrico enzimático	25-130 U/L.
Lipase	Método colorimétrico enzimático	13-60 U/L

Tabela 7 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação da função pancreática.^{2,7}

3.8 Estudo do sistema músculo-esquelético

3.8.1 Cálcio

O cálcio é um oligoelemento que participa na mineralização óssea, coagulação sanguínea, manutenção do potencial de membrana, condução neuromuscular e contratilidade muscular.

Cerca de 99% do cálcio encontra-se nos ossos e o restante encontra-se no sangue, fluidos extracelulares e no interior das células.

No sangue o cálcio apresenta-se sob três formas: o cálcio livre (45%), também designado cálcio ionizado, o cálcio ligado às proteínas (40%), como a albumina e as globulinas, e o cálcio ligado a aniões (15%).⁷ Em situações patológicas esta distribuição pode mudar, fazendo aumentar um em detrimento do outro: hipoalbuminemia, hipoglobulinemia e alterações do pH fisiológico (já que a ligação às proteínas é dependente do pH). Participam na homeostase do cálcio a PTH, vitamina D e calcitonina, com envolvimento de tecidos como o intestino, osso e rim.⁷

Trata-se de um parâmetro sujeito a interferências pré-analíticas, nunca podendo ser efetuada a determinação em amostras de plasma já que, para a obtenção de plasma, é necessário a utilização de anticoagulantes (como o EDTA ou o citrato de sódio), cuja ação anticoagulante passa pela quelação dos íons de cálcio, essenciais ao processo de coagulação.

3.8.2 Fósforo

O fósforo existe no nosso organismo sob a forma orgânica e inorgânica. No entanto, só a forma inorgânica pode ser quantificada. Relativamente à sua distribuição, 10% está ligado a proteínas, 35% encontra-se complexado com outros íons (cálcio, sódio e magnésio) e os restantes 55% estão livres.

A regulação plasmática dos níveis de fósforo envolve o rim, intestino e o osso.² Tal como o cálcio, os níveis de fósforo também são controlados pela ação da vitamina D e da PTH.

3.8.3 Magnésio

O magnésio é o outro catião essencial ao organismo, estando 55% no tecido ósseo e os restantes 45% no interior das células. Nas células o magnésio exerce importantes funções, sendo a sua concentração intracelular tanto maior, quanto maior for a sua atividade metabólica, já que este participa em várias vias metabólicas, no metabolismo nucleotídico, na biossíntese de proteínas e como cofator de muitas enzimas. Além disso também regula a libertação de neurotransmissores nas junções neuromusculares.² A sua concentração sérica também é alvo de controlo pela PTH e vitamina D.

3.8.4 Creatinafosfocinase

A creatinafosfocinase (CK) é uma enzima tipicamente muscular que catalisa a fosforilação reversível da creatina pelo ATP.² É um dímero constituído por duas subunidades, M e B, que se podem combinar de diferentes formas entre si, criando três isoenzimas com diferentes distribuições nos tecidos corporais: CK-BB, CK-MM e CK-MB.² No laboratório ACM é feita a determinação da CK total.

Em praticamente todos os casos de dano, inflamação ou necrose do tecido muscular, há elevação da CK. Existem também vários fármacos que podem provocar o aumento da atividade sérica da CK devido à sua ação miotóxica, sendo o exemplo mais conhecido as estatinas. A CK e em particular a isoenzima CK-MB podem ser usadas no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio, no entanto existem marcadores mais específicos para a lesão cardíaca, como as troponinas.²

Parâmetro	Método	Valores de referência
Cálcio	Método colorimétrico	Cálcio total - 8,6-10 mg/dL
Fósforo	Método UV	2,4 - 4,4 mg/dL
Magnésio	Método colorimétrico	1,26 – 2,10 mEq/L
CK	Método UV enzimático	H– 15-160 U/L M– 15-130 U/L

Tabela 8 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do sistema músculo-esquelético.²

3.9 Estudo do metabolismo do ferro e anemias

A anemia é definida como uma diminuição da hemoglobina para valores inferiores ao intervalo de referência para o sexo e faixa etária. Embora seja uma patologia tipicamente abordada em hematologia, existem determinações realizadas na área da bioquímica clínica que são essenciais no auxílio ao diagnóstico, classificação e monitorização das anemias.

3.9.1 Ferro

O ferro é um importante oligoelemento que exerce funções como o transporte e distribuição do oxigénio (enquanto constituinte da hemoglobina), metabolismo do oxigénio, respiração celular e transporte de eletrões, entre outros.²

O ferro do organismo é proveniente da dieta, através de absorção no intestino delgado, ou do *turnover* eritrocitário. A ferritina é uma proteína de armazenamento do ferro nas células, que evita dano oxidativo, constituindo, além disso, uma reserva de ferro.⁷

A determinação do ferro total no soro avalia o Fe^{3+} que se encontra ligado à transferrina, e não o ferro ligado à hemoglobina, sendo por isso uma determinação limitada relativamente à quantidade total de ferro presente no organismo.² A sua avaliação tem interesse no diagnóstico diferencial das anemias. Os valores baixos de ferro podem ser devidos a uma dieta inadequada, dificuldade na absorção, perturbações na libertação do ferro pelas células devido ao aumento da hepcidina em situações inflamatórias e hemorragia. No entanto, também existem patologias caracterizadas pelo excesso de ferro, como a hemocromatose.²

3.9.2 Transferrina

Como já referido anteriormente, a transferrina é a proteína de transporte do ião Fe^{3+} , de forma a evitar dano tecidual oxidativo provocado pelo ferro na forma livre.⁷ É sintetizada no fígado de acordo com as necessidades de ferro do organismo. Cada molécula de transferrina tem capacidade de ligar dois iões de ferro.²

Na rotina laboratorial pode ser feita a determinação da transferrina através de um método turbidimétrico. O seu valor deve ser avaliado em conjunto com o ferro para conseguir uma melhor interpretação dos dados clínicos. No entanto, existem ainda dois parâmetros adicionais que ajudam efetivamente ao diagnóstico diferencial das anemias: capacidade total de fixação do ferro e o índice de saturação da transferrina.

A **capacidade total de fixação do ferro (TIBC)** é a medida da concentração máxima de ferro que a transferrina conseguiria ligar se estivesse totalmente saturada. Num indivíduo normal, somente um terço dos locais de ligação de ferro em toda a transferrina corporal estão ocupados.⁷ A TIBC está aumentada na deficiência de ferro e diminuída nas inflamações crónicas e doença hepática crónica. A determinação da TIBC é feita através da soma do ferro sérico (que se encontra ligado à transferrina) com a capacidade de ligação do ferro insaturado (UIBC).

O UIBC é determinado através da adição de ferro em excesso à amostra para que este se ligue a todos os locais da transferrina vazios; o ferro em excesso é removido e é determinado espectrofotometricamente, sendo a sua concentração inversamente proporcional ao UIBC.²

O **índice de saturação da transferrina (IST)** é a quantidade de ferro que se encontra ligado à transferrina. É dado em percentagem e pode ser determinado pela razão entre o ferro sérico e a TIBC.² Este índice está diminuído na anemia por deficiência de ferro e nas doenças inflamatórias (a transferrina é uma proteína de fase aguda negativa) e aumentado na hemocromatose, doença hepática aguda e anemia aplásica.²

3.9.3 Lactato desidrogenase

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que catalisa a oxidação do lactato a piruvato, com o NAD⁺ como intermediário aceitador de hidrogénio. É uma enzima citoplasmática, havendo a presença de diferentes isoenzimas nos diferentes tecidos: coração, fígado, rim, eritrócitos e músculo esquelético.²

Devido à sua ampla distribuição nos tecidos, a atividade sérica da LDH aumenta em várias situações clinicamente distintas, nomeadamente no enfarte agudo do miocárdio, doenças hepáticas, anemia hemolítica e problemas pulmonares e musculares. Na prática clínica, a determinação da LDH é de especial importância na área da hematologia, no auxílio ao diagnóstico diferencial das anemias: há aumento da atividade sérica da LDH nas anemias hemolíticas e na anemia megaloblástica.²

O principal interferente da LDH é a hemólise, podendo aumentar drasticamente os seus valores séricos. Isto acontece, pois, a concentração eritrocitária desta enzima é 100 a 150 vezes superior à do soro. Qualquer amostra hemolisada deve ser prontamente rejeitada e ser solicitada a realização de nova colheita.

Parâmetro	Método	Valores de referência
Ferro	Método colorimétrico	H- 50-160 mg/dL M- 45-150 mg/dL
Transferrina	Método imunoturbidimétrico	Transferrina - 200-380 mg/dL TIBC - 250-425 µg/dL IST - 20-55%
LDH	Método UV	100-225 U/L.

Tabela 9 – parâmetros analíticos utilizados para avaliação do metabolismo do ferro e anemias.^{2,7}

3.10 Estudo do metabolismo das proteínas

3.10.1 Proteínas totais

A determinação das proteínas totais ajuda a perceber a concentração geral de todas as proteínas plasmáticas. Quando é detetada uma anormalidade neste valor, é necessário investigar e determinar qual a proteína deficitária ou em excesso.²

A hipoproteinemia pode estar associada a doença renal, doenças inflamatórias digestivas, hemorragias, malnutrição, doença hepática, imunodeficiências e situações que acelerem o catabolismo proteico (trauma, queimaduras, entre outros). Já a hiperproteinemia tem como principal causa a desidratação; ocorre perda excessiva de água e, embora a quantidade de proteínas se mantenha inalterada, a sua concentração aumenta. Também pode ocorrer em doenças caracterizadas pela produção de proteínas monoclonais, como o mieloma múltiplo.²

3.10.2 Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma.² Contribui para a pressão coloidosmótica do fluido intravascular; exerce também a função de tampão e é uma proteína de fase aguda negativa. É também responsável pelo transporte de várias substâncias no sangue, onde se incluem fármacos.⁷

Alterações na concentração sérica de albumina são indicativas de patologia. A diminuição dos níveis de albumina pode ser devida a má nutrição, doença hepática, perda gastrointestinal, doença renal, hipotireoidismo, doenças inflamatórias agudas e hemodiluição. A hiperalbuminemia é mais rara e está associada a estados de desidratação e após infusão de albumina em excesso.⁷

3.10.3 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são uma classe de glicoproteínas produzidas por plasmócitos, geradas contra agentes imunogênicos externos, sendo responsáveis pela sua eliminação do organismo.⁷ Todas as imunoglobulinas são constituídas por 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves. Os domínios variáveis contêm a região de ligação ao antígeno e os domínios constantes são responsáveis pela ligação a receptores e ativação do sistema do complemento.² Existem 5 tipos de imunoglobulinas, classificadas com base no tipo de cadeia pesada que possuem: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

3.10.4 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é sintetizada pelo fígado e é uma importante proteína de fase aguda, sendo uma das primeiras a aumentar em resposta a um quadro inflamatório. Em condições normais a PCR encontra-se em níveis muito baixos no soro, sendo um aumento sempre sugestivo de resposta inflamatória, o que demonstra a elevada sensibilidade. No entanto, é uma proteína de baixa especificidade, pois não especifica o local de inflamação. Podemos observar o seu aumento sérico na artrite reumatoide, infecções bacterianas e virais, enfarte agudo do miocárdio, gota e aterosclerose.

Parâmetro	Método	Valores de referência
Proteínas totais	Método colorimétrico	6,5-8,3 g/dL.
Albumina	Método colorimétrico	3,5-5,0 g/dL.
Imunoglobulinas	Método turbidimétrico	IgG: 700-1600 mg/dL IgM: 40-230 mg/dL IgA: 70-400 mg/dL
PCR	Método turbidimétrico	< 0,5 mg/dL

Tabela 10 - parâmetros analíticos utilizados para avaliação das proteínas séricas.^{2,7}

3.10.5 Eletroforese das proteínas

Como já foi referido, a eletroforese das proteínas faz a separação das várias frações de proteínas plasmáticas através da aplicação de um campo elétrico. As várias frações a que a eletroforese dá origem são, por esta ordem: albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas. O conhecimento do tipo de proteínas que migra em cada banda eletroforética é de elevada importância durante a análise e interpretação do proteinograma, para conseguir compreender o tipo de patologia a que a alteração pode estar associada.

Fração	Proteínas representadas	Fração diminuída	Fração aumentada
Albumina	Albumina	Doença hepática, doença renal, processos inflamatórios, malnutrição, hemodiluição.	Desidratação.
α1-globulinas	α 1-antitripsina	Doença hepática, deficiência de α 1-antitripsina.	Quadros inflamatórios, malignidades.
α2-globulinas	Ceruloplasmina, α 2-macroglobulina e haptoglobina	Doença hepática e hemólise.	Quadros inflamatórios.
β-globulinas	Transferrina, β -lipoproteínas, C3 complemento.	Malnutrição.	Anemia sideropénica, quadros inflamatórios, hiperlipidémia.
γ-globulinas	Imunoglobulinas	Imunodeficiências, doença renal, malnutrição, leucemias.	Banda policlonal – Quadro infeccioso e/ou inflamatório Banda monoclonal – Mieloma múltiplo.

Tabela 11 – tabela representativa de situações patológicas que podem ser causadoras de alterações na eletroforese de proteínas.¹³

3.1.1 Pesquisa de sangue oculto nas fezes

A PSOF é um teste realizado para detetar perdas de sangue no trato gastrointestinal, que não são visíveis macroscopicamente nas fezes, e que podem estar associadas ao cancro do cólon e do recto. De acordo com a norma nº 003/2014 da DGS¹⁴, deve ser realizada a PSOF em todos os doentes com idade compreendida entre os 50 e os 74 anos que estejam assintomáticos e que não tenham antecedentes pessoais ou familiares deste tipo de doença.

O método utilizado neste teste é a imunocromatografia. Consiste num dispositivo onde é aplicada a amostra, percorrendo a fase móvel. Nesta fase móvel há anticorpos dirigidos à

hemoglobina humana marcados com partículas coloridas; forma-se um complexo hemoglobina humana-anticorpo que vai percorrer a fase móvel até chegar à fase imóvel, que possui um anticorpo fixo que vai ligar o imunocomplexo e produzir cor. Além da zona de teste, o dispositivo também possui uma zona de controlo, que deve ser sempre reativa, caso contrário o teste é invalidado.

3.12 Espermograma

O espermograma é um exame que avalia a qualidade do ejaculado, sendo pedido pelo médico para fazer um estudo da fertilidade masculina. Um espermatozoide normal tem na sua constituição espermatozoides, fluido prostático e líquido seminal. A celeridade no processamento da amostra após a colheita é essencial nesta análise, como já foi referido na secção 2.1.1.4.⁴

Os primeiros parâmetros a ser avaliados são a cor, liquefação, viscosidade e o pH. A cor do ejaculado deve ser branca opalescente.⁴ A liquefação deve ser avaliada pelo menos 30 minutos após a ejaculação, de forma a dar tempo a que esta ocorra, já que inicialmente o ejaculado encontra-se coagulado. O pH avalia o equilíbrio entre as secreções prostáticas, de carácter ácido, e as secreções seminais, básicas.⁴

Segue-se a avaliação microscópica do espermatozoide. Coloca-se uma gota entre lâmina e lamela (preferencialmente aquecidas a 37°C) e analisa-se ao microscópio. Deve ser avaliado⁴:

- Número de espermatozoides;
- Vitalidade – número de formas vivas. Avaliada com recurso à coloração eosina-nigrosina;
- Motilidade - classificados em progressivos rápidos, progressivos lentos, não progressivos e imóveis;
- Morfologia – avaliar a existência de formas anormais. Podem ser devidas a defeitos na cabeça, peça intermédia e cauda e pode haver a presença de resíduos citoplasmáticos;
- Presença de agregados e/ou aglutinados;
- Presença de outras células – leucócitos, eritrócitos, bactérias;

3.13 Análise sumária da urina

A análise sumária da urina, também chamada de urina tipo II, é uma importante ferramenta do laboratório de análises clínicas que pode fornecer ao clínico informações relevantes ao diagnóstico de várias patologias, podendo ocorrer alterações urinárias antes de o doente apresentar sintomatologia. Isto é importante, particularmente nas patologias renais em que o diagnóstico e tratamento precoces são de extrema importância no curso evolutivo da doença. Esta análise inclui duas fases: primeiramente a análise semi-quantitativa de parâmetros bioquímicos e posteriormente a observação do sedimento urinário ao microscópico com estimativa do tipo e número de elementos figurados presentes.

Com recurso ao Aution Max AX-4060 os parâmetros avaliados são¹⁵:

- Densidade – traduz estado de hidratação do doente;
- Cor – alterada pela alimentação, medicamentos e infeções;
- pH - útil no diagnóstico de infeções urinárias e cálculos renais. Auxilia na identificação de cristais presentes na urina;
- Leucócitos - auxiliam à deteção de quadros inflamatórios e/ou infecciosos. Útil na deteção de infeções do trato urinário (ITU);
- Eritrócitos - presentes em grande na presença de lesão renal, ITU e tumores das vias urinárias.
- Urobilinogénio - hemólise extravascular, doença hepatocelular;
- Bilirrubina - aumentada na hemólise extravascular, doença hepatocelular e obstrução biliar.
- Nitritos – quando positivos são sugestivos da presença de bactérias capazes de converter nitratos a nitritos;
- Cetonas - monitorização da diabetes mellitus; jejum prolongado;
- Proteínas - doença renal;
- Glicose - monitorização da diabetes mellitus.

A análise do sedimento urinário ao microscópico permite identificar e quantificar elementos figurados que não são detetados pela análise semi-quantitativa das características bioquímicas. Esta observação é feita após centrifugação de 10 ml de urina a 2000 rotações por minuto durante 5 minutos, após os quais o sobrenadante é decantado e o sedimento resuspendido no líquido remanescente.¹⁵ É feita a observação ao microscópico com contagem dos elementos figurados. É normal a ocorrência de alguns elementos figurados na urina, desde que em baixo número. Podemos encontrar células, cristais, cilindros e bactérias.

4. Imunologia

A imunologia é uma área bastante abrangente do laboratório de análises clínicas. Nesta estão inseridas análises direcionadas ao estudo do sistema imune (resposta a agentes infecciosos, doenças autoimunes, entre outros), e também podemos encontrar várias análises que, embora não estejam relacionadas com o sistema imune, a sua determinação baseia-se em métodos imunológicos.

4.1 Instrumentação analítica

4.1.1 Cobas 6000 – e601 e Cobas e411

O Cobas 6000 – e601 e o Cobas e411 são dois equipamentos distintos utilizados na área analítica da imunologia, mas que têm por base a mesma metodologia para a execução dos testes: a eletroquimioluminescência (ECLIA). Esta metodologia utiliza as características da quimioluminescência – emissão de luz associada à ocorrência de uma reação química através da utilização de marcadores quimioluminescentes – com a transdução elétrica. Para isso, utiliza estreptavidina, um anticorpo primário marcado com biotina e um anticorpo secundário marcado com ruténio.² A estreptavidina permite a fixação à fase sólida através da forte afinidade que possui para a molécula de biotina; após lavagens, é aplicada voltagem ao eletrodo que leva à emissão de quimioluminescência que é detetada por um fotomultiplicador.¹⁶ Existem dois tipos de ensaio:

- Ensaio em sandwich – também chamado de ensaio não competitivo; são adicionados à amostra contendo o antígeno a determinar anticorpos primários e secundários marcados com biotina e ruténio; o anticorpo primário forma um imunocomplexo com o antígeno a determinar e liga-se também ao anticorpo secundário com emissão de quimioluminescência, que é proporcional à quantidade de antígeno na amostra.¹⁶
- Ensaio competitivo – utilizados normalmente para a determinação de anticorpos. É adicionado à amostra o antígeno específico do anticorpo a determinar; caso exista anticorpo na amostra, vai-se formar um imunocomplexo sem emissão de quimioluminescência. Posteriormente adiciona-se anticorpo marcado com biotina (que vai competir com o anticorpo não marcado presente na amostra) e anticorpo secundário marcado com ruténio. Caso haja emissão de quimioluminescência, a

intensidade é inversamente proporcional à concentração de anticorpo na amostra.¹⁶

4.2 Estudo da função tiroideia

A tiroide é uma glândula endócrina responsável pela síntese das hormonas tiroideias, que estão envolvidas na regulação do metabolismo e da temperatura corporal, no crescimento, entre outros. As hormonas produzidas pela tiroide são a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4). A regulação da sua produção envolve o eixo hipotálamo-hipófise: em resposta a estímulos o hipotálamo liberta hormona libertadora de tireotrofina (TRH) que atua na hipófise levando à libertação de hormona tiroestimulante (TSH). A TSH exerce a sua ação na tiroide, levando ao aumento da produção das hormonas tiroideias; estas vão atuar nos órgãos-alvo desencadeando um mecanismo de feedback negativo que vai diminuir a produção de TSH e TRH pelo eixo hipotálamo-hipófise.²

Várias situações patológicas podem levar à desregulação destes mecanismos de regulação hormonal, sendo necessário o doseamento laboratorial destas hormonas para diagnóstico de patologias e também para controlo clínico da terapêutica. Os testes laboratoriais com interesse da patologia tiroideia são:

- TSH – embora não seja uma hormona diretamente produzida pela tiroide, quando avaliada conjuntamente com as hormonas tiroideias é útil no diagnóstico diferencial de patologias da tiroide.²
- T4 – hormona tiroideia produzida em maior quantidade. Nos tecidos cerca de 40% é transformada em T3, a forma com maior atividade. Podemos avaliar o valor da T4 total (hormona livre + hormona ligada às proteínas de transporte) e da T4 livre (FT4). Só a forma livre está disponível para atuar nos tecidos periféricos, e por isso o doseamento da FT4 é preferível relativamente ao da T4 total.²
- T3 – é a hormona tiroideia com maior atividade tecidular. Tal como a T4, é feito o doseamento da T3 total e da T3 livre.²
- Tiroglobulina – constituinte do colóide das células foliculares tiroideias. É essencial à síntese das hormonas tiroideias. O seu valor sérico traduz a presença de tecido tiroideio ativo. É utilizada como marcador tumoral do cancro da tiroide.²
- Anticorpos anti-tiroideus – são a anti-tiroglobulina (ATG) e anti-tiroperoxidase (ATPO), usadas no diagnóstico da tiroidite de Hashimoto, e o anticorpo anti-recetor da TSH (TRABS), útil no diagnóstico da Doença de Graves.²

4.3 Estudo da função endócrina

O sistema endócrino inclui todas as glândulas endócrinas do organismo e hormonas por estas produzidas para regulação de várias funções corporais. No que diz respeito a análises realizadas no laboratório ACM e com importância para o estágio temos a destacar, além do já referido no ponto anterior, a PTH, o cortisol, a progesterona, testosterona, hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH), prolactina, testosterona, progesterona, estradiol e hormona gonadotrofina coriónica humana (HCG).

A **PTH** é sintetizada e secretada pelas glândulas paratiroides. A sua secreção é regulada pela concentração plasmática de cálcio livre, vitamina D e fósforo. Nas células-alvo, a PTH atua de modo a regular a homeostase do cálcio e fósforo através da sua ação nos rins e tecido ósseo: no rim estimula a síntese de 1,25-(OH)₂-vitamina D, (que estimula absorção intestinal de cálcio e fósforo), aumenta a reabsorção renal de cálcio e inibe a reabsorção renal de fósforo; no osso estimula a reabsorção óssea, contribuindo para o aumento da concentração plasmática de cálcio. A nível clínico, o interesse do doseamento da PTH reside no diagnóstico diferencial da hipercalcemia e hipocalcemia, avaliar a função da paratiroide na doença renal crónica e nas doenças do metabolismo mineral.²

O **cortisol** é secretado pelas glândulas suprarrenais. É uma hormona hiperglicemiante, anti-inflamatória e imunomoduladora. A sua libertação pelas suprarrenais segue um ritmo circadiano, ocorrendo o pico máximo ao acordar (os doseamentos devem ser feitos no máximo até às 9 horas); é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise: em resposta a estímulos como hipoglicémia ou stress, o hipotálamo liberta hormona libertadora de corticotrofina (CRH), que estimula a libertação de hormona adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise, que atua na suprarrenal, induzindo a libertação de cortisol que, ao exercer o seu efeito nas células-alvo, funciona como um mecanismo de feedback negativo, cessando a libertação de CRH e ACTH. O doseamento do cortisol é útil no diagnóstico da doença de Cushing e da síndrome de Cushing.²

A **LH, FSH e prolactina** são hormonas sintetizadas pela hipófise. A LH e a FSH exercem a sua ação nas gónadas femininas e masculinas. No homem, tanto a LH como a FSH têm a função de síntese de espermatozoides, mas é no sexo feminino que é encontrada uma maior concentração destas hormonas, que vai variando de acordo com o ciclo menstrual: o pico de LH e FSH antecede a ovulação, embora a sua secreção ocorra de forma pulsátil ao longo de todo o ciclo para favorecer a maturação do oócito. Já a prolactina, exerce a sua função no tecido mamário, sendo necessária à produção de leite no período pós-parto.²

A **testosterona, progesterona e estradiol** são hormonas sexuais sintetizadas pelas gónadas. No homem, a testosterona é sintetizada pelos testículos, cuja função está dependente da secreção de LH e FSH pela hipófise; a testosterona regula a produção de espermatozoides, desenvolve e mantém os órgãos reprodutores masculinos e as características sexuais secundárias. Na mulher, os ovários são responsáveis pela síntese de estradiol e progesterona que, juntamente com a LH e FSH controlam o ciclo reprodutor feminino, além de serem responsáveis pelo desenvolvimento dos órgãos reprodutores e características sexuais secundárias.¹²

A **β -HCG** é uma hormona de produção placentária e, como tal, está presente em grandes quantidades na mulher grávida. A sua principal função é a manutenção do corpo lúteo para assegurar a secreção de progesterona ao longo da gravidez, que mantém o revestimento da parede uterina.¹²

4.4 Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias que podem estar presentes em elevadas concentrações no sangue e tecidos de indivíduos com cancro. São utilizadas na prática clínica para ajudar ao diagnóstico, monitorização de tratamento e prognóstico de malignidades. Existem vários tipos de marcadores tumorais, mas grande parte não possui especificidade de órgão, o que limita a sua utilidade diagnóstica. Além disso, existem várias situações patológicas não relacionadas com cancro que podem provocar o aumento destes marcadores.² Estes resultados analíticos devem ser sempre avaliados em conjunto com sintomatologia e outro tipo de exames, nunca devendo ser utilizados isoladamente como critério de diagnóstico.

Marcador tumoral	Cancro relacionado
α-fetoproteína	Carcinoma hepatocelular e tumor testicular
CA125	Cancro do ovário
CA19-9	Cancro do pâncreas
CEA	Cancro colorretal
β-HCG	Tumor testicular, Neoplasia trofoblástica gestacional
PSA	Cancro da próstata

Tabela 12 – tabela resumo dos marcadores tumorais avaliados no laboratório e o seu significado clínico.²

4.5 Vitaminas e outros elementos

Um suprimento diário adequado de vitaminas e outros oligoelementos é essencial para a manutenção de um organismo saudável. No contexto laboratorial, é importante a avaliação do status nutricional para verificar a necessidade de suplementação. É de salientar que, além de possíveis carências, existem estados patológicos e fisiológicos que aumentam as necessidades vitamínicas do organismo.

Embora sejam várias as vitaminas e outros elementos passíveis de serem avaliados laboratorialmente, na área de imunologia temos a destacar:

- **Ácido fólico** – necessário à síntese de purinas, precursoras de DNA e RNA. Por essa razão é importante a avaliação deste nutriente na fase pré-concepcional e durante a gravidez. A avaliação dos níveis de folatos é importante no diagnóstico diferencial da anemia, sendo a deficiência responsável pela anemia megaloblástica.²
- **Vitamina B12** – cofator de várias enzimas, possui funções semelhantes às do ácido fólico; do mesmo modo, a carência desta vitamina conduz a anemia megaloblástica. Encontra-se quase exclusivamente em produtos de origem animal e, por isso, é de elevada importância a avaliação deste nutriente nos vegetarianos.²

- **Vitamina D** – existem duas fontes de vitamina D: alimentação e produção endógena através da exposição solar. Tem de ser metabolizada na sua forma ativa que exerce funções hormonais de regulação dos níveis de cálcio e fósforo, como já abordado no ponto 4.3. Deficiências nesta vitamina podem conduzir a má formação óssea e osteomalacia.²
- **Ferritina** – está incluída nesta secção, mas não pode ser considerado um nutriente. Trata-se de uma proteína de armazenamento do ferro para que este não circule na forma livre no sangue e tecidos, o que poderia causar dano oxidativo. Traduz as reservas de ferro do organismo, embora nem sempre níveis elevados de ferritina se traduzam em grandes reservas de ferro, já que se trata de uma proteína de fase aguda.²

4.6 Serologia infecciosa

A avaliação do estado serológico da população relativamente a doenças infecciosas é fundamental, não só para o diagnóstico precoce de indivíduos infetados para que possa ser implementado o tratamento adequado, mas também para evitar o contágio entre a população. O rastreio da população, mesmo que assintomática, torna-se importante na tentativa de erradicar algumas patologias infecciosas. Além disso, na gravidez é importante a monitorização do estado imunológico relativamente a algumas infeções, devido às complicações que pode trazer para o feto caso sejam contraídas durante a gravidez.

O laboratório de análises clínicas desempenha um papel relevante neste contexto. A determinação do título de anticorpos é uma das formas mais frequentes de determinar a existência de infeção; consoante o tipo de imunoglobulinas encontradas pode determinar-se se trata de uma infeção recente ou infeção passada, sendo que a presença de IgM está normalmente associada a uma infeção recente; no entanto o curso da evolutivo da doença nem sempre é linear. A deteção de antígenos de superfície é outra forma de realizar o diagnóstico de doenças infecciosas.

4.6.1 Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus

Conjunto de infeções, parasitárias e virais, respetivamente, que necessitam de controlo serológico durante a gravidez devido ao risco de desenvolvimento de infeção congénita em casos de primoinfeção.

De acordo com as *guidelines*, o controlo serológico é feito na preconceção para toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus, e entre as 18 e 20 semanas de gestação para a rubéola e 24 a 28 semanas para a toxoplasmose, caso não tenham imunidade adquirida. As análises realizadas são o doseamento do título de anticorpos IgG e IgM.¹⁷ Sempre que sejam detetados anticorpos que estejam de acordo com uma primoinfeção, devem realizar o teste de avidéz das IgGs para poder determinar se se trata de uma infeção recente ou de uma infeção passada (com mais de 3 meses de evolução), de forma a poder instituir tratamento adequado o mais precocemente possível.

4.6.2 Vírus da Imunodeficiência Humana

O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é um retrovírus que faz parte das doenças sexualmente transmissíveis (DST). Existem dois subtipos de VIH, o VIH-1 e o VIH-2, com diferentes distribuições geográficas, sendo o VIH-1 o mais frequente na Europa. É uma doença com elevada prevalência e, na altura da sua descoberta, com uma elevada taxa de mortalidade devido ao desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Hoje em dia, com o conhecimento adquirido ao longo do tempo, já existe terapêutica eficaz para manter cargas virais nulas e evitar a progressão para SIDA.¹⁸

O laboratório de análises clínicas tem 2 importantes funções no combate ao VIH: deteção precoce das infeções por VIH para evitar a transmissão e o desenvolvimento de infeções congénitas e a determinação da carga viral para monitorização da eficácia do tratamento em indivíduos seropositivos.¹⁸ O método utilizado pelo laboratório para deteção do VIH-1 e VIH-2 combina a deteção do antígeno p24 do VIH-1 com a deteção de anticorpos anti-VIH-1 e anti-VIH-2 através da ECLIA.¹⁹ Trata-se de uma infeção de comunicação obrigatória ao sistema nacional de vigilância epidemiológica (SINAVE).

4.6.3 Hepatites virais

O termo hepatite viral refere-se a um conjunto de doenças que provocam inflamação do fígado causada por vírus hepatotrópicos: os vírus da hepatite A e hepatite E, de transmissão fecal-oral, e o vírus da hepatite B, hepatite C e hepatite D, de transmissão parentérica ou sexual.¹⁹

Devido à melhoria das condições sanitárias, os vírus da hepatite A e hepatite E têm sido responsáveis por um número muito reduzido de infeções em Portugal. Já o vírus da hepatite

B, embora faça parte do plano nacional de vacinação, tem uma prevalência elevada em Portugal. Para o diagnóstico serológico da infeção temos disponíveis vários marcadores: a deteção do antígeno HBs, anticorpo anti-HBs, anticorpo anti-HBc, antígeno HBe e anticorpo anti-HBe.²⁰ A deteção destes marcadores de hepatite B permite estadiar as várias fases da doença, como representado na tabela 13.

Reatividade Serológica	Doença					Saudável	
	Pré-sintomática	Aguda Recente	Aguda	Crónica	Aguda Tardia	Resolvida	Vacinação
Anti-HBc	-	-	+	+	+/-	+	-
Anti-HBe	-	-	-	-	+/-	+/-	-
Anti-HBs	-	-	-	-	-	+	+
HBeAg	-	+	+	+	-	-	-
HBsAg	+	+	+	+	+	-	-

Tabela 13 – tabela resumo da interpretação dos marcadores serológicos na infeção pelo vírus da hepatite B.²¹

A hepatite C tem a sua transmissão muito associada aos consumidores de drogas injetáveis. Laboratorialmente o modo mais frequente de diagnóstico é a determinação dos anticorpos totais anti-HCV.²⁰

4.6.4 Sífilis

A sífilis é uma DST provocada por *Treponema pallidum*. A infeção durante a gravidez pode resultar em transmissão ao feto, com graves consequências sendo, por essa razão, outra doença infetocontagiosa alvo de controlo serológico durante a gravidez.

É uma infeção com 3 fases: a sífilis primária, em que surgem úlceras na área genital e linfadenopatia, a sífilis secundária, em que há aparecimento de um *rash* mucocutâneo generalizado, e a sífilis terciária, aparece geralmente em situações não tratadas inicialmente e envolve complicações neurológicas.²²

Os testes laboratoriais para diagnóstico e monitorização da infeção dividem-se em dois tipos:

- Testes não treponémicos – detetam anticorpos IgG ou IgM dirigidos contra reagentes, que são substâncias não específicas de *T.pallidum*. Os testes mais comuns são o RPR (Rapid Plasma Reagin Test) e a VDRL (Venereal Disease Research Laboratory). Ambos

têm por base uma reação de aglutinação, utilizando partículas de carvão revestidas com cardiolipina. Podem ser utilizados para monitorizar evolução da doença, já que estes testes se correlacionam com a atividade da doença e a realização de diluições seriadas permite determinar o título de anticorpos presentes.²³

- Testes treponémicos – detetam anticorpos específicos anti *T.pallidum*. Estes anticorpos vão manter-se positivos indefinidamente e, por isso, estes testes não podem ser utilizados para monitorização da eficácia terapêutica. Os testes mais comuns são o TPHA e o FTA-ABS.²³

4.7 Imuno-hematologia

A imunohematologia é um ramo da imunologia que se dedica ao estudo dos eritrócitos e seus antígenos de superfície. É essencial à medicina transfusional e também no diagnóstico de algumas patologias.

4.7.1 Grupo sanguíneo

Desde a descoberta dos grupos sanguíneos em 1901, muitos avanços têm sido feitos no conhecimento de todos os antígenos eritrocitários existentes. Hoje em dia, conhecemos mais de 30 antígenos de superfície dos eritrócitos e conseguimos fazer transfusões sanguíneas e transplantação de órgãos e tecidos, que se baseia no sistema A,B,0 e também no HLA.²⁴

A principal importância desta análise é precisamente a de perceber a compatibilidade sanguínea em caso de transfusões de sangue ou de transplantação de órgãos, mas também na gravidez para perceber o risco de o feto vir a desenvolver a doença hemolítica do recém-nascido.

4.7.1.1 Tipagem A, B, 0

Dentro da tipagem A, B, 0 temos 4 principais grupos sanguíneos: A, B, AB e 0. Estes grupos são determinados pela presença ou ausência dos antígenos de superfície A e B. A determinação do grupo sanguíneo é feita através de um método de aglutinação direta, que utiliza soro com anticorpos do tipo IgM anti-A e anti-B, observando-se a presença ou ausência de aglutinação.²⁴ Para confirmar este teste é possível fazer a prova reversa; esta baseia-se no facto de, logo após o nascimento, começarmos a produzir anticorpos anti-A e/ou anti-B (consoante o antígeno ausente) como resposta a exposição a substâncias *antigen-like*.²⁴

4.7.1.2 Sistema Rhesus

O sistema Rhesus (Rh) classifica os indivíduos como Rh positivo ou Rh negativo. É um sistema bastante complexo que envolve vários antigénios. A determinação do Rh é feita pelo mesmo método de aglutinação utilizado para a tipagem A, B, O.²⁴ Os resultados negativos carecem de ser confirmados, já que existem indivíduos com fenótipo D-fraco que podem não apresentar aglutinação pelo método habitual; nestes é necessário confirmar com recurso a outro método, Card-ID Anti-D, que contém anticorpos policlonais anti-D no gel, permitindo a visualização da reação em coluna, com uma sensibilidade superior.

4.7.2 Teste de Coombs direto e indireto

O teste de Coombs, também chamado teste da antiglobulina, é utilizado para detetar a presença de anticorpos contra os eritrócitos. O teste de Coombs direto permite detetar a ocorrência de hemólise eritrocitária *in vivo*, pela ligação de anticorpos ou complemento aos eritrócitos. Já o teste de Coombs indireto deteta a hemólise *in vitro*, através da deteção da presença de anticorpos circulantes dirigidos contra os eritrócitos.²⁵ O teste de Coombs direto é utilizado no diagnóstico de anemias hemolíticas imunomediadas, enquanto que o teste de Coombs indireto é requisitado maioritariamente durante a gravidez, para detetar a presença de anticorpos dirigidos contra os eritrócitos no sangue da mãe, que possam passar para o sangue do feto e provocar anemia hemolítica do recém-nascido.

Para a realização do teste de Coombs são utilizadas ID-Cards que contêm no gel antiglobulina humana poli-específica. No teste de Coombs direto é feita uma suspensão de eritrócitos do doente que é adicionada ao microtubo; é centrifugada durante 10 minutos. No Coombs indireto são usados os mesmos microtubos onde é adicionada uma suspensão de eritrócitos e o soro ou plasma do doente; é incubado durante 15 minutos a 37°C, ao fim dos quais é feita a centrifugação. Em ambos os testes o resultado é negativo se os eritrócitos ficarem depositados no fundo do microtubo, se estiverem dispersos pelo microtubo ou aglutinados na superfície o teste é positivo.²⁶

4.8 Imunoalergologia

Hoje em dia, para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade do tipo I a alimentos e aeroalergénios, a deteção de IgE específica para alergénios é um dos testes mais utilizados.

Estes testes têm por base a técnica de RAST (RadioAllergoSorbent Test): utiliza uma fase sólida, onde é fixado o alérgeno, sendo posteriormente incubado com o soro do doente que, se contiver IgE específica para o alérgeno, vai formar o complexo antigénio-anticorpo; após várias lavagens são adicionados anticorpos monoclonais anti-IgE humana combinados com biotina, seguidos da adição de estreptavidina combinada com fosfatase alcalina. Após adição de corante, dá-se uma reação colorimétrica enzimática que produz cor, permitindo identificar a reatividade dos anticorpos. Trata-se de um imunoensaio quantitativo que permite detetar a presença de IgE específica para vários alérgenos em simultâneo.²⁷

No contexto das doenças alérgicas é também relevante a determinação da IgE total, determinação efetuada no Cobas 6000 – e601, pela técnica de ECLIA.

5. Hematologia

A valência laboratorial de hematologia tem uma importância fulcral no contexto do diagnóstico clínico e, conseqüentemente, no laboratório de análises clínicas. Trata-se de uma área com análises muito abrangentes, que permitem a interligação de resultados com outras valências laboratoriais, de modo a melhor compreender o estado patológico dos doentes. As amostras mais frequentes nesta área são o sangue total e o plasma.

A análise mais requisitada em hematologia é o hemograma. Este permite avaliar toda a função hematológica e respetivos constituintes sanguíneos: inclui o eritrograma, leucograma e a contagem de plaquetas. O eritrograma é constituído pela contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina corpuscular média e respetivos índices hematimétricos que podem ser calculados através destes parâmetros; são muito úteis no diagnóstico e caracterização de anemias. O leucograma inclui a contagem total de leucócitos e o respetivo diferencial das diferentes linhagens celulares: neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos. A contagem de plaquetas inclui ainda o volume plaquetar médio e a amplitude de distribuição plaquetar. É uma análise de grande importância no laboratório de análises clínicas, sendo muito útil ao diagnóstico de várias patologias. Muitas vezes, a simples execução do hemograma no equipamento não é suficiente, sendo necessária a observação do esfregaço de sangue periférico.

Os estudos da coagulação são um conjunto de análises clínicas hematológicas realizadas com frequência nos laboratórios. As análises realizadas no laboratório ACM são o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). O TP avalia a via extrínseca da coagulação e é utilizado, entre outras situações, para a monitorização clínica da

terapêutica com antagonistas da vitamina K, fármacos com uma margem terapêutica estreita; além de ser expresso em segundos, o resultado é expresso em *International Normalized Ratio* (INR), o que permite que os resultados sejam comparáveis interlaboratorialmente. O aPTT avalia a eficiência da via intrínseca da coagulação, sendo os resultados expressos em segundos. A sua utilização clínica prende-se com o diagnóstico de distúrbios da coagulação, embora o valor do aPTT também possa ser alterado por anticoagulantes orais e heparina.²⁴

A velocidade de sedimentação (VS) é outra análise pertencente à valência laboratorial de hematologia. Trata-se de um indicador de extensão do processo inflamatório, sendo uma forma de avaliar a resposta de fase aguda.²⁴ É uma medida da velocidade de sedimentação dos eritrócitos, expressa em mm/hora, que está dependente de vários fatores entre os quais se destaca o aumento da concentração de proteínas plasmáticas, nomeadamente proteínas de fase aguda, o que explica o seu aumento em situações de inflamação. No entanto, outros fatores podem ser responsáveis pelo aumento da VS e, por isso, trata-se de uma análise pouco específica.²⁴

6. Microbiologia

A microbiologia é uma valência laboratorial que engloba 3 áreas: bacteriologia, parasitologia e micologia. O objetivo da realização de análises microbiológicas é o diagnóstico de infeções, as quais podem ocorrer nos mais diversos locais do organismo e, como tal, há uma grande variabilidade de amostras em microbiologia, desde a urina (a mais frequente), fezes, expetoração, exsudados vaginais, exsudados uretrais, exsudados orofaríngeos, exsudados nasofaríngeos, exsudados purulentos, etc.

A colheita da amostra é de extrema importância para poder isolar o microrganismo causador da infeção em detrimento de outros que façam parte da microbiota local. A importância da colheita das amostras microbiológicas já foi abordada na secção 2.1.1.

As análises bacteriológicas pressupõem as seguintes fases: cultura e isolamento da bactéria, identificação e realização do antibiograma. Para isso são necessários meios de cultura adequados (em amostras com flora microbiana comensal é necessário utilizar meios de crescimento seletivos e diferenciais que permitem o crescimento de agentes microbianos potencialmente patogénicos em detrimento de comensais) que devem ser incubados em estufa a temperatura, humidade e atmosfera adequadas ao seu desenvolvimento durante 18-24 horas ou 48-96 horas, dependendo do tipo de crescimento que apresentem.²⁸ A identificação da

bactéria é conseguida através da sua caracterização morfológica, com recurso à coloração de Gram, e bioquímica, realizada pelo equipamento *Vitek*. Este também é responsável pela realização do antibiograma que, alternativamente, pode ser efetuado manualmente pelo método de difusão em disco.

Em parasitologia a amostra mais comum são as fezes, para pesquisa de parasitas intestinais. O diagnóstico de infeções parasitárias é feito através da observação de formas parasitárias nas fezes; isto pode ser conseguido por observação das fezes a fresco ou após método de concentração.

O diagnóstico das infeções fúngicas, tal como as bacterianas, inclui a cultura, identificação e realização do antifungigrama. No laboratório ACM o antifungigrama é efetuado através de galerias API.

7. Caso Clínico

Um indivíduo do sexo masculino, 74 anos de idade, realizou análises de rotina por queixas de cansaço e mau estar geral. Conhecia-se no doente o historial de diabetes e DRC. Sem conhecimento da terapêutica farmacológica habitual. Os resultados analíticos de maior relevância são descritos na tabela 14.

Parâmetro	Resultado	Valor de referência
Eritrócitos (milhões/L)	2,95	4,31-6,40
Hemoglobina (g/dL)	9,3	13,6-18,0
Hematócrito (%)	29,0	39,8-52,0
Volume Globular Médio (fL)	93,0	80,0-97,0
Hemoglobina globular média (pg)	31,5	26,0-34,0
Concentração da hemoglobina globular média (g/dL)	32,1	32,0-36,0
RDW – Amplitude de distribuição (%)	18,4	11,5-15,0
Glicémia (mg/dL)	187	60-100
Hemoglobina A1c (%)	5,7	< 5,7
Creatinina (mg/dL)	7,80	0,70-1,20
Ferro sérico (ug/dL)	93	33-193
IST (%)	40	20-50
Cálcio total (mg/dL)	10,6	8,4-9,7
Sódio (mmol/L)	141	135-145
Potássio (mmol/L)	5,3	3,5-5,0
Cloreto (mmol/L)	100	95-110
PCR (mg/dL)	0,17	< 0,50
NT-PRO BNP (Precursor Peptídeo Natriurético Cerebral) (ng/L)	28916	< 125
Fosfatase Alcalina	55	41-137

Tabela 14 – resultados analíticos obtidos a 13/7/2023.

Os resultados analíticos obtidos evidenciam uma anemia normocrômica e normocítica, com aumento da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW). Foi realizado um esfregaço de sangue periférico para confirmação em lâmina: foi observada poiquilocitose com presença de equinócitos, acantócitos e esquizócitos, evidenciado na figura 3 e 4. Os restantes resultados analíticos demonstraram um forte declínio da função renal, com uma creatinina sérica de 7,80 mg/dL, hipercalcemia e hipercalemia. O NT-PRO BNP é o precursor do peptídeo natriurético cerebral, uma hormona secretada pelo coração em resposta ao

aumento da pressão nas paredes ventriculares, típico da insuficiência cardíaca congestiva; o seu valor está significativamente aumentado.

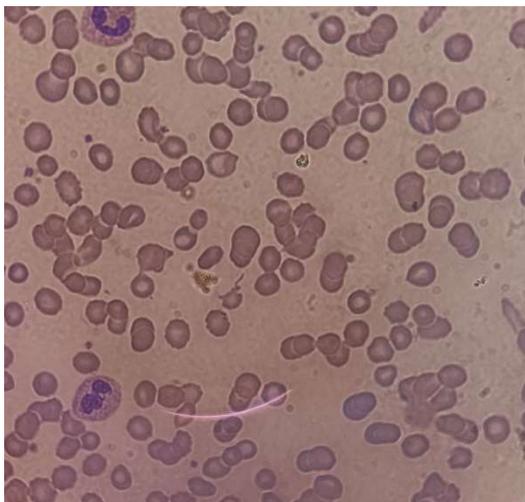


Figura 3 – esfregaço de sangue periférico com esquizócitos.

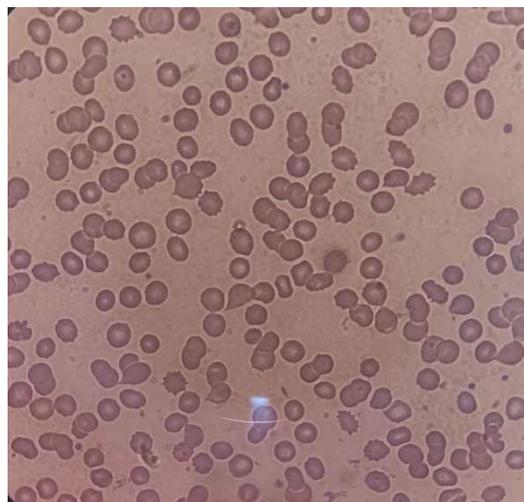


Figura 4 – esfregaço de sangue periférico com equinócitos e acantócitos.

O rim exerce funções de excreção, endócrinas e de manutenção de homeostase. A DRC pode ter várias origens que levam a uma progressiva perda de função renal que, numa fase inicial, pode manter-se indetetável, mas continua a sua progressão até à falência renal.² Neste doente há um declínio acentuado da função renal, com uma taxa de filtração glomerular estimada (CKD-EPI 2021) de 7 mL/min/m², já classificada como falência renal.² A hipercaliemia surge como complicação da DRC, por diminuição da excreção renal do potássio: este é normalmente eliminado por secreção no túbulo distal; a diminuição da TFG leva a uma diminuição do fluxo no túbulo distal, conduzindo à hipercaliemia.² No entanto, a hipercaliemia também pode ser uma consequência da diabetes (devido à hipoinsulinemia) ou de uma eventual terapêutica farmacológica para a insuficiência cardíaca congestiva.

Relativamente à regulação do cálcio, a apresentação mais frequente na DRC é a hipocalcemia. No entanto, o doente apresenta hipercalcemia; a esta podem ser atribuídas três causas: aumento da absorção intestinal (induzida pela 1,25-OH₂-Vitamina D), retenção renal e aumento da reabsorção óssea. Neste caso em concreto, tendo em conta o historial de DRC, a retenção pelo rim parece ser a causa mais provável, devido à diminuição da TFG. O aumento da reabsorção óssea parece pouco provável, já que o valor da fosfatase alcalina se encontra dentro dos valores de referência. O aumento da absorção intestinal, poderia ser a causa se o doente estiver a ser suplementado com calcitriol, a forma ativa da vitamina D, e estivéssemos perante um caso de hipervitaminose; caso não esteja a ser feita suplementação é muito pouco

provável, pois é o rim o responsável pela formação da forma ativa da vitamina D sendo, por isso, expectável que os níveis de 1,25-(OH)₂-Vitamina D também estejam diminuídos. A determinação adicional da PTH, 1,25-(OH)₂-Vitamina D e fósforo podem ter utilidade para diferenciar a causa da hipercalcemia.

Uma das funções endócrinas exercidas pelo rim é a de produção de eritropoietina (EPO), hormona produzida em resposta à diminuição da pressão de oxigénio. A EPO atua na medula óssea estimulando a produção de eritrócitos. A anemia é, por isso, uma consequência inevitável da progressão da DRC por perda de fibroblastos peritubulares, especializados na produção de EPO.² Este tipo de anemia caracteriza-se por ser normocrómica e, geralmente, normocítica. É comum o aparecimento de eritrócitos de formato anormal (como os esquizócitos, equinócitos e acantócitos observados) devido à uremia severa.²⁹ Foi possível descartar a anemia ferropénica - o ferro sérico encontra-se dentro dos valores de referência (embora a ferritina fosse mais útil na avaliação das reservas de ferro) e esta anemia é geralmente hipocrómica e microcítica – e a anemia das doenças crónicas inflamatórias – esta é também normocrómica e normocítica, mas o valor da PCR encontrar-se-ia elevado

O aumento significativo do NT-PRO BNP pode ser indicativo de insuficiência cardíaca congestiva no doente. No entanto, a DRC também está associada a níveis elevados deste marcador pela diminuição da sua clearance renal não sendo claro o seu significado neste doente. Seria necessário utilizar outros meios complementares de diagnóstico para confirmação.³⁰

Portanto, neste caso clínico estamos perante um doente com DRC e as complicações que advêm desta: alteração do equilíbrio eletrolítico, demonstrado pela hipercalemia e hipercalcemia, e a anemia normocrómica e normocítica. É um caso clínico onde é possível demonstrar a estreita conexão entre áreas analíticas distintas e a necessidade de olhar para os resultados analíticos como um todo para melhor poder compreender a situação individual de cada doente.

8. Conclusão

O MAC possibilita o contacto, do ponto de vista prático, com o laboratório de análises clínicas, antes do ingresso no mercado de trabalho. Trata-se de um ponto muito positivo deste mestrado, já que permite fazer a ponte entre o ensino teórico e a prática laboratorial em contexto real. Os alunos têm a possibilidade de interligar os conhecimentos teóricos, adquiridos durante o MAC, com conhecimentos práticos, que só é possível adquirir ao exercer efetivamente a profissão.

Embora a realidade diária do laboratório ACM já não fosse para mim uma novidade, considero que este estágio foi uma mais valia a nível profissional. Permitiu-me rever conceitos, melhorar métodos de trabalho e aprofundar conhecimentos em valências laboratoriais com as quais não lido de forma direta no dia-a-dia laboral.

Ingressei no MAC com o objetivo de consolidar e adquirir novos conhecimentos de forma a poder especializar-me na área de análises clínicas. É uma área multidisciplinar, que exige conhecimento aprofundado de todas as valências laboratoriais para que se possa olhar para os resultados analíticos como um todo. Considero que esses objetivos foram cumpridos e encontro-me, neste momento, melhor preparada para prosseguir com a especialização.

9. Bibliografia

1. ALAVI N., KHAN S.H., SAADIA A., NAEEM T. - **Challenges in Preanalytical Phase of Laboratory Medicine: Rate of Blood Sample Nonconformity in a Tertiary Care Hospital.** *EJIFCC.* 31,1 (2020) 21-27.
2. RIFAI N., HORVATH A.R., WITTEWER C.T. – **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** 8ª edição. EUA: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-53044-6.
3. RIBEIRO C. et al. - **MANUAL DE COLHEITAS SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA CENTRO HOSPITALAR LISBOA NORTE.** 7ª edição. Lisboa, 2017. [Acedido a 3 de abril de 2023]. Disponível em: https://www.chln.min-saude.pt/media/k2/attachments/servico_patologia_clinica/manual_colheitas_7_ed.pdf
4. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.** 6ª edição. Geneva: World Health Organization, 2021. ISBN 978-92-4-003078.
5. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Manual de Boas Práticas Laboratoriais.** [Acedido a 7 de abril de 2023]. Disponível na internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/manual_de_boas_praticas_laboratoriais_rev_12816431035b2a3ccb1ab78.pdf
6. ROCHE - **Cobas 6000 analyzer series.** [Acedido a 7 de abril de 2023]. Disponível na internet: https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas_-6000-analyzer-series.html
7. BISHOP M.L., FODY E.P., SCHOEFF L.E. – **Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations.** 6ª edição. Filadélfia, Pensilvânia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1.
8. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE – **Norma nº002/2011: Diagnóstico e Classificação Diabetes Mellitus.** Lisboa: Direção Geral de Saúde, 2011.
9. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – **Understanding A1C: Diagnosis.** [Acedido a 20 abril de 2023] Disponível na internet: <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>
10. TRAJKOVSKA K.T., TOPUZOVSKA S. - **High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol.** *Anatol J Cardiol.* 18, 2 (2017) 149-154.
11. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE – **Norma nº019/2011: Abordagem Terapêutica das dislipidemias no adulto.** Lisboa: Direção Geral de Saúde, 2011.

12. SEELEY R.R., STEPEHENS T.D., TATE P. – **Anatomia e Fisiologia**. 8ª edição. Loures: Lusociência, 2011. ISBN 978-972-8930-62-2.
13. LEE A.Y.S., CASSAR P.M., JOHNSTON A.M., ADELSTEIN S. - **Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays**. British Journal of Hospital Medicine 78, 2 (2017) C18-C20
14. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE – **Norma nº003/2014: Rastreio oportunístico do cancro do cólon e reto**. Lisboa: Direção Geral de Saúde, 2014.
15. SIMERVILLE J.A., MAXTED W.C., PHAIRA J.J. - **Urinalysis: A Comprehensive Review**. American Family Physician. 71, 6 (2005) 1153-1162.
16. DARWISH I.A. - **Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances**. Int J Biomed Sci. 2(3) (2006) 217–235.
17. VICENT L.F. *et al.* – **Programa Nacional para a vigilância da gravidez de baixo risco**. Lisboa: Direção Geral de Saúde, 2015. ISBN 978-972-675-233-2.
18. YILMAZ G. - **Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy**. Journal of Clinical Virology. 21, 3 (2001), 187-196.
19. **Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro - Elecsys HIV Combi**. [Acedido a 16 de maio de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Elecsys%20HIV%20Combi.pdf>
20. FERNANDES A., *et al.* – **Programa Nacional para as Hepatites Virais**. Lisboa: Direção Geral de Saúde, 2019. [Acedido a 16 de maio de 2023]. Disponível na internet: <https://www.sip-spp.pt/media/0r3pxisw/hepatites-virais-programa-nacional-2019-dgs.pdf>
21. MURRAY P.R., ROSENTHAL K.S., PFALLER M.A. – **Medical Microbiology**. 8ª edição. Philadelphia: ELSEVIER, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.
22. LAFOND R.E., LUKEHART S.A. – **Biological Basis for Syphilis**. Clin Microbiol Rev, 19(1) (2006) 29-49.
23. SATYAPUTRA F. *et al.* – **The Laboratory Diagnosis of Syphilis**. Journal of Clinical Microbiology, 59(10) (2021).
24. BAIN B.J., BATES I., LAFFAN M.A., - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12ª ed. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2.
25. PARKER V., TORMEY C.A., - **The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls**. Arch Pathol Lab Med. 14 (2), (2017), 305-310.
26. BIORAD – **LISS/Coombs**. [Acedido a 6 de maio de 2023]. Disponível na internet: <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/liss-coombs?ID=MAPWH615>

27. KERSTEN W. - **Comparison of the AllergyScreen (MEDIWISS Analytic, Moers) with the Skin Test (HAL, Düsseldorf -in-vivo) and the CAP-System (Pharmacia, Freiburg -in-vitro).** Moers. [Acedido a 21 de maio de 2023]. Disponível na internet: <https://zhst.joinstar.cn/upload/products/doc/bc00fe7d-986b-48e8-91a1-65734b527546.pdf>
28. FERREIRA W.F.C., SOUSA J.C.F., LIMA N. – **Microbiologia.** LIDEL, 2010. ISBN 978-972-757-515-2.
29. HOFFBRAND A.V., MOSS P.A.H., - **Hoffbrand's Essential Haematology.** 7^aed. Singapura: Wiley Blackwell, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4.
30. CUI H. *et al.* - **Association of cardiac and renal function with extreme N-terminal fragment Pro-B-type natriuretic peptide levels in elderly patients.** *BMC Cardiovasc Disord* 12, 57 (2012),