



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências

# **Relatório de Estágio em Análises Clínicas no Centro Hospitalar do Tâmega e do Sousa**

**Virgínia Fernanda Taipa Couto**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Dr. Ricardo Dário Sousa Carneiro

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

**Covilhã, Junho de 2019**



# Agradecimentos

Aos meus pais, aos meus irmãos, por todo o amor e carinho.

Ao meu apoio incondicional, Tiago Fernandes, obrigada pela paciência e pelo sacrifício.

Gostaria de agradecer à Dr.<sup>a</sup> Marília Dias, diretora do Serviço de Patologia Clínica, pela oportunidade de efetuar o estágio e a todo o corpo técnico do laboratório, administrativos e auxiliares.

Aos meus orientadores Prof.<sup>a</sup>. Doutora Cândida Tomaz e Dr. Ricardo Carneiro.



# Resumo

O presente relatório documenta o meu estágio curricular em análises clínicas no âmbito do Mestrado em Bioquímica, no serviço de Patologia Clínica (SPC) no Centro Hospitalar Tâmega e Sousa (CHTS), na unidade Padre Américo (UPA), em Penafiel, com a duração de 1200 horas, iniciado no dia 03 de setembro de 2018 e concluído com sucesso no dia 31 de março de 2019.

O principal objetivo deste estágio consistiu na integração no SPC dessa unidade hospitalar através da realização de atividades de rotina laboratorial de modo a compreender e adquirir boas condutas que garantissem a qualidade do serviço ao longo de todo o processo analítico (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica) e, para terminar, que culminassem no desenvolvimento de competências avançadas a nível profissional.

Neste relatório descrevem-se as atividades realizadas, tendo como ponto de partida o processo de integração do doente, passando pela colheita das amostras, a sua receção, a triagem e, finalmente, o desenvolvimento de diferentes valências nas distintas áreas do laboratório: Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Serologia.

## Palavras-chave

Bioquímica; Hematologia; Imunologia e Serologia



# Abstract

This report documents my curricular internship of Clinical Analysis in the scope of the master`s degree in biochemistry, performed in the Clinical Pathology Service (SPC), at the Tâmega and Sousa Hospital Center in the Padre Américo Unit (UPA), in Penafiel lasting 1200 hours. This internship focuses on my integration in the SPC with the main objective of acquiring the technique skills in laboratory routine, to ensure the quality of the service throughout the analytical process (pre-analytical, analytical and post-analytical) and to develop advanced skills at the professional level.

The internship included the process of integrating the patients, sampling, sample reception, screening process and the analytical process. The final objective was the development of different skills in the various areas of the laboratory: Biochemistry, Hematology, Immunology and Serology.

## Keywords

Biochemistry, Hematology, Immunology and Serology.





# Índice

INTRODUÇÃO .....	<u>1</u>
1. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO .....	4
2. CONTROLO DE QUALIDADE .....	7
3. HEMATOLOGIA .....	10
3.1 ANALISADOR SYSMEX XN-2000® .....	12
3.1.1 MÉTODOS .....	13
3.1.1.1 CITOMETRIA DE FLUXO .....	13
3.1.1.2 IMPEDÂNCIA E FOCO HIDRODINÂMICO .....	13
3.1.1.3 MÉTODO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SLS) SEM CIANETO .....	14
3.1.2 PARÂMETROS ANALÍTICOS .....	14
3.1.2.1 ERITROGRAMA .....	14
3.1.2.2 LEUCOGRAMA .....	16
3.1.2.3 PLAQUETOGRAMA .....	16
3.2 ANALISADOR VES-MATIC 30® .....	17
3.2.1 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO .....	18
3.3 ANALISADOR SYSMEX SP-1000i® .....	19
3.3.1 ESFREGAÇOS DE SANGUE PERIFÉRICO .....	20
4. IMUNOLOGIA .....	23
4.1 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS .....	24
4.2 ANALISADOR IMAGE® .....	26

4.2.1 NEFELOMETRIA	26
4.2.2 ESTUDO DAS PROTEÍNAS	27
4.3 ANALISADOR MINICAP®	29
4.3.1 ELETROFORESE E O PERFIL PROTEICO	30
4.4 ANALISADOR VIDAS®	32
4.4.1 ESTUDO DE INFECÇÕES VÍRICAS	33
4.5 ANALISADOR IMMUNOCAP 250®	34
4.5.1 AUTOIMUNIDADE	34
4.5.2 ALERGOLOGIA	36
4.6 MÉTODOS RÁPIDOS UTILIZADOS EM SEROLOGIA	37
5. BIOQUÍMICA.....	40
5.1 UNICEL DxC 880i®	41
5.1.1 QUIMIOLUMINESCÊNCIA	42
5.1.2 ESPECTROFOTOMETRIA	42
5.1.3 TURBIDIMETRIA	43
5.1.4 POTENCIOMETRIA	44
5.2 AQT 90 FLEX®	44
5.3 ADAMS A1C HA-8160®	44
5.4 PARÂMETROS DA BIOQUÍMICA	45
5.4.1 METABOLISMO DOS HIDRATOS DE CARBONO	45
5.4.2 IONOGRAMA	46
5.4.3 METABOLISMO DE LÍPIDOS	46
5.4.4 FUNÇÃO RENAL	47
5.4.5 FUNÇÃO HEPATO-BILIAR	47

5.4.6 FUNÇÃO PANCREÁTICA	49
5.4.7 MARCADORES CARDÍACOS	49
5.4.9 METABOLISMO DO FERRO	50
5.4.10 MARCADORES TUMORAIS	50
5.4.11 OUTROS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE INTERESSE	51
CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS:.....	57



# Lista de Figuras

Figura 1 - A célula estaminal pluripotente da medula óssea e as linhagens celulares que dela se originam

Figura 2 - Analisador Sysmex XN-2000®

Figura 3 - *Analisador Ves-Matic 30*®

Figura 4 - Analisador Sysmex SP-1000i®

Figura 5 - Equipamento Immage 800®

Figura 6 - Esquema representativo de Nefelometria

Figura 7 - Analisador Minicap®

Figura 8 - Perfil eletroforético das principais proteínas encontradas em cada banda.

Figura 9 - Equipamento VIDAS®

Figura 10 - Equipamento ImmunoCap 250®

Figura 11 - Equipamento Unicel DxC 880i®

Figura 12 - Espectrofotometria

Figura 13 - Turbidimetria

Figura 14 - Equipamento AQT 90 Flex®

Figura 15 - Equipamento A1C HA-8160®

Figura 16 - Analisador Aution Max-AX-4280®

Figura 17- Analisador Sedimax®



# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Material de colheita no setor de hematologia

Tabela 2 - Métodos e respectivos parâmetros analíticos realizados no equipamento Sysmex XN-2000®

Tabela 3 - Valores de referência de um eritrograma

Tabela 4 - Valores de referência de um leucograma

Tabela 5 - Valores de referência de um plaquetograma

Tabela 6 - Valores de referência da velocidade de sedimentação de acordo com a idade e sexo

Tabela 7 - Avaliação da morfologia das células eritrocitárias, leucocitárias e plaquetares

Tabela 8 - Equipamentos, métodos e parâmetros analíticos no setor de Imunologia

Tabela 9 - Autoanticorpos ANA quantificados e respetiva correlação clínica

Tabela 10 - Autoanticorpos quantificados e respetiva correlação clínica

Tabela 11 - Valores de referência e valores críticos de um ionograma por método potenciométrico

Tabela 12 - Valores de referência por método colorimétrico e enzimático dos analitos: creatinina; ácido úrico e da ureia

Tabela 13 - Valores de referência e respetivo método dos analitos na avaliação da função hepato-biliar



Tabela 14 - Valores de referência e método da amilase e lipase

Tabela 15 - Marcadores tumorais e respectivos analitos

Tabela 16 - Analitos e respectivos valores de referência das hormonas no estudo da fertilidade



# Lista de Acrónimos

4-MUP	4-Metil-Umbeliferil Fosfato
AEQ	Avaliação Externa de Qualidade
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
ANA	Anticorpos Antinucleares
ANCA	Anticorpos anti-citoplasmáticos
AST	Aspartato Aminotransferase
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CK	Creatinaquinase
CK-MB	Creatinaquinase MB
CMV	Citomegalovírus
CP	Ceruloplasmina
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DBIL	Bilirrubina direta
DM	Diabetes Mellitus
EBV	Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
ELFA	Ensaio fluorescente ligado à enzima
EIA	Ensaio Imunoenzimático
ESP	Esfregaço de sangue periférico
FEIA	Ensaio fluoroenzimático

FFC	Citometria de Fluxo de Fluorescência
FR	Fator Reumatóide
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular média
HCT	Hematócrito
HDL	Lipoproteínas de Elevada Densidade
HHV	Vírus do Herpes Humano
HP	Haptoglobina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Igs	Imunoglobulinas
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MNI	Mononucleose Infeciosa
MPV	Volume Plaquetar Médio
NT-proBNP	Pró-peptídeo Natriurético do Tipo B, Porção N Terminal
PDW	Amplitude da variação do volume plaquetar
PFA	Proteínas de Fase Aguda

P-LCR	Porcentagem de plaquetas
PLT	Plaquetas
RDW-CV	Amplitude da variação da concentração da Hemoglobina
RDW-SD	Amplitude da Variação do Volume do Eritrócito
RPR	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
SLS	Sulfato Lauril de Sódio
SP	Sangue periférico
SPC	Serviço de Patologia Clínica
TBIL	Bilirrubina Total
TDT	Técnicos de diagnóstico e terapêutica
TRF	Fluorimetria de Resolução Temporal
UCTA	<i>Universal Close Tube Aliquoter</i>
UPA	Unidade Padre Américo
$\gamma$ -GT	Gama Glutamiltransferase



# Introdução

A missão do Serviço de Patologia Clínica consiste na análise de amostras biológicas dos doentes integrados na unidade hospitalar de modo a garantir a qualidade dos resultados dos exames laboratoriais, no período mais curto possível, para facilitar o diagnóstico das patologias dos doentes, nas áreas de Bioquímica, Hematologia, Imunologia, Serologia e Microbiologia.

No decorrer do estágio, acompanhei todo o processamento laboratorial desde a fase pré-analítica à pós-analítica, sendo de referir, que a fase pós-analítica foi apenas observacional, pois esta é efetuada apenas por um patologista clínico especializado. Ao longo de todo o processo, tive uma apresentação minuciosa da parte de todos os técnicos e fui-me familiarizando com a organização e funcionamento de cada setor.

Ao ter a oportunidade de acompanhar diferentes etapas durante todo o processo analítico, pude observar a execução de alguns procedimentos comuns a todas as valências, tais como: manutenção diária dos equipamentos; preparação de reagentes e reconstituição de controlos e calibradores; programação de amostras, calibradores e controlos; garantia da qualidade através da avaliação do Controlo de Qualidade Interno (CQI), Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) e ainda, adquirir conhecimentos aprofundados dos equipamentos e metodologias analíticas dos diferentes setores.

O estágio teve a duração de 1200 horas com início em setembro de 2018 e com final em março de 2019. Inicialmente consistiu em compreender o funcionamento e organização geral do laboratório abordando princípios básicos de segurança laboratorial, gestão de resíduos hospitalares e laboratoriais, materiais específicos de colheita de amostras e familiarização com os procedimentos informáticos. Foi também integrada a rotina dos assistentes administrativos implicando a integração e confirmação de dados do doente e triagem dos tubos de colheita por setor.

O laboratório é dividido por várias valências, nomeadamente: Bioquímica, Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Serologia, sendo que, durante o estágio, permaneci um mês em cada um destes setores, à exceção da microbiologia onde, por razões organizacionais, apenas tive a oportunidade de observar o processo de trabalho ao longo duas semanas. A integração em cada um destes setores permitiu desenvolver e aplicar técnicas analíticas e compreender os princípios básicos dos métodos e a sua aplicação nos diferentes equipamentos, perceber os componentes principais, princípio de funcionamento e manutenção dos analisadores, efetuar e interpretar valores de referência e valores críticos, garantir o CQI e a AEQ. O CQI corresponde a um registo intralaboratorial utilizado diariamente para o controlo da reprodutibilidade dos resultados das análises a realizar através de soros comerciais, com valores analíticos conhecidos e designados pelo nível alto, médio ou baixo para avaliação da precisão dos ensaios. A AEQ é um controlo interlaboratorial que consiste na avaliação dos resultados do laboratório por um Organismo Exterior de Qualidade. Foi também possível observar e executar alguns procedimentos integrados na rotina laboratorial, tais como a manutenção diária e semanal dos equipamentos, preparação de reagentes, reconstituição de controlos e calibradores e ainda a programação de controlos, calibradores e amostras dos equipamentos automatizados.

Como tal, nas próximas páginas pretendo documentar de forma mais precisa e detalhada a experiência que adquiri em cada uma das áreas deste SPC.





# 1. Caracterização do Laboratório

O Centro Hospitalar de Tâmega e Sousa é constituído por duas unidades hospitalares: a Unidade Padre Américo (UPA), em Penafiel, e a Unidade de São Gonçalo (USG), em Amarante.

A UPA situa-se na zona de Vale de Sousa, em Guilhufe, Penafiel e foi inaugurada em 27 de outubro de 2001. O hospital é constituído por um edifício principal com 11 pisos e um outro edifício dirigido ao departamento de Psiquiatria e Saúde Mental.

O SPC e as salas de colheitas estão localizadas no piso 3 da unidade hospitalar principal. É constituído pela área administrativa e pela área técnica que inclui a sala de colheitas, sala de receção, sala de separação de amostras, urinanálise, bioquímica, imunologia e serologia, hematologia, microbiologia, uma sala de reuniões/biblioteca e uma sala de convívio para os funcionários.

O SPC funciona das 8:00 horas às 16:00 horas para o serviço de consulta externa (em dias úteis) e 24 horas por dia para as urgências e internamentos (serviços prioritários). A equipa de trabalho do laboratório de Patologia clínica do CHTS, sob a direção e coordenação da Dr.<sup>a</sup> Marília Dias é composta por médicos patologistas, técnicos de diagnóstico e terapêutica (TDT), assistentes administrativos e assistentes operacionais.

Os serviços do SPC utilizam o sistema informático “Clinidata XXI” que permite a inscrição do paciente, o controlo da entrada de amostras, gravação e posterior validação dos resultados, acesso à identificação, bem como o historial clínico, valores críticos e ligação on-line *Host-Query Mode*<sup>1</sup>. Para uma rápida transferência de dados entre toda a unidade o “Clinidata Net” permite a intercomunicação entre os diferentes serviços do hospital e do laboratório. Para além dos softwares referidos anteriormente e que são extremamente valiosos do ponto de

---

<sup>1</sup> Protocolo de ligação em rede entre os diferentes equipamentos do laboratório.

vista organizacional ao permitir enviar e receber dados com extrema rapidez, existem ainda outros softwares como o “Sonho” e “Alert” que fazem parte do sistema informático de softwares de gestão ligados em rede ao “Clinidata”.

É importante referir que o laboratório se encontra apetrechado com o mais sofisticado equipamento automatizado e que todos os protocolos de funcionamento são verificados diariamente de acordo com o controlo de qualidade, nomeadamente a calibração e reagentes sempre de acordo com as recomendações do fabricante de cada equipamento.



## 2. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade é um componente essencial em todos os laboratórios clínicos para manter a excelência dos padrões laboratoriais que permitam o diagnóstico adequado da doença, o atendimento ao paciente e resultando no fortalecimento geral do sistema de saúde. <sup>1</sup> O processo analítico é dividido em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

A fase pré-analítica consiste no pedido do exame médico, preparação do doente, colheita, transporte da amostra e, sempre que se verifique, identificação e critérios de rejeição da amostra. A fase analítica corresponde a todo o processo analítico onde se aplicam os conceitos de AEQ e CQI e a fase pós-analítica incide, maioritariamente, na validação dos resultados.

O objetivo do laboratório clínico é fornecer informações úteis para a deteção, diagnóstico e monitorização da doença e como tal, deve garantir a qualidade do processo extra-analítico e analítico com base em critérios bem definidos. Deste modo, deve desenvolver e implementar um sistema interno de controlo de qualidade devidamente projetado para detetar erros e comparar os dados recolhidos com os de outros laboratórios através do controlo de qualidade externo. Esta ferramenta permite confirmar o cumprimento dos objetivos definidos e, em caso de erros, permite ações corretivas e garante a fiabilidade dos resultados. <sup>2</sup>

Em relação ao CQI, trata-se antes de mais de um registo intralaboratorial utilizado diariamente para o controlo da reprodutibilidade dos resultados das análises a realizar através de soros comerciais, com valores analíticos conhecidos e designados pelo nível alto, médio ou baixo para avaliação da precisão dos ensaios. A avaliação do CQI é realizada com base nos gráficos de *Levy-Jennings* ou através de cartas de CQI, tendo em conta as regras de *Westgard* na aceitação ou rejeição dos resultados dos controlos e na validação dos resultados das amostras. O Procedimento de CQ de Regras Múltiplas de *Westgard*, como é mais conhecido, utiliza 5 regras de controle diferentes para julgar a aceitabilidade de uma corrida analítica. Por comparação, um procedimento de regra única de controle utiliza um único

critério ou um único par de limites de controle, assim como um gráfico de *Levey-Jennings*, com limites de controle calculados como  $\bar{x} \pm 2DP$  (média mais ou menos dois desvios-padrão) ou  $\bar{x} \pm 3DP$  (média mais ou menos 3 desvios-padrão). As “Regras de Westgard” são geralmente utilizadas com 2 ou 4 medições de controle por corrida, o que significa que elas são apropriadas quando dois materiais de controle diferentes são medidos uma ou duas vezes por material, que é o caso em muitas aplicações bioquímicas.<sup>3</sup>

A AEQ é um controlo interlaboratorial que consiste na avaliação dos resultados do laboratório por um Organismo Exterior de Qualidade. Tem como principal objetivo verificar a exatidão dos dados analíticos comparando o desempenho do laboratório com o de outros laboratórios que utilizem os mesmos métodos a nível nacional e internacional. O laboratório da UPA participa em alguns programas internacionais de AEQ como o RIQAS (*Randox International Quality Assessment*) e UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

A manutenção diária e semanal dos equipamentos, a preparação de reagentes, a reconstituição de controlos e calibradores e ainda a programação de controlos, calibradores e amostras dos equipamentos automatizados é também um processo muito importante para garantir uma qualidade de excelência.

A calibração deve ser sempre efetuada quando se utiliza um novo lote de reagentes no intervalo de frequência de calibração recomendada ou quando assim se justifique. A calibração é um método que permite uniformizar as análises das amostras em relação às condições existentes, ou seja, a partir de uma amostra padrão os equipamentos são calibrados para apresentarem resultados fidedignos.

Durante o estágio tive a possibilidade de acompanhar a avaliação diária de amostras de CQI observando as respetivas cartas de controlo e interpretando de forma crítica os resultados. Esta experiência diária permitiu que ficasse familiarizada com os padrões de controlo de qualidade típicos de um laboratório desta dimensão.



### 3. Hematologia

Hematologia é o ramo da biologia que estuda o sangue. A palavra é composta pelos radicais gregos: Haima (de haimatos), "sangue" e lógos, "estudo, tratado, discurso". A Hematologia estuda os elementos figurados do sangue: hemácias (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas. Estuda, também, a produção desses elementos e os órgãos onde eles são produzidos (órgãos hematopoiéticos): medula óssea. Além de estudar o estado de normalidade dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, estuda as doenças a eles relacionadas.<sup>4</sup>

No setor da hematologia realizam-se hemogramas, análises da velocidade de sedimentação, citologia de líquidos biológicos, contagem de reticulócitos, contagem total e diferencial de células em líquidos pleurais, peritoneais e outros. Estes dois últimos e o Esfregaço de Sangue Periférico (ESP) são efetuados e avaliados neste laboratório apenas pelo patologista clínico.

Na hematologia a amostra é majoritariamente sangue total que é recolhido em tubos com EDTA K3 (ácido etilenodiaminatetracético), um quelante de íons de cálcio que evita que ocorra coagulação, hemólise ou qualquer alteração morfológica da amostra. No entanto, também se analisam outras amostras biológicas como o líquido pleural, peritoneal e cefalorraquídeo.

Durante o estágio neste setor foi possível efetuar hemogramas, determinar a velocidade de sedimentação e efetuar esfregaços sanguíneos utilizando equipamentos automatizados que serão abordados neste capítulo. Na rotina laboratorial diária efetuei a receção da amostra previamente triada, verificando as condições necessárias para efetuar um processamento bem executado, nomeadamente, se a amostra possuía o volume suficiente, a inexistência de coágulo ou fibrina e se o tubo era adequado (Tabela 1), dando seguimento então à quantificação das amostras nos respetivos aparelhos de acordo com os parâmetros pedidos.



Tabela 1- Material de colheita no setor de hematologia

<u>Parâmetro analítico</u>	<u>Tubo</u>
Hemograma (Adultos)	Tubo com EDTA K3, tampa cor roxa
Hemograma (Pediatria)	Tubo com EDTA K3, tampa cor vermelha
Velocidade de sedimentação (VS)	Tubo com citrato de sódio, tampa cor preta
Líquidos Biológicos (exceto LCR)	Tubo com EDTA K3, tampa cor roxa
LCR	Tubo seco, esterilizado, tampa cor azul

A hematopoiese (formação das células sanguíneas) processa-se a partir de células estaminais pluripotentes na medula óssea. As células estaminais dão origem a células progenitoras que, após divisão e diferenciação, formam eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, plaquetas e linfócitos B e T (Figura 1).<sup>5</sup>

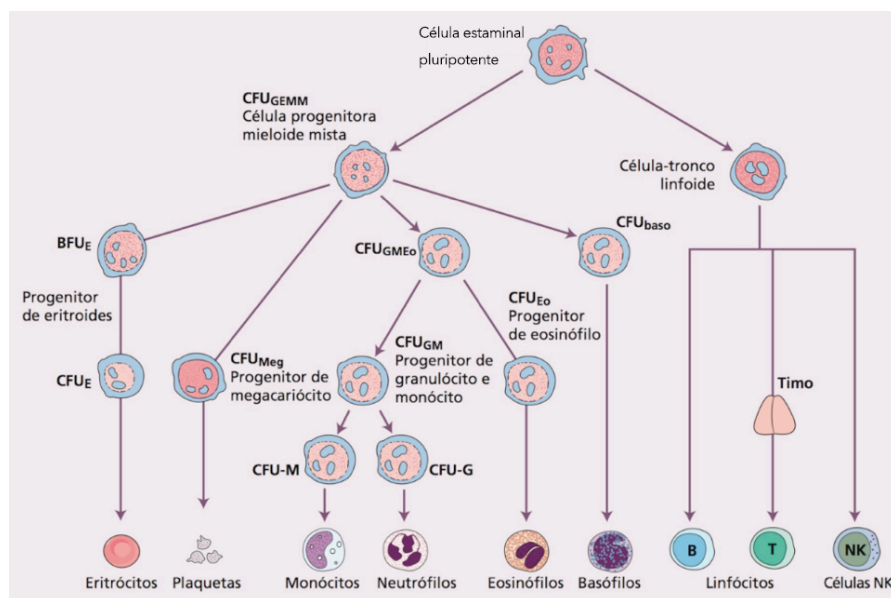


Figura 1 - A célula estaminal pluripotente da medula óssea e as linhagens celulares que dela se originam.<sup>5</sup>

### 3.1 Analisador SYSMEX XN-2000®

O laboratório do SPC está equipado com um equipamento automático de diagnóstico, o Sysmex XN-2000® (Figura 2), que permite a realização de análises hematológicas para determinação de hemograma utilizando as metodologias de acordo com o parâmetro analítico (Tabela 2).

Tabela 2 - Métodos e respectivos parâmetros analíticos realizados no equipamento Sysmex XN-2000®

<b><u>Metodologia</u></b>	<b><u>Parâmetros Analíticos</u></b>
<b>Citometria de Fluxo</b>	Diferencial leucocitária; granulócitos imaturos; eritrócitos nucleados; reticulócitos; fração imatura dos reticulócitos; contagem das plaquetas fluorescentes; fração imatura das plaquetas
<b>Impedância e Foco hidrodinâmico</b>	Contagem de plaquetas por imdedância; Contagem de eritoblastos; Hematócrito
<b>Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS) sem cianeto)</b>	Hemoglobina

O Sysmex XN-2000®, é a combinação de 2 analisadores na mesma plataforma analítica, configurando uma solução exclusiva de back-up integrado capaz de processar até 200 amostras por hora. Equilibra automaticamente o fluxo do processamento das amostras entre os 2 módulos e tem um sistema ímpar de consolidação da base num computador.



Figura 2 - Analisador Sysmex XN-2000® <sup>6</sup>

### 3.1.1 Métodos

#### 3.1.1.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo com fluorescência (FFC, *f*luorescence flow cytometry) é utilizada para quantificar e analisar as propriedades físicas e químicas de células e partículas. Na citometria de fluxo, estas são examinadas enquanto fluem através de uma célula de fluxo muito estreita. Em primeiro lugar, a amostra de sangue é aspirada e então diluída de acordo com fator pré-determinado. É marcada com um marcador fluorescente que se liga especificamente aos ácidos nucleicos. A amostra é de seguida transportada para a célula de fluxo e irradiada por um laser semiconductor, que consegue separar as células utilizando três sinais diretos, a dispersão frontal de luz (*forward scatter*), dispersão lateral de luz (*side scatter*) e a fluorescência lateral (*side fluorescence*). A intensidade da dispersão frontal indica o volume celular. A dispersão lateral fornece informação sobre o conteúdo celular, como por exemplo, núcleos e grânulos. A fluorescência lateral indica a quantidade de ADN e ARN presente na célula.<sup>7</sup>

#### 3.1.1.2 Impedância e Foco Hidrodinâmico

A Impedância é utilizada para a contagem e análise da dimensão das células. O sistema aspira a amostra, dilui-a e analisa-a no fluxo. Na travessia dos capilares, na qual predomina um campo elétrico com intensidade de corrente constante entre os eletrodos, acontece uma

alteração do potencial elétrico. Esta alteração tem como efeito um aumento da tensão entre os elétrodos que é proporcional ao volume da célula. A focagem hidrodinâmica é o processo que melhora a precisão e a reprodutibilidade da contagem de células do sangue, através de diluições e transdutores que se encontram numa área sensível do sistema de análise.

### **3.1.1.3 Método de Lauril Sulfato de Sódio (SLS) sem cianeto**

O método de detecção de hemoglobina (Hb) utiliza o surfactante aniónico lauril sulfato de sódio (SLS) sem cianeto. O reagente hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra. A reação química inicia-se com a alteração da Hb, oxidando depois o grupo heme. O grupo hidrofílico do SLS liga-se ao grupo heme, formando um complexo corado (SLS-Hb) que é analisado através de um método fotométrico. Um LED emite luz monocromática que ao passar pela mistura é absorvida pelos complexos SLS-Hb. A concentração de Hb da amostra é proporcional à absorção.<sup>8</sup>

### **3.1.2 Parâmetros analíticos**

O hemograma corresponde a um conjunto de testes laboratoriais que estabelece os aspetos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue.<sup>9</sup>

A colheita de sangue total para o hemograma é feita para um tubo com EDTA K3 tendo em atenção se se trata de uma criança ou um adulto sendo que estes serão diferenciados através da cor da tampa do tubo (Tabela 1).

#### **3.1.2.1 Eritrograma**

Um eritrograma é constituído pelos testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série vermelha no Sangue Periférico (SP). É definido pela contagem de eritrócitos, pela quantificação de hemoglobina, avaliação do hematócrito, índices hematimétricos onde se inclui: o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular média (HCM), a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), a Amplitude da Variação do Volume

do Eritrócito (RDW-SD) e a Amplitude da variação da concentração da Hemoglobina (RDW-CV). Para além de tudo o que foi referido anteriormente, deve também ser efetuada uma avaliação da morfologia eritrocitária (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de referência de um eritrograma

<b><u>Eritrograma</u></b>	<b><u>Definição</u></b>	<b><u>Valores de referência</u></b>	<b><u>Unidades</u></b>
<b>RBC</b>	Contagem de eritrócitos	4.30 - 5.90	10 <sup>6</sup> células / µL
<b>HGB</b>	Concentração da hemoglobina	13.9 - 16.3	g/dL
<b>HCT</b>	Hematócrito	39.0 - 55.0	%
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular médio	80.0 - 100.0	fL
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular média	25.0 - 35.0	pg
<b>CHCM</b>	Concentração da hemoglobina Corpuscular Média	31.0 - 37.0	g/dL
<b>RDW-SD</b>	Amplitude da variação do volume do eritrócito	37.0 - 54.0	fL
<b>RDW-CV</b>	Amplitude da variação da concentração da Hemoglobina	11.0 - 16.0	%

### 3.1.2.2 Leucograma

O Leucograma inclui os testes laboratoriais de série branca (leucócitos) no SP. É constituído pela contagem global e pela contagem diferencial de leucócitos incluindo a análise das respetivas alterações morfológicas do sangue. O resultado é apresentado sob a fórmula leucocitária (com valores relativos e absolutos) de cada subtipo leucocitário (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de referência de um leucograma

<u>Leucograma</u>	<u>Valores de referência</u>	<u>Unidades</u>
<b>Leucócitos</b>	4.5 - 13.0	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Neutrófilos</b>	1.5 - 6.0	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Eosinófilos</b>	0.05 - 0.80	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Basófilos</b>	0.02 - 0.12	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Linfócitos</b>	1.5 - 4.5	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Monócitos</b>	0.15 - 1.3	$10^3/\mu\text{L}$
<b>Granulócitos Imaturos</b>	(contagem automática)	$10^3/\mu\text{L}$

### 3.1.2.3 Plaquetograma

O Plaquetograma envolve a contagem de plaquetas e a avaliação da sua morfologia através de microscopia para a determinação do Volume Plaquetar Médio (MPV) e da Variação entre Volumes (PDW) (Tabela 5).

Tabela 5 -Valores de referência de um plaquetograma

<u>Leucograma</u>	<u>Definição</u>	<u>Valores de referência</u>	<u>Unidades</u>
PLT	Contagem de plaquetas	180.0 - 430.0	$10^3/\mu\text{L}$
PDW	Amplitude da variação do volume plaquetar	9.0 - 17.0	fL
MPV	Volume plaquetar médio	9.0 -13.0	fL
P-LCR	Porcentagem de plaquetas	13.0 - 43.0	%

### 3.2 Analisador Ves-matic 30<sup>®</sup>

O analisador automático Ves-matic 30<sup>®</sup> (Figura 3) é um sistema automatizado para medir a velocidade de separação entre os glóbulos vermelhos e o plasma com leitura de nível de sedimentação através de um sensor ótico-eletrônico com resultados comparáveis aos obtidos com o método de *Westergren*, considerada a técnica padrão para a quantificação da velocidade de sedimentação.

A VS é determinada com 1 mL de sangue a partir do tubo de colheita por vácuo e o risco de contaminação por parte do operador é reduzido. As amostras são sujeitas a uma agitação padronizada e homogênea e a sedimentação é lida automaticamente em intervalos de tempo precisos. Os raios infravermelhos utilizados na leitura evitam interferências causadas pela presença de lipídios ou bilirrubinas nas amostras.



Figura 3 - Analisador Ves-Matic 30 ®<sup>10</sup>

### 3.2.1 Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é a velocidade à qual se produz a sedimentação dos eritrócitos em uma quantidade de tempo predeterminada, também conhecida como taxa de sedimentação de eritrócitos.

A VS permite uma avaliação inespecífica de processos infecciosos agudos e crónicos, doenças autoimunes, gamopatias, doenças degenerativas e neoplasias; índice de progressão da doença na artrite reumatóide e tuberculose; diagnóstico e evolução da artrite temporal.<sup>11</sup>

Para este tipo de análise a amostra é colhida por vácuo para um tubo com citrato de sódio e os valores de referência variam de acordo com a idade e com o sexo (Tabela 6).



Tabela 6 - Valores de referência da velocidade de sedimentação de acordo com a idade e sexo

<u><b>Sexo/Idade</b></u>	<u><b>Valores de referência (mm/hr)</b></u>
<b>Homens &lt; 50 anos</b>	0-15
<b>Mulheres &lt; 50 anos</b>	0-25
<b>Homens &gt; 50 anos</b>	0-20
<b>Mulheres &gt; 50 anos</b>	0-30

### 3.3 Analisador Sysmex SP-1000i®

O SP-1000i® é (Figura 4) é uma unidade totalmente automatizada para a preparação de esfregaços de sangue periférico (ESP). Realiza todas as tarefas implicadas na preparação do ESP, desde a aspiração, identificação e realização do esfregaço e a sua coloração.

O SP-1000i® recebe as informações necessárias provenientes do computador servidor e efetua o ESP de acordo com as condições definidas na unidade principal do SP-1000i.



Figura 4 - Analisador automático Sysmex SP-1000i®<sup>12</sup>

### 3.3.1 Esfregaços de sangue periférico

Os esfregaços de sangue periférico (ESP) são realizados e corados de modo automático no equipamento SP-1000i® salvo raras exceções em que não haja volume suficiente de amostra, como por exemplo, em tubos pediátricos. Nestes casos, o esfregaço é realizado manualmente e depois corado no equipamento, ou então, com o corante de *Leishman*. O equipamento utiliza o corante de *May-Grunwald Giemsa*. A observação da morfologia de células do SP deve ser precedida pela avaliação da qualidade do esfregaço e da coloração, inclui a avaliação e o estudo morfológico dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Tabela 7).

Tabela 7 - Avaliação da morfologia das células eritrocitárias, leucocitárias e plaquetar

<u>Avaliação</u>	
Eritrocitária	Volume e forma Anisocromia Distribuição Inclusões eritrocitárias Identificação e quantificação de eritroblastos
Leucocitária	Contagem diferencial manual Alterações nucleares e citoplasmáticas Pesquisa de formas jovens Pesquisa de formas patológicas
Plaquetária	Forma Volume Distribuição e agregados plaquetários

O estudo dos eritrócitos deve ser realizado quanto à sua forma:

- Esferócitos
- Elíptócitos
- Células em alvo (*target cell*)
- Acantócitos
- Estomatócitos
- Células em forma de foice (*Sickle cells*)
- Poiquilócitos ou esquisócitos

Quanto ao tamanho os eritrócitos podem ser classificados como normocíticos, microcíticos, macrocíticos, anisocíticos e policromáticos.

No estudo dos leucócitos deve avaliar-se alterações nucleares e citoplasmáticas, pesquisa de formas imaturas, de formas patológicas e a contagem diferencial, que consiste na determinação em percentagem dos diferentes tipos de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos).

As plaquetas devem ser estudadas quanto à sua distribuição e agregação, à sua forma e volume. A sua contagem é de grande importância, quando se observa por contagem automática um número reduzido de plaquetas (trombocitopenia) ou um número elevado de plaquetas (trombocitose).



## 4. Imunologia

A imunologia consiste no estudo das moléculas, células, órgãos e sistemas responsáveis pelo reconhecimento e exclusão de material estranho (não próprio), nomeadamente como os componentes do corpo respondem e interagem; as consequências desejáveis e indesejáveis das interações imunológicas e o modo como o sistema imunológico pode ser vantajosamente manipulado para proteger contra ou tratar doenças. O sistema imunológico é composto por um grande conjunto complexo de elementos amplamente distribuídos, com características distintas. Especificidade e memória são características dos linfócitos. Vários elementos específicos e inespecíficos do sistema imunológico demonstram mobilidade, incluindo linfócitos T e B, imunoglobulinas (anticorpos), complemento e células hematopoiéticas.<sup>13</sup>

O setor de imunologia inclui análises de serologia, doseamento de proteínas, autoimunidade e alergologia, sendo equipado por analisadores automatizados (Tabela 8). Fisicamente, o setor de imunologia encontra-se numa sala individual onde estão todos os equipamentos automatizados e funciona de acordo com um plano de trabalho específico. Neste setor tive oportunidade de acompanhar toda a rotina laboratorial adquirindo conhecimentos teóricos básicos que permitiram compreender os procedimentos analíticos, bem como verificar as condições da amostra após a respetiva colheita, a sua conservação e a sua preparação. As técnicas manuais no âmbito da serologia são também da responsabilidade do setor de imunologia, sendo que todo o meu acompanhamento neste setor foi apenas observacional (Tabela 8).

Tabela 8- Equipamentos, métodos e parâmetros analíticos no setor de Imunologia

<u>Equipamentos</u>	<u>Métodos</u>	<u>Parâmetros Analíticos</u>
VIDAS®	Método Imunoenzimático tipo sandwich com deteção final em fluorescência (ELFA)	Anticorpos do tipo Imunoglobulina M da capsíde viral do vírus Epstein Barr - EBV VCA IgM  Anticorpos do tipo Imunoglobulina G da capsíde viral do vírus Epstein Barr - EBV VCA IgG  EBV EBNA IgG  Anticorpos anti citomegalovírus humano do tipo imunoglobulina M - CMV IgM  Anticorpos anti citomegalovírus humano do tipo imunoglobulina G- CMV IgG
Minicap®	Eletroforese	Proteinograma sérico
Immunocap250®	Ensaio fluoroenzimático (FEIA)	Autoanticorpos de interesse clínico  Imunoglobulinas do tipo E total e específica
Image®	Nefelometria	Alfa-1 antitripsina  Cadeias leve Kappa  Cadeias leves lambda  Ceruloplasmina  Fator reumatóide  Haptoglobina

#### 4.1 Ensaios imunológicos

Os ensaios imunológicos são métodos baseados na reação antígeno-anticorpo que produzem um imunocomplexo detetável. Há vários tipos de ensaios imunológicos dependendo do imunocomplexo e do método de detecção do mesmo. Os métodos de analitos podem ser do tipo competitivo ou não competitivo/*sandwich* utilizando como método de detecção a

fluorescência e a quimioluminescência.

### **Ensaio imunológico competitivo**

Neste tipo de ensaio, ao antígeno presente na amostra do doente é adicionado um antígeno idêntico, mas marcado com um fluorocromo ou outro agente de detecção, que competem pela ligação a um anticorpo específico. O antígeno marcado é misturado com o anticorpo a uma concentração em que há saturação dos locais de ligação antígeno - anticorpo. De seguida a amostra é adicionada e como o anticorpo não distingue antígenos marcados de não marcados, os dois tipos de antígenos vão competir pela ligação ao anticorpo (se existir antígeno na amostra do doente).

Quanto maior a concentração do antígeno de interesse, menor o sinal gerado pelo antígeno marcado, sendo inversamente proporcionais.<sup>14</sup>

### **Ensaio imunológico *Sandwich* / Não Competitivo**

Nos ensaios imunológicos não competitivos/*sandwich*, existem anticorpos específicos imobilizados (anticorpos primários) que são complementares com os antígenos da amostra que, por sua vez, estabelecem complementaridade com anticorpos secundários, que reconhecem esses antígenos numa região distinta.<sup>15</sup>

Quanto maior a concentração do antígeno de interesse maior o sinal obtido, sendo diretamente proporcionais.<sup>16</sup>

Como tal, no ensaio imunológico competitivo tanto o inibidor como o substrato competem pela enzima sendo que ocorre uma diminuição do número de moléculas enzimáticas disponíveis para ligar ao substrato, enquanto que no ensaio imunológico não-competitivo não existe qualquer impedimento da ligação do substrato à enzima, assim, há uma redução de moléculas enzimáticas funcionais.

## 4.2 Analisador Image®

O sistema de Imunoquímica Image 800® da Beckman Coulter (Figura 5) é um analisador de bancada totalmente automatizado, controlado por computador, concebido para a quantificação, *in vitro*, de componentes de fluidos biológicos e de fármacos. Possui a função de identificação de código de barras de amostras e reagentes e dilui automaticamente as amostras distribuindo-as para a cuvete de reação juntamente com outros constituintes da reação. O sistema realiza a quantificação sérica, por nefelometria, das seguintes proteínas: Alfa-1-antitripsina, Cadeias leve Kappa, Cadeias leve lambda, Ceruloplasmina, Fator Reumatoide e Haptoglobina.



Figura 5- Equipamento Image 800®<sup>17</sup>

### 4.2.1 Nefelometria

A taxa de nefelometria (Figura 6) mede o aumento na intensidade da luz dispersada por partículas suspensas numa cuvete. A fonte de luz para a taxa de nefelometria é um laser de 670 nm. O detetor está colocado num ângulo de 90.º respetivamente ao feixe de laser para medir a dispersão da luz.

A nefelometria é importante na determinação da concentração das diversas imunoglobulinas nomeadamente a Imunoglobulina A (IgA), Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina G (IgG). Esta quantificação define o grau de envolvimento da proteína monoclonal identificada, além de estabelecer a relação kappa/lambda, o que permite a identificação do tipo de gamapatias apresentada pelo doente.



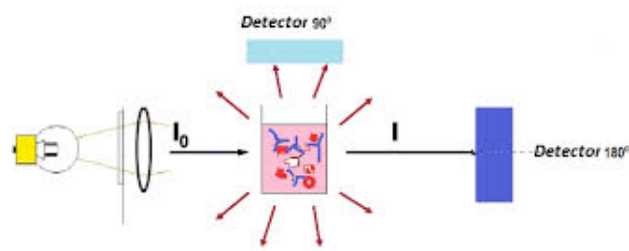


Figura 6 - Esquema representativo de Nefelometria<sup>18</sup>

#### 4.2.2 Estudo das proteínas

Uma alteração comum, relevante para o laboratório clínico, das concentrações das proteínas em doenças resulta da resposta ou reação de fase aguda, uma resposta inespecífica a inflamação (infecções, doenças autoimunes, etc.) ou lesão tecidual (trauma, cirurgia, infarte de miocárdio ou tumores). As proteínas afetadas são conhecidas como proteínas de fase aguda (PFAs).<sup>19</sup>

As PFAs estão envolvidas em diversas atividades relacionadas com a defesa, como inativação de enzimas proteolíticas, prevenção da distribuição de agentes infecciosos (destruição de microrganismos ou adequação de células microbianas à modificação de alvos de superfície) e restauração de tecido lesionado e condição saudável.<sup>20</sup>

As PFAs dividem-se em dois grupos, as que aumentam de concentração (PFAs positivas), como por exemplo, a Haptoglobina, Ceruloplasmina, Alfa-1-antitripsina; e as que diminuem de concentração (PFAs negativas), como a albumina e globulina.

O objetivo da avaliação laboratorial é demonstrar a presença, a quantidade e o tipo de alteração na proteína presente no soro e/ou na urina através do estudo do perfil proteico, quantificação das imunoglobulinas/cadeias leves e o estudo do componente monoclonal (Imunofixação).

No estudo das PFAs aplica-se a quantificação sérica por técnica de nefelometria das seguintes proteínas: Alfa-1 antitripsina, cadeias leves kappa e lambda, ceruloplasmina, fator

reumatoide e haptoglobina.

O estudo das gamopatias monoclonais inclui a eletroforese de proteínas séricas, doseamento de imunoglobulinas, das cadeias leves e a imunofixação que permite classificar, segundo a classe, se a imunoglobulina é secretada em excesso.

### **Alfa-1- antitripsina**

A alfa-1- antitripsina é um inibidor da proteinase com a função primária de inibir enzimas proteolíticas como a elastase neutrofílica. Por isso, desempenha um papel na manutenção da estrutura vascular.<sup>21</sup>

A Alfa-1 Antitripsina é uma das principais proteínas séricas na circulação. É principalmente produzida por hepatócitos, embora outras células também possam expressá-la.<sup>22</sup>

### **Cadeias Leves Kappa/Lambda**

A quantificação das cadeias leves Kappa e lambda permitem analisar o grau de envolvimento de uma proteína monoclonal, bem como estabelecer a relação entre elas, permitindo uma maior precisão na avaliação do diagnóstico e também no tratamento do doente.

### **Ceruloplasmina**

A ceruloplasmina (CP) é o principal transportador de cobre no plasma humano. Embora a CP seja sintetizada predominantemente no fígado, outros tipos de células expressam a proteína. A CP é uma proteína multifuncional. A sua função dependerá das mudanças nas condições fisiológicas e patológicas presentes no organismo frente a uma determinada situação.

### **Factor Reumatóide**

O fator reumatoide (FR) é um anticorpo que reconhece a porção de Fc de moléculas de IgG assim como seus antígenos. O FR pode ser de qualquer isótipo de imunoglobulina (IgM, IgG, ou imunoglobulina E (IgE)). O mais quantificado em clínica é o fator reumatóide de IgM.

## Haptoglobina

A Haptoglobina (HP) é uma proteína plasmática abundante que protege o dano oxidativo mediado pela hemoglobina extracorpúscular.<sup>23</sup>

A biossíntese da haptoglobina ocorre não apenas no fígado, mas também no tecido adiposo e no pulmão, fornecendo atividade antioxidante e antimicrobiana. As alterações nas concentrações medidas de haptoglobina no soro podem ajudar na avaliação do estado inflamatório ou infeccioso dos doentes. A função biológica mais importante da haptoglobina consiste nas respostas de defesa do hospedeiro à infecção e inflamação, agindo como um antagonista natural da ativação do recetor-ligando do sistema imunológico.<sup>24 25</sup>

### 4.3 Analisador Minicap®

O equipamento Minicap® (Figura 7) é um sistema de eletroforese capilar automatizado que permite realizar automaticamente todas as sequências da electroforese, desde o tubo da colheita até à obtenção da amostra, diluição, lavagem de capilares, injeção da amostra nos capilares, migração, deteção, tratamento dos resultados e transmissão informática dos resultados obtidos utilizando dois tubos capilares.

O Minicap® é composto por um carrossel de amostras, uma unidade de análise, um compartimento de reagentes, uma unidade de controlo e o respetivo *software* de processamento de dados. Cada amostra de soro é misturada com anti-soros individuais, mais especificamente, anti-cadeias pesadas gama (IgG), anti-cadeias alfa (IgA), anti-cadeias pesadas  $\mu$  (IgM) e cadeias leves Kapa e cadeias leves lambda (livres e ligadas), respetivamente.

As proteínas, separadas em capilares de sílica, são detetadas diretamente pela sua absorvância a 200 nm. A presença de reações específicas com as proteínas é detetada através da análise visual dos diagramas eletroforéticos.



Figura 7 -Analizador Minicap<sup>®26</sup>

#### 4.3.1 Eletroforese e o Perfil Proteico

O sistema Minicap<sup>®</sup> utiliza o princípio da electroforese capilar em solução livre. Através desta técnica, as moléculas carregadas eletricamente são separadas em função da sua mobilidade eletroforética num regulador de alcalinidade com um pH específico. A separação também ocorre em função do pH do eletrólito e do fluxo eletro-osmótico.

A electroforese de proteínas é uma técnica utilizada quotidianamente pelos laboratórios de análises clínicas para identificar alterações de hiperprodução ou deficiências de proteínas e fenótipos característicos de patologias graves.

Na eletroforese de proteínas, dois grandes grupos de proteínas podem ser distinguidos: albumina (50-70% do soro total por peso) e globulinas (principalmente IgG em indivíduos saudáveis). A albumina tem a maior carga negativa e vai ter o maior deslocamento de todas as proteínas. Cinco bandas distintas podem ser apreciadas em eletroforese de zona: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama. Às vezes, áreas distintas podem ser visualizadas na fração beta, que pode ser subdividida em componentes beta-1 e beta-2. A maioria das imunoglobulinas (IgM, IgG, IgD e IgE) existem na região gama (Figura 8).<sup>27</sup>

O objetivo da avaliação laboratorial é demonstrar a presença e o tipo de proteína no soro e/ou na urina através de eletroforese de proteínas e imunofixação. O proteinograma é considerada um método de triagem para a presença do componente monoclonal. Atualmente, a imunofixação é realizada para confirmar a presença do componente monoclonal e caracterizá-lo.

Caso seja detetado um pico monoclonal na eletroforese é efetuado um estudo com anticorpos específicos para a identificação das frações anormais através da imunoeletrofixação. A imunoeletrofixação consiste na classificação eletroforética das cadeias pesadas (IgG, IgA, IgM) e das cadeias leves (Kappa e Lambda) das imunoglobulinas.

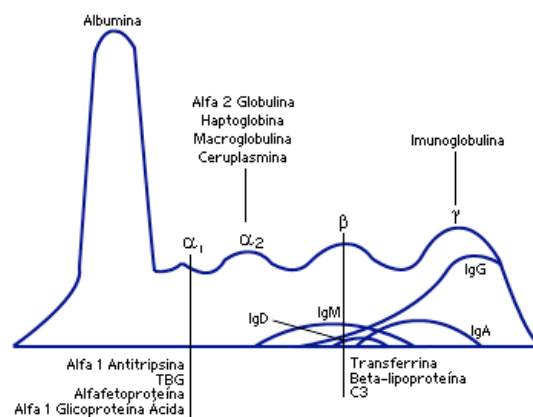


Figura 8 - Perfil eletroforético das principais proteínas encontradas em cada banda.<sup>28</sup>

A albumina é a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas.<sup>29</sup> A banda correspondente à albumina está relacionada com nefropatias e com patologias hepáticas. Nestas situações, a concentração da albumina está diminuída devido à diminuição da sua produção e ao aumento da excreção. Eventualmente, se existir um aumento desta banda poderá ser devido a situações de desidratação.

As  $\alpha$ -Globulinas são constituídas maioritariamente por  $\alpha$ 1-antitripsina, sendo também composta por outras proteínas como a  $\alpha$  fetoproteína e a  $\alpha$  glicoproteína ácida. O aumento desta banda ocorre geralmente em processos inflamatórios e infecciosos. Caso ocorra um isolamento individual de cada uma destas proteínas, a interpretação será bastante difícil

sendo necessário recorrer a mais testes específicos.

A banda  $\alpha$ 2-Globulinas é constituída por uma variedade de proteínas de fase aguda (haptoglobina, macroglobina, ceruloplasmina), sendo que um aumento destas proteínas pode surgir em casos de infeção ou inflamação.

A fração B-Globulinas é constituída pelas seguintes proteínas: a transferrina, a beta-lipoproteína e o componente C3 do complemento. O aumento de cada uma delas está relacionado com diversas patologias. Por exemplo, no caso da transferrina, pode sugerir uma anemia por deficiência de ferro.

A banda das Gama-Globulinas é constituída Igs. As Igs são anticorpos produzidos pelos linfócitos B com a função de reconhecer e destruir antígenos para que sejam fagocitados ou eliminados. Existem cinco diferentes classes de Igs que são a imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina D(IgD); Imunoglobulina G(IgG); Imunoglobulina E(IgE) e a imunoglobulina M(IgM).

Uma deficiência de anticorpos pode levar a infeções frequentes e recorrentes.

#### **4.4 Analisador VIDAS®**

O equipamento VIDAS® (Figura 9) é um sistema de imunodiagnóstico destinado a executar ensaios imunológicos. O analisador está dividido em cinco secções separadas contendo cada uma seis ensaios. O fluxo de trabalho consiste na criação de pedidos de análises, na realização de calibrações e controlos e por fim na realização dos ensaios.

O analisador utiliza a técnica ELFA (Ensaio fluorescente ligado à enzima) que é adaptável a uma variada gama de ensaios combinado o método EIA (ensaio imunoenzimático) com uma leitura final por fluorescência. A enzima utilizada é a fosfatase alcalina e o substrato é 4-Metil-Umbeliferil fosfato (4-MUP) hidrolisado em 4-metil-umbeliferona, que gera fluorescência aos 450 nm, após excitação a 350nm.

A detecção das IgM anti-CMV e IgG anti-CMV é útil no diagnóstico das infecções primárias recentes, particularmente na mulher grávida. O método utilizado é o imunoensaio enzimático, tipo *sandwich*, com detecção final por fluorescência.

A quantificação EBV VCA/EA IgG e EBV EBNA IgG é feita pelo método ELFA e EBV VCA IgM associa o método imunoenzimático por imunocaptura com uma detecção final por fluorescência.



Figura 9 - Equipamento VIDAS® 30

#### 4.4.1 Estudo de infecções víricas

Os vírus são basicamente constituídos por ácido nucleico que, dependendo do tipo de vírus, pode ser o DNA ou RNA. No SPC realiza-se a quantificação do citomegalovírus (CMV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) através do método imunoenzimático tipo *sandwich* com detecção final por fluorescência.

O CMV pode ser a causa de patologias graves, tanto na criança como no adulto. O CMV pode persistir no organismo de uma pessoa infetada durante anos e causar infecções recorrentes ou ser transmitido a outras pessoas. É um vírus facilmente transmitido, sendo maioritariamente através de saliva, objetos contaminados, tosse.

O vírus EBV designado também por HHV (*Human Herpes Virus 4*) é ubiquitário. Foi identificado como o agente causador da mononucleose infecciosa (MNI). A transmissão faz-se principalmente através da saliva. Com efeito, a replicação EBV tem lugar ao nível do epitélio

orofaríngeo onde os viriões são libertados na saliva a partir de linfócitos B infectados.

O diagnóstico da MNI baseia-se principalmente em sintomas clínicos (anginas, febre e linfadenopatia). A serologia é utilizada para confirmar o diagnóstico de MNI.

#### 4.5 Analisador ImmunoCap 250®

O analisador ImmunoCap 250® (Figura 10) é utilizado para a realização dos testes de alergia e autoimunidade. Utiliza o método de FEIA para os testes de IgE total e IgE específica, e para os testes de autoimunidade utiliza o método de fluorescência indireta (IFI) e métodos imunoenzimáticos (FEIA, e ELISA, *enzyme-linked immunoabsorbent assay*).



Figura 10 - Equipamento ImmunoCap 250®<sup>31</sup>

##### 4.5.1 Autoimunidade

Doenças autoimunes são doenças nas quais a ativação imunológica disfuncional resulta em respostas imunológicas patológicas que têm como alvo auto-antígenos celulares ou específicos de órgãos.<sup>32</sup>

Os estudos de autoimunidade realizam-se através da detecção, caracterização e quantificação de auto-anticorpos importantes para o diagnóstico, prognóstico, avaliação da resposta terapêutica e monitorização da atividade de doenças autoimunes.

Na detecção e quantificação de autoanticorpos são utilizados métodos imunoenzimáticos e de



IFI, recorrendo a vários substratos e conjugados. Na confirmação de um resultado de auto-anticorpos é realizado primeiro um teste de rastreio (IFI) e depois um teste confirmatório (Método de ELISA).

O estudo da autoimunidade é realizado por etapas, mais concretamente, uma fase inicial de pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) e anticorpos *double-stranded* (dsDNA) pelo método IFI em que são utilizadas células epiteliais humanas obtidas a partir do carcinoma da laringe (HEp-2). Na segunda fase, depende do resultado dos ANAs, ou seja, caso sejam positivos, prossegue-se à pesquisa de anticorpos mais específicos.

Para a deteção de ANAs utiliza-se o teste Symphony<sup>s</sup> como auxílio no diagnóstico clínico do Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), doenças mistas do tecido conetivo e escleroderma. Caso o resultado seja positivo, é necessário efetuar um estudo mais específico recorrendo à quantificação de auto-antígenos associados (Tabela 9). Para monitorização da evolução clínica de um doente com LES é realizada a quantificação de anti-dsDN.

Tabela 9 - Autoanticorpos ANA quantificados e respetiva correlação clínica

<u>Autoanticorpos (ANA)</u>	<u>Correlação clínica</u>
Anti-Ro	LES e do Síndrome de SjÖgren
Anti-La	Síndrome de SjÖgren
Anti-ce	Escleroderma, cirrose biliar primária
Anti-scs	Escleroderma
Anti-jo	Dermatosite/Polimiosite
Anti-smd	LES

No laboratório ainda são realizados outros testes (Tabela 10).

Tabela 10 - Autoanticorpos quantificados e respetiva correlação clínica

<u>Autoanticorpos</u>	<u>Correlação clínica</u>
Anti-citoplasmáticos (ANCA)	Poliangite microscópica
Anti-peptídeo	Artrite Reumatóide
Anti-celiaca	Doença Celíaca
Anti-fosfolípido	Diagnóstico da síndrome anti-fosfolípido e avaliação de risco trombótico em doentes com LES

#### Ensaio fluoroenzimático (FEIA)

É um método imunoenzimático para a determinação quantitativa ou qualitativa de anticorpos (IgG, IgM, IgA) específicos de antígeno, no *Immunocap 250®*, em que a ação enzimática é revelada pela formação de um produto fluorescente.

O antígeno correspondente ao anticorpo específico a ser determinado, está ligado à fase sólida (revestindo os poços, contidos em canetas). Se existirem anticorpos na amostra do doente, estes irão ligar-se ao antígeno respetivo. Após a lavagem e eliminação dos anticorpos não ligados, procede-se à adição do conjugado, anti-imunoglobulina humana (IgG), originando um complexo. Após a incubação, o conjugado não ligado é lavado e eliminado e o complexo fixado é incubado com uma solução de desenvolvimento. Após a paragem da reação, procede-se à leitura da fluorescência, num fluorímetro. Quanto mais elevado for o valor da resposta, maior a concentração de anticorpos específicos presentes na amostra.

#### 4.5.2 Alergologia

A alergia é uma reação de hipersensibilidade imediata após a exposição a um alérgeno. Existe uma variedade de alérgenos, por isso é necessário saber quais são os responsáveis nas

reações alérgicas de cada indivíduo.

Para o estudo de alergias é efetuado um rastreio inicial que consiste na quantificação de IgE específica para um conjunto de alérgenos inalantes (Phadiatop®) e para uma mistura de alérgenos alimentares (Fx5). Em caso de resultado positivo em qualquer destes testes, realiza-se a quantificação de IgE específica para uma variedade de alérgenos inalantes e alimentares.

O Fx5 como teste de rastreio alimentar contém os seguintes alérgenos: clara de ovo, leite de vaca, bacalhau, trigo, amendoim e soja. Caso o doente mantenha sintomas gastrointestinais ou eczema será necessário quantificar a IgE específica a determinados alimentos: f245 (ovo); f44 (morango); f93 (cacau). Se após um *screening* utilizando Phadiatop® o doente apresentar resultado positivo e sintomas respiratórios então será necessário a pesquisa de IgE específica para alérgenos inalantes, como por exemplo, gx2 (gramíneas), d1 e d2 (ácaros) e i6 (barata)).

Este método é um ensaio qualitativo para a identificação de indivíduos atópicos.

A quantificação de IgE total realiza-se na suspeita de uma reação de hipersensibilidade imediata. O teste é realizado no equipamento ImmunoCap 250® utilizando o método de FEIA. A concentração sérica de IgE encontra-se significativamente elevada na maior parte dos doentes com doenças alérgicas (asma extrínseca, febre dos fenos ou eczema atópico).

#### **4.6 Métodos Rápidos utilizados em Serologia**

A serologia é a parte da imunologia que estuda as infeções causadas por determinados microrganismos. O princípio baseia-se na determinação da concentração ou quantidade de anticorpos gerado pelo sistema imunitário contra antígenos específicos. Os testes serológicos dependem do tipo de reação anticorpo-antígeno.

A reações de aglutinação baseiam-se na agregação e sedimentação dos elementos referidos

em suspensão num meio aquoso, permitindo efetuar a pesquisa e a semiquantificação de antígenos ou anticorpos presentes nas amostras biológicas. As partículas ou suportes inertes (ex: eritrócitos, látex ou partículas de poliestireno, gelatina-GPA e bentonite-BFT) revestidos ou sensibilizados com anticorpo ou antígeno, polimerizam-se na presença dos seus homólogos, tornando a reação visível como a floculação.

As reações de aglutinação são métodos imunológicos que incluem, fundamentalmente, em dois grandes grupos:

- a) Reações em que os antígenos e os anticorpos reagem entre si, não necessitando de partículas reveladoras para identificar a formação dos imunocomplexos (Reação de Wright).
- b) Reações em que são incorporadas partículas inertes, homogêneas e estáveis que transportam antígenos puros ou anticorpos específicos e permitem respetivamente, a visualização macroscópica dos imunocomplexos (RPR, Paul-Bunnet).

Estas reações são usadas principalmente para efetuar a determinação semi-quantitativa das concentrações de anticorpos contra microrganismos responsáveis por infeções e presentes nas amostras biológicas (exemplo: soro/plasma, líquido, urina, etc...)

No SPC são realizados os seguintes testes:

**RPR (*Rapid Plasma Reagin*)** - Teste de floculação não treponema macroscópico para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos para o antígeno VDRL (num diagnóstico de suspeita de sífilis) em soro ou plasma humano.

**Reação de Paul-Bunnet** - Teste de aglutinação para a deteção qualitativa dos anticorpos heterófilos associados à mononucleose em soro humano.

**Reação de Wright** - Teste de rastreio ao diagnóstico da brucelose aguda por pesquisa de aglutininas por reação de aglutinação direta com a suspensão de antígeno.



## 5. Bioquímica

A bioquímica é estudada para compreender a interação entre nutrição, metabolismo na saúde e doença.<sup>33</sup>

As análises bioquímicas são extensivamente utilizadas na medicina, tanto em relação a doenças que têm base metabólica, como naquelas em que as alterações bioquímicas são consequências da própria doença. Os usos principais da investigação bioquímica são para diagnóstico, prognóstico, monitorização e deteção.<sup>34</sup>

O setor de Bioquímica tem a coordenação do Dr. Ricardo Carneiro, especialista em Patologia Clínica e está equipado com 2 analisadores automáticos (Unicel DxC 880i) que estão diferenciados como sendo: um de rotina (38) e outro de urgência (65). Ambos utilizam a tecnologia de quimioluminiscência com micropartículas, espectrofotometria, turbidimetria e potenciometria (Método de Eléctrodo do ião seletivo). Para além desse equipamento, o laboratório conta também com os equipamentos ADAMS A1C HA-8160® que utilizam o método de HPLC (*High performance liquid chromatography*) por cromatografia de troca iónica e o AQT 90 Flex que utiliza o método de Fluorimetria de Resolução Temporal (TRF) (Imunoensaio por deteção por fluorescência). Este último encontra-se na secção de Hematologia por uma questão logística.

A Bioquímica é responsável por uma grande variedade de análises (Tabela 11), com estes parâmetros bioquímicos permitem esclarecer o estado funcional de vários órgãos e vias metabólicas. É também automatizado sendo por isso um dos setores mais exigente requerendo um ritmo mais rigoroso. O soro é a amostra principal, mas também é utilizado sangue total, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) que são colhidas para tubo sem anticoagulante e com gel separador, à exceção da hemoglobina glicosilada em que a colheita é feita para um tubo com EDTA K3. O sangue total é centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos.

Neste setor acompanhei todo o circuito analítico desde o processamento de amostras (recolha dos tubos, triagem, centrifugação e a respetiva programação), funcionamento e manutenção dos equipamentos, preparação de reagentes e reconstituição de controlos e calibradores e a respetiva programação. Neste capítulo irei descrever os equipamentos e as metodologias analíticas e também alguns dos parâmetros analíticos que são efetuados nesta secção.

## 5.1 Unicel DxC 880i®

A estação de trabalho integrada Unicel DxC 880i (Figura 11) combina, um analisador de Imunoquímica (*Dxl800*), um analisador de Bioquímica (*DxC800*) e um UCTA (*Universal close tube aliquoter*) Unicel num único sistema integrado.

O analisador DxC realiza a quantificação *in vitro* de diversas amostras biológicas e fármacos. É constituído por três sub-sistemas: modular (albumina, proteínas totais, creatinina glicose, fósforo e ureia), fotométrico (restantes químicas) um módulo de iões ISE (iões: Sódio, potássio, cálcio, cloro).

O analisador Dxl é um sistema automático que realiza uma ampla variedade de imunoensaios em amostras de fluídos biológicas trabalhando com alíquotas.

O UCTA, separador de alíquotas em tubo fechado, é o ponto de entrada da amostra na estação integrada.

O UCTA Unicel é um separador de alíquotas da amostra em que primeiro lê a identificação da amostra de cada tubo, cria a alíquota se a amostra tem de ser processada no Dxl, e transfere o tubo com a amostra ao DxC para qualquer processamento adicional.



Figura 11 - Equipamento *Unicel DxC 880i*<sup>35</sup>

### 5.1.1 Quimioluminescência

A Quimioluminescência é método imunológico que tem por objetivo a quantificação de antígeno ou anticorpos em amostras biológicas baseado na emissão de luz por moléculas nos estados excitados produzidos por uma reação química de oxidação-redução.<sup>36</sup> Este método tem como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade sendo rápido e automatizado.

No laboratório são quantificados por quimioluminescência, os antígenos oncofetais, os marcadores tumorais e o antígeno específico da próstata.

### 5.1.2 Espectrofotometria

Método com base no estudo da interação de diferentes tipos de radiação com as soluções em análise. O princípio é medir a intensidade da luz absorvida ou transmitida em comprimento de onda selecionados à medida que passa pela solução, sendo os analitos identificados através de espectros característicos (ultravioleta, visível ou infravermelhos) (Figura 12).



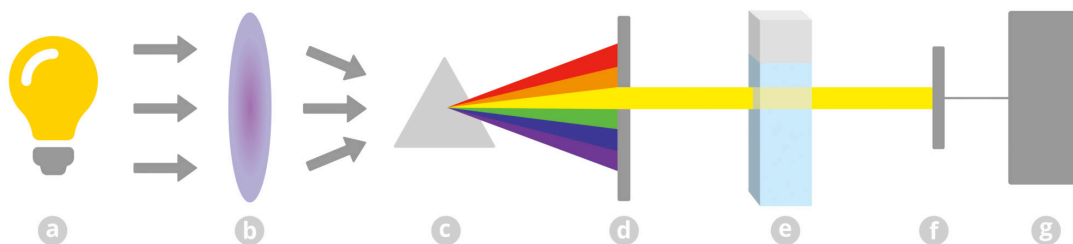


Figura 12 - Espectrofotometria<sup>37</sup>

Legenda: a- Fonte de luz b- Colimador c- Prisma ou rede de difração d- Fenda seletor e- cuvete com solução f-detetor g- leitor

Por espectrofotometria são realizadas as análises aos seguintes parâmetros: colesterol total, colesterol associado às lipoproteínas de elevada Densidade (HDL), ureia, amílase, lipase, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), GamaGlutamilttransferase ( $\gamma$ -GT), Fosfatase Alcalina (ALP), bilirrubina total (TBIL) e bilirrubina direta (DBIL).

### 5.1.3 Turbidimetria

Técnica que permite medir a diminuição da intensidade da luz através de partículas dispersas na solução para determinação da concentração da amostra em estudo dependendo do tamanho e da quantidade de partículas. As medições são efetuadas a  $0^\circ$  a partir do feixe incidente, tendo como fonte de luz um díodo emissor de luz (LED) com um comprimento de onda definido (Figura 13).



Figura 13 - Turbidimetria<sup>38</sup>

### 5.1.4 Potenciometria

A potenciometria consiste na medição da diferença de potencial elétrico de uma célula eletroquímica entre dois elétrodos (elétrodo de referência e elétrodo da amostra). Os iões são determinados por este método.

### 5.2 AQT 90 Flex®

O analisador AQT90 Flex (Figura 14) é totalmente automático e de acesso permanente, utilizando a tecnologia de imunoensaio e de deteção fluorométrica de resolução temporal para alta sensibilidade em amostras de sangue total ou plasma.

É operado através de um ecrã tátil. Desempenha todos os passos do ensaio automaticamente e reporta resultados quantitativos. As amostras de sangue não requerem preparações adicionais e são introduzidas com tubos de vácuo convencionais, sem risco de contaminação.

No laboratório é utilizado para a determinação quantitativa do pró-peptídeo natriurético do tipo B, porção N terminal (NT-proBNP) que é indicado para auxílio no diagnóstico de insuficiência cardíaca.



Figura 14 - Equipamento AQT 90 Flex®

### 5.3 ADAMS A1C HA-8160®

O ADAMS A1c ® HA-8160® da ARKRAY (Figura 15) é um analisador automático que quantifica a

fração A1C da hemoglobina (Hb) por HPLC. A coluna cromatográfica é composta por uma resina de troca iônica de carácter catiónico de fase reversa. É o teste mais indicado no controlo da glicémia e na quantificação do risco de complicações crónicas em doentes diabéticos. Esta técnica apresenta uma elevada resolução de variantes de Hb, o ensaio é relativamente rápido e a quantificação de frações de Hb é exata.

A cromatografia é um método de separação baseado em diferentes interações dos compostos com uma fase móvel (líquido ou gás) e uma estacionária (líquida ou sólida) à medida que o composto atravessa um meio de suporte. A HPLC apresenta uma alta resolução, sensibilidade e uma eficiência devido à capacidade de realizar separações e análises quantitativas, consoante as diferentes estruturas moleculares e grupos funcionais de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, num período de tempo reduzido.



Figura 15 - Equipamento A1C HA-8160<sup>®39</sup>

## 5.4 Parâmetros da Bioquímica

### 5.4.1 Metabolismo dos hidratos de carbono

A *Diabetes mellitus* (DM) é uma das patologias crónicas mais prevalentes no século XXI, constituindo uma doença metabólica com consequências vasculares por aceleração dos processos ateroscleróticos. Caracterizada pela incapacidade de produção ou utilização de insulina, e consequente hiperglicemia e insulinopenia, a DM provoca diversas complicações microvasculares, tais como retinopatia e nefropatia, e macrovasculares, incluindo enfarte

agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, as quais põem em causa a qualidade e expectativa de vida da pessoa com diabetes.<sup>40</sup>

Os principais parâmetros analíticos para o diagnóstico e para a monitorização da eficiência da terapia e do controlo dietético durante o tratamento da DM são a glicemia, a prova de tolerância à glicose, hemoglobina glicosilada e insulina.

#### 5.4.2 Ionograma

O ionograma permite determinar a concentração dos principais iões presentes no organismo, como o cloro ( $\text{Cl}^-$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) (Tabela 11). Por isso é importante realizar o estudo do equilíbrio hidroeletrólítico para avaliação dos níveis dos eletrólitos que têm um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do organismo.

Tabela 11 - Valores de referência e valores críticos de um ionograma por método potenciométrico

<u>Método</u>	<u>Analito</u>	<u>Valor de referência</u> <u>(mmol/L)</u>	<u>Valor crítico</u> <u>(mmol/L)</u>
Potenciometria	$\text{Na}^+$	135-145	<120 e >160
	$\text{K}^+$	3,5-5,0	<2,8 e >6,5
	$\text{Cl}^-$	95-100	<80 e >120

#### 5.4.3 Metabolismo de lípidos

Os lípidos têm um papel fulcral no nosso metabolismo, sendo importantes constituintes das membranas biológicas, na síntese de hormonas e como principal fonte de energia.

No estudo do metabolismo dos lípidos avaliam-se o colesterol total, HDL e triglicéridos por ensaios colorimétricos. O colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é quantificado por um método indireto, recorrendo à equação de Friedwald.

$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicerídeos}/5] \text{ (mg/dl)}$

#### 5.4.4 Função Renal

Os rins como órgãos vitais têm um papel muito importante no organismo. São responsáveis por produção e excreção da urina e outros metabolitos, homeostase do organismo através da regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, do equilíbrio ácido-base e ainda na síntese de hormonas.

A avaliação da função renal é maioritariamente utilizada para o diagnóstico e controlo de doenças renais, bem como os equilíbrios ácido-base e hidrolítico. No laboratório são efetuadas várias análises para o estudo da função renal como: creatinina, taxa de filtração glomerular, ureia e ácido úrico (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de referência por método colorimétrico e enzimático dos analitos: creatinina; ácido úrico e da ureia

<u>Método</u>	<u>Analito</u>	<u>Valor de referência(mg/dL)</u>
Colorimétrico	Creatinina	<1,3 (adultos,soro)
Colorimétrico	Ácido úrico	2,4-5,7 (soro)
Enzimático	Ureia	10-50

#### 5.4.5 Função Hepato-biliar

O fígado é o maior órgão interno e glândula do organismo tendo um papel muito importante no metabolismo. É responsável por várias funções como por exemplo: metabolização de nutrientes digeridos (gorduras, proteínas, glicose) e substâncias tóxicas (drogas, álcool, fármacos, toxinas), produção da bÍlis e de substâncias essenciais (vitaminas e ferro). O controlo da função hepática é realizado através dos seguintes parâmetros: AST, ALT, γ-GT,

ALP, TBIL e DBIL (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de referência e respectivo método dos analitos na avaliação da função hepato-biliar

<u>Método</u>	<u>Analito</u>	<u>Valor de referência</u>
Cinético	AST	<31 (U/L)
Cinético	ALT	<37 (U/L)
Cinético	$\gamma$ -GT	<49 (U/L)
Cinético	ALP	34-104 (U/L)
Colorimétrico	TBIL	<1 (adultos) mg/dL
Colorimétrico	DBIL	<0,25 mg/dL

A quantificação de AST é utilizada no diagnóstico e tratamento de certos tipos de doenças hepáticas e cardíacas.

Análises à ALT é realizada para diagnóstico e tratamento de certas doenças hepáticas (por exemplo, hepatites virais e cirrose) e de certas doenças cardíacas.

A  $\gamma$ -GGT é realizada para auxílio no diagnóstico e no tratamento de doenças hepáticas, como a cirrose alcoólica e tumores primários e secundários do fígado.

Para diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, ósseas, da paratiróide e intestinais realiza-se análise à fosfatase alcalina.

A TBIL é quantificada no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas hemolíticas, hematológicas e metabólicas, incluindo hepatite e bloqueio da vesícula biliar.

A quantificação de DBIL é utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, hemolíticas, hematológicas e metabólicas, incluindo hepatite e bloqueio da vesícula biliar.

#### 5.4.6 Função pancreática

O pâncreas tem duas funções principais: exócrina (produção de enzimas) e endócrina (produção de hormonas). A insuficiência pancreática surge da incapacidade de produção e/ou transporte das enzimas digestivas suficientes para que ocorra uma correta absorção intestinal dos nutrientes. No laboratório efetua-se a análise da enzima amilase pancreática que é sobretudo utilizada no diagnóstico e tratamento da pancreatite e a lipase em doenças do pâncreas (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de referência e método da amilase e lipase

<u>Método</u>	<u>Analito</u>	<u>Valor de referência(U/L)</u>
Cinético	Amilase	28-100 (soro)
Cinético	Lipase	22-51

#### 5.4.7 Marcadores cardíacos

Os marcadores cardíacos apresentam um papel importante no diagnóstico e monitorização de síndromes coronárias agudas, como o enfarte agudo do miocárdio (EAM).

O laboratório utiliza como biomarcadores a troponina, a creatinaquinase (CK), a creatinaquinase MB (CK-MB), mioglobina e ainda efetua a quantificação de NT-proBNP que permite avaliar o risco de doentes em que há suspeita de insuficiência cardíaca.

#### 5.4.8 Metabolismo ósseo

O osso desempenha funções muito importantes no corpo humano como a sustentação e movimentação do corpo, a proteção de estruturas vitais (cérebro, coração, pulmões) armazenamento de sais, como o cálcio, e o suprimento contínuo de células sanguíneas novas

(hematopoiese).

No laboratório para a avaliação do metabolismo ósseo efetuam-se análises ao fósforo, cálcio e cálcio ionizado, magnésio e paratormona.

#### **5.4.9 Metabolismo do ferro**

O ferro é um elemento vital para o organismo servindo como cofator de muitas enzimas e proteínas. É fundamental no transporte de oxigénio, no metabolismo de oxidação celular e na síntese de DNA. É utilizado principalmente na síntese da hemoglobina nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado.

A desregulação do metabolismo ferro contribui para diversas patologias, sendo essencial para o diagnóstico de anemia.

Níveis inadequadamente baixos ou altos de ferro são prejudiciais e contribuem para uma ampla gama de doenças.<sup>41</sup>

Os principais distúrbios associados ao metabolismo do ferro são: deficiência e excesso de ferro. Os parâmetros analíticos quantificados no laboratório para um estudo bioquímico de anemias são: ferro, ferritina, transferrina, capacidade total de fixação do ferro (CTFF), vitamina B1 e o ácido fólico.

#### **5.4.10 Marcadores tumorais**

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a génese e o crescimento de células neoplásicas.<sup>42</sup>

No laboratório são quantificados os seguintes marcadores tumorais: Alfafetoproteína (AFP), Antígeno Carcinoembrionário (CEA), *Cancer Antigens* (CA) 125, CA 15.3, CA 19-9 e Antígeno Específico da Próstata (PSA) (Tabela 15).



Tabela 15 - Marcadores tumorais e respectivos analitos

<u>Descrição</u>	<u>Analito</u>	<u>Na suspeita de Tumor</u>
Antigénios Oncofetais	AFP	Cancro hepático
	CEA	Inespecífico
Marcadores de Glúcidos	CA 15.3	Carcinoma da mama
	CA 125	Cancro do ovário
	CA 19.9	Cancro colo-retal e carcinoma pancreático
Antigénio Específico da próstata	PSA total	Cancro da próstata
	PSA livre	

#### 5.4.11 Outros parâmetros analíticos de interesse

Dentro de outros parâmetros analíticos relevantes, encontramos os valores de referência das hormonas no estudo da fertilidade (Tabela 16).

## Hormonas da Fertilidade

Tabela 16 - Analitos e respectivos valores de referência das hormonas no estudo da fertilidade

<u>Estudo da fertilidade</u>	
Analito	Valores de referência
Estradiol	Mulher:19,5-144,2 pg/mL (fase folicular); 63,9-356,7 pg/mL (meio do ciclo); 55,8-214,2 pg/mL (fase luteínica); 0-32,2 pg/mL (pós-menopausa); Homem: 0-39,8 pg/m
Hormona Gonadotrofina Coriônica Humana-BhCG	
hormona Folículo-estimulante -FSH	Mulher: 2,5-10,2 UI/L (fase folicular); 3,4-33,4 UI/L (meio do ciclo); 1,5-9,1 UI/L (fase luteínica); < 0,3 UI/L (gravidez); 23,0-116,3 UI/L (pós-menopausa)
Hormona Luteinizante LH	Mulher: 1,9-12,5 UI/L (fase folicular); 8,7-76,3 UI/L (meio do ciclo); 0,5-16,9 UI/L (fase luteínica); <0,1-1,5 UI/L (gravidez); 15,9-54,0 UI/L (pós-menopausa)
Progesterona	Mulher adulta: < 1,40 ng/mL (fase folicular); 3,34-25,56 ng/mL (fase luteínica); < 0,73 (pós-menopausa); ng/m
Prolactina	2,8-29,2 ng/mL (não grávida); 9,7-208,5 ng/mL (grávida) 1,8-20,3 ng/mL (pós-menopausa)
Testosterona	Mulher: 14-76 ng/dL Momem: 241- 827 ng/dL

### **Fármacos e drogas de abuso**

São efetuadas análises também a fármacos e drogas de abuso, entre as quais: gentamicina, vancomicina, a anti-convulsivantes como o valproato, carbamazepina, fenitoina e fernerbital.

Ainda são realizadas outras análises em diferentes contextos clínicos como o cortisol, interleucina-6 e a vitamina D.

### **Análise de urina**

A urina tipo II, também chamada de sumária permite analisar as características físicas e químicas da urina e ainda fazer uma avaliação ao microscópico do sedimento urinário.

A urina tem como principal função a excreção de produtos tóxicos do organismo. A análise à urina torna-se importante para obter informações sobre o estado fisiológico e patológico do organismo, sobre a função renal e avaliar certos tratamentos.

O exame químico é feito automaticamente no equipamento Aution Max-AX-4280<sup>®</sup> (Figura 16), que está conectado, fisicamente e através de software, com o equipamento Sedimax<sup>®</sup> (Figura 17) que é responsável pela análise ao sedimento urinário.



Figura 16 - Analisador Aution Max-AX-4280<sup>®</sup> <sup>43</sup>



Figura 17 - Analisador Sedimax®44

Os analisadores utilizam tiras de reagentes que permitem analisar semi-quantitativamente a presença de leucócitos, proteínas, sangue, nitritos, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e determinar o pH da urina. As leituras das tiras ainda revelam informações de parâmetros como a densidade, cor e aspecto da urina. Os resultados são apresentados como negativos, positivos ou normais. O pH normal da urina deve compreender entre 4,6 e 8,0

As uroculturas são semeadas com uma ansa calibrada no meio *ChromID CPS* agar e incubadas. É efetuado um esfregaço por gota de urina corado pelo método de Gram. As culturas são observadas 24 horas depois da incubação, consoante o tipo de colônia, patologia subjacente e Gram. Por fim são feitas provas de identificação dos agentes etiológicos e de suscetibilidade aos antibióticos.

#### **Urina das 24 horas**

O exame à urina das 24 horas é uma análise da urina coletada durante o período de 24 horas para avaliação renal através da quantificação de substâncias como proteínas, sódio, cálcio, ácido úrico, citrato, potássio, oxalato e creatinina.



# Conclusão

O estágio no laboratório do CHTS permitiu aprofundar os conhecimentos adquiridos ao longo do primeiro ano do mestrado em Bioquímica, bem como obter novos conhecimentos relativamente à minha formação académica anterior. A possibilidade de acompanhar os diferentes setores do laboratório fez-me perceber que de facto a bioquímica é transversal a todas as áreas presentes.

Durante o percurso, que nem sempre foi fácil, consegui acompanhar a rotina laboratorial desde a receção da amostra percebendo a sua importância, todo o processo rigoroso analítico e a repercussão do controlo de qualidade.

Gostaria de ter completado o meu estágio com uma componente de investigação, no entanto, não foi possível pela direção do serviço de patologia devido à falta de disponibilidade e de recursos.

Este estágio foi um percurso desafiante que permitiu adquirir experiência nesta área, desenvolvendo competências no âmbito de laboratório, e perceber toda a dinâmica e importância de um serviço de Patologia Clínica no funcionamento de um hospital e no tratamento dos doentes.

Termino agradecendo a todos que me acompanharam.

# Referências:

---

<sup>1</sup> Khatri, R., K, C. S., Shrestha, P., Sinha, J.N., (2013). Implementing self sustained quality control procedures in a clinical laboratory. JNMA J Nepal Med Assoc. 52 (189) 233-7.

<sup>2</sup> Marques-Garcia, F., Garcia-Codesal, M.F., Caro-Narros, T., Contreras-SanFeliciano, T. (2015). Importance of implementing an analytical quality control system in a core laboratory. Revista de Calidad Asistencial. 30 (6) 302-309.

<sup>3</sup> Acedido em 27 de fevereiro de 2019 no website da Controllab em:  
[https://controllab.com/pdf/westgard\\_o\\_que\\_sao.pdf](https://controllab.com/pdf/westgard_o_que_sao.pdf)

<sup>4</sup> Acedido em 13 de março de 2019 no website do Hospital Universitário Onofre Lopes em:  
<http://www2.ebserh.gov.br/documents/16628/219278/Hematologia.pdf/3fcf42b9-fa82-48a3-9b8f-9d182f252f2a>

<sup>5</sup> Hofbrand, V., Moss, P.A.H. (2013). Fundamentos em Hematologia. 6.ª edição. London, UK: Artmed, pp. 3-13.

<sup>6</sup> Acedido a 12 de fevereiro de 2019 no website medicalexpo em:  
(<http://www.medicalexpo.com/pt/prod/sysmex-europe-gmbh/product-70998-624419.html>)

<sup>7</sup> Acedido a 12 de Fevereiro de 2019 no website da Sysmex em: (<https://www.sysmex.es/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/citometria-de-fluxo-com-fluorescencia.html>)

<sup>8</sup> Acedido a 12 de Fevereiro de 2019 no website da Sysmex em: (<https://www.sysmex.es/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/metodo-de-detecao-sls.html>)

<sup>9</sup> Oliveira, R. (2007). Hemograma: Como fazer e interpretar. 1.ª edição. Brasil: LMP, pp. 17.

<sup>10</sup> Acedido a 04 de março de 2019 no website da Diesse em:  
(<https://www.diesse.it/en/Instruments/id:52/>)

<sup>11</sup> Guarner J., Dolan H. e Cole L., (2015). Erythrocyte sedimentation rate: Journey verifying a new method for an imperfect test. American Journal of Clinical Pathology. 144. 536-8.

<sup>12</sup> Guarner J., Dolan H. e Cole L., (2015). Erythrocyte sedimentation rate: Journey verifying a new method for an imperfect test. American Journal of Clinical Pathology. 144. 536-8.

- 
- <sup>13</sup> Turgeon M. (2014). Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 5.<sup>a</sup> edição. St Louis, Missouri: Elsevier, 2014; pp. 2.
- <sup>14</sup> Darwish I., (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Int J Biomed Sci. 2 (3) 217-235.
- <sup>15</sup> Koivunen M., Krogsrud R., Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. Laboratory Medicine. (2006) 37 (8) 490-497.
- <sup>16</sup> Darwish I., (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Int J Biomed Sci. 2 (3) 217-235.
- <sup>17</sup> Acedido a 15 de março de 2019 no website the lab world group em:  
(<https://www.thelabworldgroup.com/beckman-coulter-immage-800-immunochemistry-analyzer>)
- <sup>18</sup> Acedido a 15 de março de 2019 no website iac internacional em:  
(<http://iacinternacional.com.ar/productos/turbopro/fundamentos-del-metodo/>)
- <sup>19</sup> J. Marshall, W., K. Bangert, S. e Lapsley, M. (2012) Clinical Chemistry. 7.<sup>a</sup> edição. London, UK: Elsevier; pp .1.
- <sup>20</sup> Roy, S., Kumar, V., Kumar, V., Behera, BK., (2017). Acute Phase Proteins and their Potential Role as an Indicator for Fish Health and in Diagnosis of Fish Diseases. Protein Pept Lett. 24 (1) 78-89.
- <sup>21</sup> Muhammad, I., Borné, Y., Östling, G., Kennbäck, C., Gottsäter, M., Persson, M., Nilsson, P. e Engström, G., (2017). Acute phase proteins as prospective risk markers for arterial stiffness: The Malmö Diet and Cancer cohort. PLoS ONE. 12 (7) e0181718.
- <sup>22</sup> Song, S. (2018). Alpha-1 antitrypsin therapy for autoimmune disorders. Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation. 5 (4) 289-301.
- <sup>23</sup> Cahill, LE., Levy, AP., Chiuve, SE., Jensen, MK., Wang, H., Shara, NM., Blum, S., Howard, BV., Pai, JK., Mukamal, KJ., Rexrode, KM e Rimm EB. (2013). Haptoglobin Genotype Is a Consistent Marker of Coronary Heart Disease Risk Among Individuals With Elevated Glycosylated Hemoglobin. Journal of the American College of Cardiology. 61 (7) 728-737.
- <sup>24</sup> Dobryszczyka, W. (1997). Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 35 (9) 647-54.
- <sup>25</sup> Dobryszczyka, W. (1997). Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 35 (9) 647-54.



---

<sup>26</sup> Acedido a 2 de abril de 2019 no website medical supply company em: (<https://www.medical-supply.ie/product/minicap/>)

<sup>27</sup> Lee, A.YS., Cassar, P.M., Johnston A.M. e Adelstein, S. (2017). Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. *British Journal of Hospital Medicine*. 78 (2).

<sup>28</sup> Acedido a 1 de maio de 2019 no website <http://rmmg.org> em: (<http://rmmg.org/artigo/detalhes/520>)

<sup>29</sup> Fanali G., Masi A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*. (33) 209-290.

<sup>30</sup> Acedido a 7 de abril de 2019 no website biomerieux em: (<https://www.biomerieux.com.br/produto/vidasr>)

<sup>31</sup> Acedido a 7 de Abril de 2019 no website da termofisher em: (<https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/lab/pt/en/tests-systems/systems/phadia-250-instrument.html>)

<sup>32</sup> Rose, N., & Mackay, I. (2014). *The Autoimmune Disease* 5.<sup>a</sup> edição. San Diego United States: Elsevier, pp 19-37.

<sup>33</sup> Baynes, J., Dominiczak, M. (2015). *Medical biochemistry*. 4.<sup>a</sup> edição. Philadelphia: Elsevier, pp. 2-3.

<sup>34</sup> Marshall, W., Bangert, S e Lapsley, M. (2012). *Química Clínica*. 7.<sup>a</sup> edição. London, UK: Elsevier, pp 1.

<sup>35</sup> Acedido a 14 de abril de 2019 no website analis em: ([http://www.analis.be/bin/site/render.cgi?id=0067024\\_item\\_to\\_sell&ln=](http://www.analis.be/bin/site/render.cgi?id=0067024_item_to_sell&ln=)).

<sup>36</sup> Burtis, C. Ashwood, E. Bruns, D. (2008). *Tietz Fundamentos da Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. 6.<sup>a</sup> edição. Missouri: Elsevier, pp. 65- 66.

<sup>37</sup> Acedido a 17 de bril de 2019 no website analis em: ([http://www.analis.be/bin/site/render.cgi?id=0067024\\_item\\_to\\_sell&ln=](http://www.analis.be/bin/site/render.cgi?id=0067024_item_to_sell&ln=))

<sup>38</sup> Acedido a 20 de abril de 2019 no website sintesis em: (<https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773284.pdf>)

<sup>39</sup> Acedido a 17 de abril de 019 no website trademed em: (<https://www.trademed.com/products/2625/Immunoassay-Analyzer.html>)

---

<sup>40</sup> Acedido a 15 de Abril de 2019 no website medwow em:

(<http://pt.medwow.com/med/glycohemoglobin-analyzer/arkray/adams-a1c-ha-8160/2962.model-spec>Acedido).

<sup>41</sup> Aguiar, C., Duarte, R. e Carvalho, D. (2019). Nova abordagem para o tratamento da diabetes: da glicemia à doença cardiovascular. *Portuguese Journal of Cardiology*. 38 (1) 53-63.

<sup>42</sup> Almeida, R., Pedrosa, N., Leite, J., Fleming, T., Carvalho, V e Cardoso, A. Tumor Markers: a Literature Review. (2007). *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53 (3) 305-316.

<sup>43</sup> Acedido a 15 de Abril de 2019 no website trademedem:

(<https://www.trademed.com/products/4947/Urine-Chemistry-Analyzer.html>)

<sup>44</sup> Acedido a 20 de abril de 2019 no website menarini diagnóstico em:

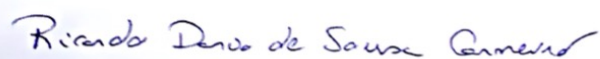
(<https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/>)

---

### **PARECER**

Virgínia Fernanda Taipa Couto, estudante do mestrado em Bioquímica, realizou o Estágio em Análises Clínicas no Centro Hospitalar do Tâmega e do Sousa, sob minha orientação, e concluiu com êxito o plano de trabalho e escrita do respetivo relatório. Assim, concordo com a entrega do relatório de estágio e sou de parecer que a Virgínia Fernanda Taipa Couto reúne todas as condições para se submeter à defesa da dissertação de mestrado.

Penafiel, 18 de Junho de 2019



Ricardo Dário Sousa Carneiro

(Patologista Clínico)

