

Catarina de Oliveira Soares

# Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida com a colaboração da Dra. Maria Beatriz Tomaz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



*“A transformação da vida realiza-se porque a vida coloca os interlocutores numa situação inteiramente nova, de homem para homem; de uma situação anterior de desconfiança, para outra de veracidade, de desinteresse, de humildade, para poder estar à escuta do outro.”*

*Joseph Cardijn*



## **Agradecimentos**

Momentos houve em que me senti desiludida e sem ânimo para terminar esta jornada.

Momentos houve em que me rejubilei com os pequenos passos que fui dando para a conclusão deste projeto.

O que sempre me fez continuar foram as pessoas a quem deixo palavras de agradecimento.

Aos meus colegas (do 2º ano e do 1º ano), pelo apoio e carinho que sempre me deram. Ao meu grupo de amigos acrescentei alguns nomes e este sempre foi um dos motivos que, nos momentos de maior desamimo, me levou a não dar por perdido o meu tempo.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pela sua disponibilidade e apoio ao longo destes dois anos.

À Dra. Maria Beatriz Tomás, que me aceitou com estagiária no *Laboratório Labeto*.

A todos os colegas do *Laboratório Labeto*, que de diferentes formas me ajudaram no meu estágio.

Aos meus amigos de sempre, deixo uma palavra ainda maior de agradecimento. Fui “beber” a cada um deles as suas melhores qualidades para conseguir concluir o Mestrado.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim. Sem o seu apoio e incentivo não teria sido possível terminar este mestrado no tempo previsto.

Ao meu irmão, pela paciência e carinho que sempre teve quando lhe pedi ajuda.

À Janine, pela disponibilidade sempre mostrada.

Aos meus sogros, que vivendo a 160 Km de distância nunca deixaram de estar presentes quando lhes pedi ajuda.

Ao meu marido Marco, companheiro na viagem da vida, por todo o amor, paciência e incentivo que sempre demonstra.

Às minhas filhas Margarida e Maria, que nasceu a meio do Mestrado. Espero compensar-vos por todo o tempo em que não estive presente, por todas as brincadeiras em que não participei, pelas visitas ao parque em que faltei, por todos os momentos em que a mãe foram os avós e o pai.



## INDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>XI</b>
<b>Resumo/Abstract</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. Caracterização do Laboratório de Estágio</b> .....	<b>I</b>
<b>2. Atividades Desenvolvidas</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Aspetos Gerais</b> .....	<b>3</b>
<u>Colheitas das amostras: Fase Pré-Analítica</u> .....	<b>3</b>
<u>Controlo de Qualidade no Laboratório</u> .....	<b>4</b>
<u>Atividades Desenvolvidas por Setor Laboratorial</u> .....	<b>6</b>
<b>2.2 Setor Laboratorial de Bioquímica Clínica</b> .....	<b>8</b>
<u>2.2.1 Equipamentos e Princípios das Metodologias Utilizadas</u> .....	<b>8</b>
<i>Equipamentos</i> .....	<b>8</b>
<i>Princípios das Metodologias Utilizadas</i> .....	<b>9</b>
<b>Turbidimetria e Nefelometria</b> .....	<b>10</b>
<b>Potenciometria</b> .....	<b>11</b>
<b>Quimioluminescência</b> .....	<b>11</b>
<u>2.2.2 Estudo do Metabolismo dos Hidratos de Carbono</u> .....	<b>11</b>
<i>Glicose</i> .....	<b>11</b>
<i>Prova de Tolerância à Glicose Oral</i> .....	<b>12</b>
<i>Hemoglobina Glicada</i> .....	<b>14</b>
<u>2.2.3 Estudo das Proteínas</u> .....	<b>15</b>
<i>Proteínas totais</i> .....	<b>15</b>
<i>Albumina</i> .....	<b>15</b>
<i>Separação das Proteínas Séricas por Eletroforese</i> .....	<b>16</b>
<i>Caraterização de banda monoclonais por eletroforese capilar</i> .....	<b>18</b>

<b>2.2.4 Avaliação bioquímica da função renal</b> .....	<b>19</b>
<i>Doseamento Sérico da Creatinina e Clearance da creatinina</i> .....	<b>20</b>
<i>Doseamento da Ureia Sérica</i> .....	<b>21</b>
<i>Doseamento do Ácido Úrico Sérico</i> .....	<b>22</b>
<i>Microalbuminúria</i> .....	<b>22</b>
<i>Análise Sumária de Urina</i> .....	<b>23</b>
<i>Cálculo Urinário</i> .....	<b>23</b>
<b>2.2.5 Avaliação da Função Hepática</b> .....	<b>24</b>
<i>Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Indireta</i> .....	<b>25</b>
<i>Enzimas</i> .....	<b>26</b>
<b>2.2.6 Avaliação da função pancreática</b> .....	<b>28</b>
<i>Amilase</i> .....	<b>29</b>
<i>Lipase</i> .....	<b>29</b>
<b>2.2.7 Determinações lipídicas e risco cardiovascular</b> .....	<b>30</b>
<i>Triglicéridos</i> .....	<b>30</b>
<i>Colesterol total</i> .....	<b>31</b>
<i>Colesterol-HDL</i> .....	<b>32</b>
<i>Colesterol-LDL</i> .....	<b>32</b>
<i>Proteína C-reativa de Alta Sensibilidade (hsCRP)</i> .....	<b>33</b>
<b>2.3 Setor Laboratorial de Imunologia</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.1 Equipamentos e Princípios das Metodologias Utilizadas</b> .....	<b>34</b>
<i>Equipamentos</i> .....	<b>34</b>
<i>Imunoensaios</i> .....	<b>36</b>
<b>Imunoensaio de precipitação</b> .....	<b>36</b>
<b>Imunoensaio de aglutinação</b> .....	<b>37</b>
<b>Imunoensaio competitivo</b> .....	<b>37</b>
<b>Imunoensaio não-competitivo</b> .....	<b>38</b>

<i>Metodologias de leitura da reacção</i> .....	39
<b>Quimioluminescência</b> .....	39
<b>ELFA - Enzyme Linked Flourescent Assay</b> .....	39
<b>2.3.2 Serologia Infeciosa</b> .....	40
<i>Técnicas manuais</i> .....	40
<b>Reacção de Waaler-Rose</b> .....	40
<b>Reacção da Rosa de Bengala</b> .....	40
<b>Reacção de Widal</b> .....	41
<b>RPR – Rapid Plasm Reagin Test</b> .....	42
<b>Reacção de Paul Bunnel</b> .....	42
<i>Serologia na Grávida – Deteção dos Agentes TORCH</i> .....	43
<b>Toxoplasmose</b> .....	43
<b>Rubéola</b> .....	45
<b>Infeção por Citomegalovírus</b> .....	46
<i>Sífilis</i> .....	48
<i>Hepatite B</i> .....	49
<i>Hepatite C</i> .....	50
<i>Vírus da Imunodeficiência Humana</i> .....	51
<b>2.3.3 Imuno-hematologia</b> .....	52
<i>Teste de Coombs Indireto</i> .....	52
<b>Conclusão</b> .....	53
<b>Bibliografia</b> .....	55



## Abreviaturas

Ac	Anticorpo	FR	Fator Reumatoide
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade	GGT	$\gamma$ -Glutamiltransferase
ACTH	Hormona Adrenocorticotrófica	GV	Glóbulos Vermelhos
ADP	Adenosina Difosfato	HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
Ag	Antigénio	hsCRP	<i>high-sensitivity</i> CRP
AgHBe	Antigénio de replicação viral do VHB	IFI	Imunofluorescência Indireta
AgHBs	Antigénio de superfície do VHB	IgA	Imunoglobulina A
ALP	Fosfatase Alcalina	IgG	Imunoglobulina G
ALT	Alanina Aminotransferase	IgM	Imunoglobulina M
Anti-HBc	Anticorpos anti-core VHB	MNI	Mononucleose Infeciosa
AST	Aspartato Aminotransferase	NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)
ATP	Adenosina Trifosfato	NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reduzida)
Col-HDL	Colesterol – <i>High Density Lipoproteins</i>	PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
Col-LDL	Colesterol – <i>Low Density Lipoproteins</i>	PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
CMV	Citomegalovírus	PTH	Paratormona
CQI	Controlo de Qualidade Interno	PPM	Partículas Paramagnéticas
CRP	Proteína C-Reactiva	RPR	<i>Rapid Plasm Reagin</i>
DGS	Direção Geral de Saúde	SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
EA	Ester de acridina	TFG	Taxa de Filtração Glomerular
EBV	Vírus Epstein-Barr	TG	Triglicéridos
EFP	Eletroforese de Proteínas	VHB	Vírus da Hepatite B
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>	VHC	Vírus da Hepatite C
ELFA	<i>Enzyme Linked Flourescent Assay</i>	VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	VLDL	Very Low Density Lipoproteins
		VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratories</i>



## **Resumo**

As análises clínicas tornaram-se fundamentais como meios auxiliares de apoio ao diagnóstico e monitorização de doentes/utentes, quer ao nível hospitalar quer ao nível de medicina de ambulatório. O relatório aqui apresentado descreve as atividades desenvolvidas durante o meu estágio curricular integrado no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no Laboratório *Labeto – Centro de Análises Bioquímicas, S.A.* de Leiria, em particular nos setores laboratoriais de Bioquímica Clínica e de Imunologia. É feita uma breve introdução ao Laboratório que me acolheu e uma breve abordagem à Fase Pré-analítica no que concerne às colheitas e ao Controlo de Qualidade aí efetuado. Após uma descrição sumária do trabalho nos diferentes setores laboratoriais, as atividades nos setores de Bioquímica Clínica e de Imunologia são descritos de modo mais detalhado. São referidos os equipamentos existentes e explicados os princípios das metodologias utilizadas e são indicados os principais parâmetros determinados com o respetivo enquadramento teórico e as metodologias de ensaios correspondentes.

## **Abstract**

This report describes the activities performed at Laboratory *Labeto – Centro de Análises Bioquímicas, S.A.*, mainly in the *Clinical Chemistry* and *Immunology* laboratorial sections. This report includes a brief introduction about the Laboratory characteristics, the pre-analytical phase (specimen collection), the Quality Control Laboratory approaches. The activities developed in the different laboratorial sections are indicate while a focus is made on those performed in the *Clinical Chemistry* and *Immunology* sections. It is indicated the main equipments and the principles of the methodologies used. It will discussed the key parameters determined with the respective theoretical framework and methodologies of corresponding tests.



## I. Caracterização do Laboratório de Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório *Labeto – Centro de Análises Bioquímicas, S.A.*, pertencente ao Grupo Beatriz Godinho, cuja Direção Técnica está a cargo da Dra. Beatriz Godinho, especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

Os *Laboratórios Beatriz Godinho – Análises Clínicas* estão organizados numa rede de postos de colheitas, pelos distritos de Aveiro, Leiria, Santarém, Coimbra, Guarda e Viseu, permitindo aos utentes uma boa acessibilidade aos cuidados de saúde que se traduz numa informação rápida e eficiente sobre o seu estado de saúde. Estes laboratórios englobam: *Labeto – Centro Análises Bioquímicas S.A.* (Leiria); *Laboratório de Análises Clínicas J. M. Chau, S.A.* (Coimbra); *SeiaLab – Laboratório de Análises Clínicas de Seia, S.A.* (Seia).

Os Laboratórios exercem a sua atividade no âmbito do Serviço Nacional de Saúde prestando serviços ao Estado Português através das Administrações Regionais de Saúde, bem como a outras entidades. Prestam também serviços a empresas no âmbito da legislação sobre Higiene e Saúde no Trabalho, bem como a qualquer utente que a eles recorram a título privado.

Os horários são diferentes de Laboratório para Laboratório, estando compreendidos entre as 7:30 h e as 19:00 h.

A parte da manhã é essencialmente dedicada à colheita de produtos para análises, destinando-se a parte da tarde à execução técnica das mesmas. No Laboratório *Labeto*, na parte da manhã, 2 ou 3 Técnicos Superiores de Análises Clínicas asseguram a preparação dos vários equipamentos (calibrações, controlos, manutenções) de forma a garantir a qualidade da execução técnica das amostras.

Nos Postos de Colheitas, tal como nos Laboratórios, as colheitas são efetuadas por técnicos competentes devidamente habilitados, com a formação e experiência adequadas.

As amostras de produtos biológicos são devidamente identificadas, utilizando etiquetas de códigos de barras e transportadas aos Laboratórios em viaturas próprias, dentro de malas isotérmicas.

A forte preocupação dos *Laboratórios Beatriz Godinho – Análises Clínicas* relativamente à qualidade dos seus serviços e à satisfação dos seus clientes, nomeadamente o Serviço Nacional de Saúde, os Utentes e outros Clientes Institucionais, levou à tomada de decisão, por parte da Administração, de implementar um Sistema de Gestão da Qualidade baseado na norma NP EN ISO 9001, nas Boas Práticas Laboratoriais e nas Normas para o Laboratório Clínico.

No Laboratório *Labeto* as diversas análises são efetuadas em diferentes setores laboratoriais organizados com as seguintes designações:

- Microbiologia
- Urianálise
- Coagulação
- Bioquímica Manual
- Hematologia
- Autoimunidade
- Biologia Molecular e Genética
- Bioquímica Clínica
- Imunologia/Endocrinologia.

Durante o meu estágio tive oportunidade de trabalhar em todos setores laboratoriais. Foi-me dada também a possibilidade de aprender a realizar colheitas de sangue.

## **2. Atividades Desenvolvidas**

O estágio englobou as atividades em todos os setores laboratoriais, com maior incidência nos da Bioquímica Clínica, da Bioquímica Manual e da Imunologia, e serão estes os que descreverei de forma mais detalhada. Incluirei a informação relativa à Urinálise no setor da Bioquímica Clínica - Avaliação da Função Renal. Em relação aos restantes setores serão apenas descritos os equipamentos utilizados e respetivos parâmetros determinados.

Os laboratórios de Análises Clínicas funcionam como um todo, correspondendo a parte laboratorial à Fase Analítica. No entanto, qualquer Técnico Superior de Análises Clínicas tem de ter em linha de conta que o resultado e qualidade do seu trabalho requerem o conhecimento de todas as fases das análises efetuadas no Laboratório. Por isso, ao longo meu estágio procurei também acompanhar e realizar tarefas correspondentes à Fase Pré-analítica e à Fase Pós-analítica. Farei uma breve referência à Fase Pré-analítica, dado que durante o meu estágio recebi formação sobre colheitas, e ao Controlo de Qualidade no Laboratório.

### **2.1 Aspetos Gerais**

#### Colheitas das amostras: Fase Pré-Analítica

A colheita, o armazenamento e o transporte representam um passo crítico na análise das amostras. Durante estas etapas as amostras devem estar sempre sob controlo a fim de evitar perdas, contaminações ou transformações até serem analisadas. Mesmo o mais sofisticado equipamento laboratorial não pode fornecer resultados válidos se a integridade da amostra estiver comprometida (1).

A colheita deve ser realizada seguindo com rigor todos os procedimentos, de modo a garantir a obtenção de um resultado fidedigno. Os produtos biológicos a colher e o método de colheita a utilizar dependem do pedido do utente, que, no Laboratório *Labeto*, dá por escrito o seu consentimento à realização das análises a efetuar.

Todas as amostras devem ser corretamente identificadas, utilizando etiquetas com códigos de barras.

As amostras cuja colheita não for da responsabilidade do Laboratório devem encontrar-se dentro dos critérios de aceitação definidos pelo Laboratório. Alguns produtos biológicos (fezes, expetoração, esperma e urina de adultos) poderão ser colhidos pelos utentes, sob a orientação (instrução) do pessoal do Laboratório.

Nos postos de colheita não podem ser efetuadas colheitas de produtos biológicos destinados a análise cuja realização deva ser imediata, ou cujo resultado possa vir a sofrer alterações com o transporte para o Laboratório (ex.: espermograma, crioglobulinas, etc.). Antes da colheita, deve confirmar-se a correta identificação do utente, no que diz respeito ao nome completo e estabelecer com ele um diálogo tranquilizante. Confirmar também se está corretamente preparado para as análises a efetuar (ex.: se está em jejum), se trouxe algum produto biológico e se este respeita os critérios de aceitação/rejeição do Laboratório. Quando o utente não reúne as condições necessárias para realizar todas as análises solicitadas, deve explicar-se ao utente a importância de cumprir todos os requisitos e aconselhá-lo a vir noutra data por forma a efetuar todas as análises no mesmo dia. Mas, se o utente preferir, pode realizar-se a colheita para as análises que reúna as condições necessárias e poderá voltar noutro dia para realizar as restantes análises.

Outro dos aspetos importantes é questionar o utente quanto à medicação (mesmo que já tenha sido questionado na receção do Laboratório) e quanto a outros factos que permitam reconstituir uma breve história clínica relevante na interpretação dos resultados (durante a fase da validação dos resultados). No Laboratório *Labeto* estas informações são anotadas na requisição, a lápis. Depois é realizada a colheita de acordo com o tipo de análise pedida. Caso seja o utente a realizar a colheita, o técnico deverá instruí-lo do modo como deve proceder à recolha e fornecer toda a informação necessária.

A maioria dos testes realizados no laboratório é efetuada em amostras sanguíneas. O Técnico Superior de Análises Clínicas verifica as análises prescritas, identifica os tubos de colheita que serão necessários e prepara o restante material. Caso se verifique a prescrição de ácido láctico, amónia e potássio deve evitar o uso de garrote. Após a colheita, distribui o sangue pelos recipientes de recolha de amostra escolhidos e já devidamente rotulados, respeitando os volumes de amostra indicados para cada recipiente e faz a sua homogeneização, agitando (por inversão) com movimentos suaves 3 a 4 vezes (exceto o tubo de soro – este não deverá ser agitado). Caso o pedido contenha a análise “Hemocultura”, a respetiva amostra deve ser colhida antes dos restantes tubos, para reduzir o risco de contaminação por micro-organismos. Há análises como renina, ACTH, PTH, etc., que necessitam de centrifugação imediata após colheita (1).

### Controlo de Qualidade no Laboratório

No âmbito dos Laboratórios de Análises Clínicas, a garantia da qualidade permite ter o domínio da organização de todas as tarefas que levam à qualidade, abrange obrigatoriamente

as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica e inclui também procedimentos de controlo tais como o controlo da qualidade interno e a avaliação externa da qualidade (2).

O controlo de qualidade assegura a fiabilidade dos resultados analíticos e é umas das preocupações do Laboratório *Labeto*. Trata-se de um processo estatístico usado para monitorizar e avaliar os processos analíticos que geram os resultados dos utentes, que podem ser usados para o diagnóstico, prognóstico ou planeamento de terapêutica.

O Controlo de Qualidade engloba o Controlo de Qualidade Interno e a Avaliação Externa da Qualidade (anteriormente conhecida por Controlo de Qualidade Externo).

#### *Controlo de Qualidade Interno*

O controlo de qualidade interno (CQI) pode definir-se como um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório, quer sejam na fase pré-analítica, quer analítica e pós-analítica, que se destinam a assegurar a qualidade dos resultados obtidos para a amostra (2).

Na fase analítica, o CQI é efetuado diariamente, antes de se iniciar o processamento das amostras dos utentes. Os produtos do controlo de qualidade deveriam ser, idealmente, materiais semelhantes à amostra real (3). Quando um sistema analítico apresenta diferentes respostas (resultados estatisticamente diferentes) para a mesma quantidade de analito presente em materiais processados (controlos e calibradores) e em amostras humanas, esta diferença é denominada efeito da matriz. Por isso, do ponto de vista ideal, os materiais processados (calibradores ou controlos) e amostras deveriam gerar a mesma resposta num sistema de medição utilizado na rotina.

Assim, nesta fase, o CQI permite reduzir a imprecisão e é feito, como já foi referido, diariamente em todos os equipamentos utilizando dois ou três níveis de controlo de qualidade diferentes, antes de iniciar o trabalho de processamento das amostras (3). Sempre que um novo *kit* ou lote de reagente é utilizado, em cada nova calibração, após manutenção específica ou procedimentos de resolução rápida de problemas no equipamento ou quando se verifica alguma tendência dos resultados, deve proceder-se igualmente a novo controlo do equipamento. Os dados resultantes são registados e analisados, estabelecendo o laboratório os critérios de aceitação, segundo as Regras de Westgard e Levey-Jennings (4). O Laboratório *Labeto* possui um programa informático que permite a integração dos dados obtidos e a sua análise. Através deste programa é também possível comparar os dados do controlo interno com todos os laboratórios que usem os mesmos *kit's* e os mesmos equipamentos. Isto não só permite avaliar o desempenho do laboratório, como também permite despistar causas para o desvio dos valores esperados.

### *Avaliação Externa da Qualidade*

A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) corresponde à avaliação por um organismo exterior da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório. A AEQ permite a melhoria dos níveis de desempenho do laboratório e a comparabilidade de resultados com outros laboratórios, dando uniformidade e credibilidade ao trabalho desenvolvido (2).

### Atividades Desenvolvidas por Setor Laboratorial

As atividades desenvolvidas nos diferentes setores laboratoriais estão resumidas nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

**Tabela 1:** Equipamentos e determinações analíticas efetuadas no setor da Hematologia.

<b>Equipamentos (Metodologia)</b>	<b>Determinações analíticas</b>
<b>Advia 2120</b> (Citometria de fluxo)	Hemograma / plaquetas
<b>Sysmex XE 5000</b> (Citometria de fluxo associada à fluorescência)	Hemograma / Plaquetas Reticulócitos
<b>HA-8160</b> (HPLC)	Electroforese da Hemoglobina (HbA1, HbA1c, HbA2, HbF e variantes de Hb)
<b>HA- 8180</b> (HPLC)	HbA1c, HbF e Variantes de Hb
<b>TEST 1 THL e TEST 2 THL</b> (Fotometria cinética capilar)	Velocidade de Sedimentação

**Tabela 2:** Equipamentos e determinações analíticas efetuadas no setor da Coagulação.

<b>Equipamentos (Metodologia)</b>	<b>Determinações analíticas</b>
<b>BCS XP</b> (Coagulometria - Ensaio de coagulação, imunológicos e cromogénicos; Imunoturbidimetria)	Tempo de Protrombina, PTT (T.cefalina-caulino), Fibrinogénio, Antitrombina III, Tempo de Trombina D-Dímeros

**Tabela 3:** Equipamentos e determinações analíticas efetuadas no setor da Autoimunidade.

<b>Equipamentos (Metodologia)</b>	<b>Determinações analíticas</b>
<b>MAGO PLUS</b> (Elisa – IFI)	Testosterona Livre 17OHProgesterona Aldosterona ANA
<b>Auto-Lipa</b> (Imunoblot)	Testes confirmatórios e de identificação de Autoanticorpos
<b>Analyse I-2P</b> (Elisa)	Ac. ds DNA, ANA Screen, Ac. Anti-Chlamydia Tracomatis IgG / IgM, Ac. Anti Cardiolipina IgAGM Ac. Anti- CCP, Renina, TRABs, Ac. Anti-Gliadina IgA e Ac. Anti-Transglutaminase IgA.

**Tabela 4:** Equipamentos e determinações analíticas efetuadas no setor da Biologia Molecular.

<b>Equipamentos (Metodologia)</b>	<b>Determinações analíticas</b>
<b>Termociclador</b> (PCR)	PCR
<b>Scanner</b> (Fluorescência)	Leitura das lâminas

**Tabela 5:** Equipamentos e determinações analíticas efetuadas no setor da Microbiologia.

<b>Equipamentos (Metodologia)</b>	<b>Determinações analíticas</b>
<b>Mirastainer</b> (Coloração com corantes específicos: Gram, Ziehl-Nielsen modificado, etc)	Coloração automática de esfregaços em lâminas
<b>Vitek XL</b> (Espectrofotometria para as reacções colorimétricas de identificação e nefelometria para a determinação do antibiograma)	Identificação de bactérias e leveduras e teste de sensibilidade aos antibióticos das bactérias com relevância clínica (antibiograma)

## 2.2 Setor Laboratorial de Bioquímica Clínica

### 2.2.1 Equipamentos e Princípios das Metodologias Utilizadas

#### *Equipamentos*

##### ▪ **Siemens Healthcare Diagnostics Dimension Vista**

*Siemens Healthcare Diagnostics Dimension Vista* é um autoanalisador que se destina à duplicação de procedimentos analíticos manuais para determinar uma variedade de analitos nos fluidos orgânicos humanos.

As metodologias utilizadas neste sistema são espectrofotométricas, turbidimétricas, nefelométricas, de quimioluminescência e potenciométricas.

Os tipos de leitura efetuados incluem:

- **Método de Índice:** é feita uma medição durante a parte linear da reação, quando a absorvância da amostra se altera a um intervalo constante. Utilizam uma leitura bicromática; ou seja, cada medição é feita a dois comprimentos de onda diferentes. A atividade ou concentração é calculada a partir da diferença no índice de reação dos dois comprimentos de onda. Para alguns métodos, a turbidez ou difusão de luz é detetada por um fotómetro ao longo do tempo e é direta ou inversamente proporcional à concentração de analitos.
- **Ponto Final:** são feitas leituras depois de terminada a reação química. Os métodos utilizam uma leitura bicromática e a atividade ou concentração é calculada a partir da absorvância lida nos dois comprimentos de onda.
- **Cinética de Tempo Fixo:** utiliza a diferença entre duas medições de difusão de luz. Este método de avaliação utiliza um algoritmo para calcular a diferença entre os valores de início e fim da reação cinética. A resposta de instrumento final (valor bruto) resulta da análise da globalidade da curva de reação e não apenas de dois pontos.

##### ▪ **Capillarys 2**

O *Capillarys 2* é um sistema de eletroforese capilar automatizado para análise de proteínas. Este sistema é termo-regulado impedindo oscilações de temperatura, assegurando melhor reprodutibilidade da análise. A detecção direta de proteínas num comprimento de onda preciso, que é dependente do ensaio, aumenta a precisão e exatidão. Os resultados também se correlacionam muito bem com métodos imunoquímicos.

O *Capillaris 2* permite várias determinações inovadoras por eletroforese capilar, tais como: separação de proteínas séricas, sem interferência de lípidos; análise automática de testes de imunofixação; separação de proteínas de alta resolução; determinação da *carbohydrate-deficient-transferrin*, biomarcador para detetar o abuso de álcool; determinação da hemoglobina glicada, detecção de hemoglobinopatias; análise das proteínas da urina.

No ponto Proteínas – Separação das Proteínas Séricas por Eletroforese é feito o aprofundamento relativo à Eletroforese Capilar e a Imunotipagem de proteínas.

#### ▪ ***Aution Max e Sedimax***

***Aution Max*** (A. Menarini Diagnostics) é um equipamento destinado à primeira fase da análise sumária de urina. Executa as determinações de: densidade, cor, turvação, glicose, bilirrubinas, proteínas, pH, sangue, corpos cetônicos, urobilinogénio, nitritos e leucócitos.

Os métodos de leitura utilizados são:

- Reflectância em bicromatismo: tira-reagente.
- Índice de refração: densidade.
- Reflectância em 4 comprimentos de onda: cor.
- Método de dispersão de luz: turvação.

Após a análise sumária de urina no *Aution Max*, o *software* integrado permite determinar (por critérios definidos pelo operador) quais as amostras positivas a ser submetidas a uma análise de sedimento no equipamento *Sedimax*.

***Sedimax*** (A. Menarini Diagnostics) é um equipamento analisador de sedimento urinário. Capta imagens de microscopia de alta definição das amostras, faz uma análise morfológica e contagem das partículas, efetua uma completa interpretação dos resultados e armazena todas as imagens no computador para ser usado para qualquer reavaliação pelo operador. As partículas detetadas por microscopia digital de campo completo são: Glóbulos Vermelhos, Glóbulos Brancos, Cilindros Hialinos, Cilindros Patológicos, Células Epiteliais Escamosas, Células Epiteliais Renais e Células Epiteliais de Transição, Bactérias, Leveduras, Cristais, Oxalato de Cálcio mono-hidratado, Oxalato de Cálcio di-hidratado, Ácido Úrico, Trifosfatos, Muco e Espermatozoides.

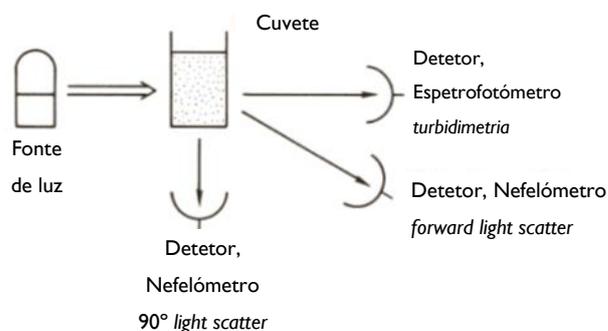
#### *Princípios das Metodologias Utilizadas*

Para além da espectrofotometria, a metodologia mais utilizada no Laboratório de Análises Clínicas, baseada na leitura da intensidade de energia radiante absorvida ou transmitida

através de uma amostra, é de referir outras também bastante usadas nos equipamentos referidos.

#### ▪ Turbidimetria e Nefelometria

A dispersão da luz é um fenómeno físico resultante da interação da luz com as partículas em solução. Turbidimetria e Nefelometria são técnicas analíticas usadas para medir o grau de turvação de uma amostra em termos da dispersão da luz. A difusão da luz ocorre quando a energia radiante, ao atravessar uma solução, encontra uma molécula numa colisão elástica, o que resulta na dispersão da luz em todas as direções. Ao contrário da emissão fluorescente, o comprimento de onda da luz dispersa é o mesmo da luz incidente. Os fatores que influenciam a dispersão da luz incluem o tamanho das partículas, concentração das partículas e a sua massa molecular (5).



**Figura I** Nefelómetro versus espectrofotómetro (turbidimetria) – combinações óticas (6).

Turbidimetria: os doseamentos por turbidimetria são feitos com um espectrofotómetro para determinar a concentração de partículas a analisar na amostra. A porção da luz bloqueada por uma suspensão de partículas depende não só da concentração mas também do tamanho destas. A turbidimetria mede a redução da transmissão da luz causada pela formação de partículas e quantifica a luz residual transmitida (7). Como foi já referido os equipamentos que utilizam esta técnica são os espectrofotómetros, mas o que se mede é a absorvância aparente, i.e., o decréscimo da luz que atravessa a amostra que é detetada por um detetor na mesma linha de orientação da luz incidente (Figura I). Dado que esta técnica mede a diminuição do sinal da luz transmitida, a precisão fotométrica e sensibilidade do equipamento limitam principalmente a sensibilidade da turbidimetria (5).

Nefelometria: é similar à turbidimetria, exceto no facto de a luz dispersa pelas pequenas partículas ser medida diretamente por um detetor que não se encontra no

trajeto direto da luz transmitida, mas num ângulo de 30 a 90° em relação à luz incidente (Figura 1). A dispersão da luz depende do tamanho e comprimento de onda das partículas. Para macromoléculas com um tamanho próximo ou maior que o comprimento de onda da luz incidente, a sensibilidade é aumentada se for medida a *forward light scatter*. A luz dispersa emitida é medida diretamente e convertida num sinal elétrico. O sinal de luz dispersa é lido a partir de uma curva de referência criada a partir de diluições automáticas de um calibrador conhecido. A intensidade do sinal de luz difusa é proporcional à concentração do analito na amostra (7).

#### ▪ **Potenciometria**

A potenciometria é um processo eletroquímico onde a diferença de potencial é medida entre um *eléctrodo indicador* (de um analito) e um *eléctrodo de referência* imersos numa solução, o que constitui uma célula eletroquímica, sob a condição de a corrente eléctrica ser nula. O *eléctrodo indicador* é escolhido de forma que o seu potencial de semi-reação responda a mudanças na atividade de um analito particular em solução. Pelo contrário no *eléctrodo de referência* o potencial de semi-reação não se altera. Assim, na potenciometria o que se mede é a diferença de potencial entre o *eléctrodo indicador* e o *eléctrodo de referência* (6).

Diferentes tipos de *eléctrodos potenciométricos* são usados para aplicação clínica. No equipamento *Dimension Vista* são usados *eléctrodos seletivos de iões* para sódio, potássio e cloreto.

Os potenciais de membrana são causados pela permeabilidade de certos tipos de membranas a determinados aniões ou catiões. O potencial gerado na interface membrana/amostra é proporcional ao logaritmo da atividade de analito na amostra. O potencial eléctrico gerado numa amostra é comparado ao potencial eléctrico gerado numa solução padrão. A concentração de iões é calculada utilizando a equação Nernst (8).

#### ▪ **Quimioluminescência**

Esta metodologia será descrita no setor laboratorial de Imunologia – Equipamentos e Princípios de Metodologias Utilizadas.

### 2.2.2 Estudo do Metabolismo dos Hidratos de Carbono

#### *Glicose*

O doseamento da glicose é uma das determinações mais realizada nos Laboratórios de Análises Clínicas.

A Glicose é o principal hidrato de carbono presente no sangue e sua principal função bioquímica é de fornecer energia para o organismo humano, através da sua oxidação pelas vias glicolítica e dos ácidos tricarbolixicos (ciclo de Krebs) com a consequente biossíntese de ATP. O distúrbio mais frequente do metabolismo dos hidratos de carbono é a hiperglicémia devido a *diabetes mellitus*. A hipoglicémia está também associada ao metabolismo anormal dos hidratos de carbono, a sua incidência embora pouco conhecida é substancialmente menor.

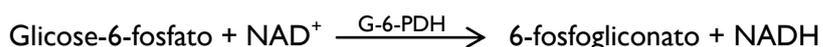
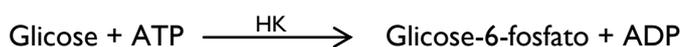
Segundo a Norma da Direção Geral de Saúde (DGS) nº 002/2011 “Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus” (9) o diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

- a) Glicémia em jejum  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7,0$  mmol/l); ou
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l); ou
- c) Glicémia  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral com 75g de glicose; ou
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ .

O diagnóstico de diabetes numa pessoa assintomática não deve ser realizado com base num único valor anormal de glicémia de jejum ou de HbA1c, devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma a duas semanas.

Para além do sangue periférico, a glicose poderá ser determinada na urina (glicosúria), procedimento que serve para o despiste e/ou monitorização da diabetes mellitus e para detetar alterações tubulares renais. A glicose pode ser ainda determinada no líquido cefalorraquidiano, no diagnóstico de meningites bacterianas, visto que, neste caso, há um elevado consumo de glicose, quer por parte dos micro-organismos, quer dos leucócitos, o que provoca uma diminuição da sua concentração (10).

- **Amostra:** Soro, plasma, urina e líquido cefalorraquidiano humanos.
- **Metodologia:** Método da Hexocinase, usando uma técnica de leitura bicromática de ponto final. O aumento na absorvância a 340 nm devida ao NADH é proporcional à concentração da glicose (64).



#### *Prova de Tolerância à Glicose Oral*

A Prova de Tolerância à Glicose Oral (PTGO) avalia a *clearance* da glicose da circulação após a ingestão de uma dose de glicose em condições definidas e controladas.

Há diversos fatores que podem afetar a tolerância à glicose, como alterações hormonais da tiroxina, da hormona do crescimento, do cortisol e das catecolaminas. Alguns

medicamentos ou substâncias químicas também interferem. Como exemplo, temos os contraceptivos orais, os salicilatos, o ácido nicotínico (encontrado no tabaco) e os agentes hipoglicemiantes (insulina, sulfonilureias).

Há evidências que a hora de realização da PTGO afeta o resultado da mesma e por isso é recomendado que esta se realize entre as 7 h e as 12 h, após jejum de pelo menos 8 horas e não superior a 14 horas (9). A PTGO é feita com a ingestão de 75g de glicose diluída em 300 ml de água, solução que deve ser bebida em 5 minutos. São efetuadas colheitas de sangue às 0, 1 e 2 h no caso das grávidas e às 0 e 2 h nos restantes casos. É feito depois o doseamento da glicose pelo método já referido.

Na tabela 6 apresentam-se os critérios para identificação de categorias de risco aumentado para diabetes de acordo com a DGS (9).

**Tabela 6:** Critérios para identificação de categorias de risco aumentado para diabetes (10).

	<b>Glicémia em jejum (mg/dL)</b>	<b>PTGO 75g (mg/dL)</b>
<b>Normal</b>	<110	<140
<b>Anomalia da glicémia em jejum</b>	110 – 125	
<b>Tolerância diminuída à glicose</b>		140 - 199
<b>Diabético</b>	>126	>200

Nas mulheres grávidas, a PTGO é obrigatória para a deteção da diabetes gestacional, estando regulamentada pela norma da DGS atrás referida.

Duas questões têm sido levantadas no que diz respeito à gravidez, intolerância à glicose e diabetes.

A primeira diz respeito ao diagnóstico de diabetes gestacional. Não só um grande número de grávidas é afetado por diabetes gestacional, como muitas dessas mulheres poderão continuar ou vir a desenvolver mais tarde diabetes (11). De maior risco são as mulheres que desenvolvam glicosúria, que tenham uma história familiar de diabetes ou uma história de bebés de termo com elevado peso, que tenham tido um nado-morto ou tenham tido 5 ou mais partos ou, ainda, as que sejam obesas e com mais de 35 anos.

A segunda questão envolve a cuidada monitorização e controlo da mulher grávida diabética. Elevados níveis maternos de glicose, elevados níveis fetais de glicose e insulina ou a combinação destes atrasam o desenvolvimento bioquímico e morfológico dos pulmões fetais por um mecanismo ainda não determinado. Quando as grávidas diabéticas estão controladas, a diferença de desenvolvimento fetal dos pulmões é mínima, se comparada com o desenvolvimento de fetos de mães não-diabéticas.

As mulheres grávidas diabéticas estão em risco de desenvolver outras complicações, como hipertensão, infeções, acidose e neuropatias e devem ser cuidadosamente monitorizadas para que estas situações sejam detetadas precocemente (11).

De acordo com a Circular Normativa da DGS nº 002/2011 de 14/01/2011, o diagnóstico da diabetes gestacional (9) faz-se com base nos seguintes critérios:

- a) Glicémia em jejum, a realizar na 1.<sup>a</sup> consulta de gravidez,  $\geq 92$  mg/dl e  $<126$  mg/dl (ou  $\geq 5,1$  e  $<7,0$  mmol/l);
- b) Se a glicémia em jejum  $<92$  mg/dl, realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. O diagnóstico de diabetes gestacional é estabelecido se houver a confirmação de um ou mais dos seguintes valores:
  - i. às 0 horas, glicémia  $\geq 92$  mg/dl (ou  $\geq 5,1$  mmol/l);
  - ii. à 1 hora, glicémia  $\geq 180$  mg/dl (ou  $\geq 10,0$  mmol/l);
  - iii. às 2 horas, glicémia  $\geq 153$  mg/dl (ou  $\geq 8,5$  mmol/l).

#### *Hemoglobina Glicada*

A hemoglobina glicada A1c (HbA1c) resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos (10).

A glicação da hemoglobina aumenta em função da concentração da glicose a que os eritrócitos são expostos, integrada ao longo do tempo de vida destas células. A hemoglobina glicada é um indicador de grande utilidade clínica, refletindo a glicémia média nas últimas 8 a 12 semanas, atendendo a que o tempo médio de vida dos eritrócitos é de cerca de 120 dias. O doseamento da HbA1c para o diagnóstico de diabetes *mellitus* tem como desvantagens a possibilidade do resultado ser alterado por outros fatores além da glicose, tais como mudanças na duração de vida dos eritrócitos e etnia. Algumas condições podem interferir com a determinação, como, por exemplo, hemoglobinopatias; outra desvantagem é o seu custo (12).

A determinação da HbA1c para o diagnóstico e controlo de diabetes *mellitus* tem as seguintes vantagens em relação à glicémia: o indivíduo não necessita de estar em jejum, as amostras podem ser obtidas a qualquer hora do dia, sendo estáveis, com pouca variabilidade e não alterada por fatores agudos; o ensaio ser medido padronizado em equipamentos de diversos fabricantes e a sua concentração é um indicador de risco do desenvolvimento de complicações microvasculares da diabetes e é indicado para controlar a terapêutica de diabetes (12).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), associado à cromatografia de troca catiónica de fase reversa.

### 2.2.3 Estudo das Proteínas

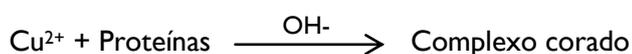
Todas as proteínas realizam funções biológicas e fisiológicas. Muitas vezes o conhecimento das suas propriedades biológicas é a base para o estabelecimento dos métodos para a sua deteção e quantificação. As funções fisiológicas mais importantes são de transporte, de recetores, hormonas e funções enzimáticas (13).

#### *Proteínas totais*

O doseamento das proteínas totais séricas pode refletir o estado nutricional, doenças renais, doenças hepáticas, perturbações ósseas e muitos outros estados patológicos. Esta determinação é muito frequente, podendo o seu valor aparecer aumentado, diminuído ou normal, consoante a patologia em causa (13). A hipoproteinémia pode surgir em situações de perda excessiva por doença renal, inflamação gastrointestinal, hemorragias (de feridas ou internas) ou queimaduras. A hiperproteinémia pode acontecer em situações de desidratação ou produção excessiva como acontece no Mieloma Múltiplo (14).

As proteínas séricas podem dividir-se em dois grupos principais, albumina e globulinas, sendo a determinação da albumina uma análise frequente (13).

- **Amostra:** Soro ou plasma humanos.
- **Metodologia:** O método utilizado é uma modificação da reação do biureto é colorimétrico. A absorvância do complexo corado formado resultante da ligação, em meio alcalino, entre as ligações peptídicas e o cobre, é proporcional à concentração total de proteína na amostra (65).



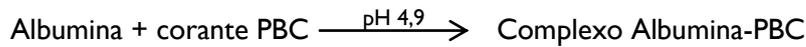
#### *Albumina*

A albumina é a proteína mais abundante encontrada no plasma, sendo sintetizada no fígado. Devido à sua elevada concentração no plasma e ao seu tamanho relativamente pequeno, a albumina é também o maior componente da maioria dos fluidos extravasculares.

A albumina é responsável por aproximadamente 80% da pressão colóide-osmótica dos fluidos intravasculares. Também tem um papel relevante como tampão do pH e é uma proteína reativa de fase aguda negativa. Outra das funções primárias da albumina é a de transporte de várias substâncias no sangue.

Diminuições da concentração de albumina podem ser causadas por: malnutrição ou malabsorção, doença hepática, perdas enterohepáticas ou gastrointestinais (como diarreia, inflamação), doença renal, hipotireoidismo, diluição por excesso (polidipsia), redistribuição por hemodiluição. Concentrações séricas elevadas de albumina são encontradas em situações de desidratação ou perfusão excessiva de albumina (14).

- **Amostra:** Soro ou plasma humanos.
- **Metodologia:** Método de fixação de corante com o Púrpura de Bromocresol (PBC), com uma técnica de leitura bicromática de ponto final. A absorvância do complexo é diretamente proporcional à concentração de albumina (15, 14).

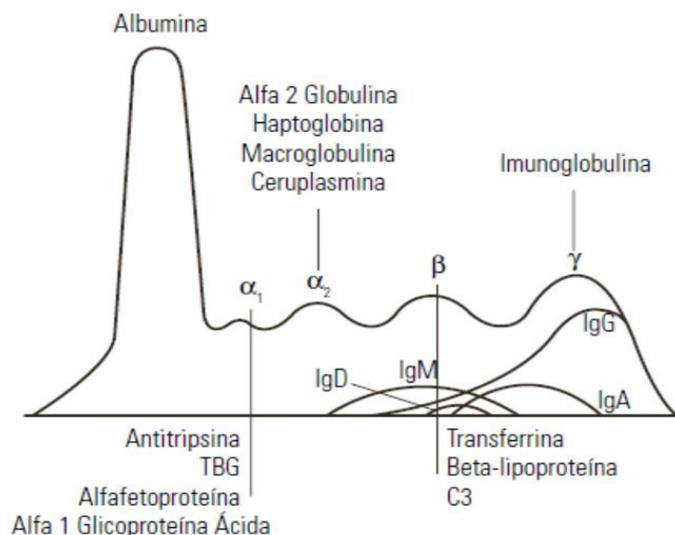


### Separação das Proteínas Séricas por Eletroforese

O plasma humano contém mais de 125 proteínas identificáveis constituindo aproximadamente 80 g/L ou quase toda a massa dos solutos plasmáticos. A quantificação das proteínas séricas totais e das suas frações individuais têm valor no diagnóstico de certas patologias agudas e crônicas. É também uma ferramenta útil na monitorização de alterações malignas, indica processos inflamatórios agudos e crônicos, doenças hepáticas, deficiências de anticorpos, diferencia gamopatias monoclonais e policlonais, para além de permitir monitorizar respostas à terapia (16).

A eletroforese de proteínas (EFP) séricas é uma técnica de *screening* do soro para anomalias nas proteínas. É baseada nos princípios de eletroforese de zona executada no meio de suporte adequado. Dois tipos de métodos de EFP estão hoje em dia em uso: eletroforese de zona e eletroforese capilar (16). Para as determinações de rotina as proteínas são separadas por eletroforese de zona em cinco ou seis frações de mobilidade diferente: Albumina, Alfa-1, Alfa-2, Beta (ou Beta-1 e Beta-2) e Gama (Figura 2).

Os métodos que usam eletroforese capilar automática possibilitam a EFP com quantificação da banda monoclonal e oferecem uma resolução superior à da eletroforese em gel de agarose.



**Figura 2** Perfil eletroforético (de zona) das proteínas séricas com indicação de algumas das proteínas encontradas em cada banda eletroforética (17).

O conhecimento dos principais componentes da cada banda eletroforética facilita o raciocínio clínico e auxilia no diagnóstico de várias doenças (17). Descreve-se, a seguir, as principais proteínas que constituem as diferentes bandas eletroforéticas e a interpretação das suas alterações.

- **Albumina:** é a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas. A diminuição da concentração de albumina é uma situação altamente inespecífica e acompanha inúmeras doenças. Esta hipoalbuminémia acontece em situações que promovam a sua perda (através do rim ou intestinos), baixa ingestão proteica, em situações de elevado catabolismo (infecção bacteriana grave, neoplasias malignas, insuficiência cardíaca congestiva, doenças inflamatórias e infecciosas crónicas), ou em situações de síntese prejudicada como sejam a cirrose hepática e hepatite viral. O aumento desta proteína acontece em casos de desidratação devido a uma perda consecutiva de água (sudorese excessiva, diarreia, vômito) (17).
- **$\alpha$ -I-Globulinas:** este grupo é constituído por um conjunto de várias proteínas, entre as quais a  $\alpha$ -I-antitripsina que corresponde a 90% do pico normal da  $\alpha$ -I-globulina. Em geral, há um aumento desta fração em processos inflamatórios, infecciosos e imunes de forma inespecífica (são proteínas de fase aguda). A  $\alpha$ -I-antitripsina é codificada por dois alelos denominados M e Z. Doentes com homozigotia Z geram um decréscimo nos níveis séricos de  $\alpha$ -I-antitripsina o que leva a um elevado risco de desenvolver doença pulmonar, e está também relacionado com uma forma progressiva de cirrose. Assim, diante da ausência ou diminuição deste pico são necessários testes mais específicos (17).
- **$\alpha$ -2 Globulinas:** a banda alfa-2 é constituída por um grupo variado de proteínas, entre elas a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina, a ceruloplasmina, a eritropoietina e a colinesterase. Estas proteínas são também proteínas de fase aguda, podendo aparecer aumentadas em presença de infeção, processos inflamatórios e imunes. A  $\alpha$ -2-macroglobulina e a haptoglobina correspondem à maior parte desta banda. A haptoglobina migra mais lentamente que a  $\alpha$ -2-macroglobulina e tem função de ligar a hemoglobina que passa para o plasma, permitindo que o complexo haptoglobina-hemoglobina seja rapidamente removido. Num quadro de hemólise intravascular, onde há um importante gasto desta proteína, os níveis de haptoglobina estão diminuídos (17). A  $\alpha$ -2-macroglobulina é uma das maiores proteínas globulínicas presentes no plasma e a sua concentração pode elevar-se 10 vezes ou mais na

síndrome nefrótica, quando são perdidas as outras proteínas de peso molecular mais baixo (17).

- **β – Globulinas:** esta banda é composta por um grupo heterogêneo de proteínas, de onde se destacam as beta-lipoproteínas, a transferrina e o componente C3 do complemento. Pode acontecer diminuição desta banda devido a insuficiência hepatocelular ou desnutrição, mas normalmente é raro. O aumento pode estar relacionado com anemia ferropriva (β1 – aumento da síntese de transferrina com padrão eletroforético mais rápido), pode também haver uma hiperglobulinemia β2 por aumento do componente C3 do complemento de origem inflamatória ou secundária a uma obstrução biliar intra ou extra hepática. A presença de proteína de Bence-Jones, que pode migrar nesta zona, também pode fazer aumentar a banda (17).
- **γ– Globulinas:** esta fração é constituída por imunoglobulinas que são os anticorpos produzidos pelos plasmócitos, quando estimulados por antígenos ou devido à patologia clonal maligna dessas células. Há diferentes classes, todas elas formadas por duas cadeias pesadas (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE, correspondendo a IgG a 80% das gamaglobulinas) e duas cadeias leves (kappa ou lambda). Apenas a IgG apresenta migração por toda a banda da fração de gamaglobulinas. Assim, as alterações nessa banda refletem o que ocorre com esta imunoglobulina. A IgA encontra-se na área de junção com a fração β–globulina. A IgM, por sua vez, migra na região localizada entre a IgA e a IgG e é detetada quando estimulada (infecções agudas) (17).

#### *Caraterização de banda monoclonais por eletroforese capilar*

A eletroforese de proteínas é uma técnica bem instituída usada na rotina clínica para a detecção de anomalias nas proteínas. Na eletroforese capilar moléculas com carga elétrica são separadas pela sua mobilidade eletroforética e tamanho, em tubos capilares cheios de uma solução tampão alcalina com um pH específico, de um modo muito mais eficiente do que na eletroforese de zona. Frações anormais nos proteinogramas, principalmente aquelas nas zonas de beta e gamaglobulinas, são sempre suspeitas de serem proteínas monoclonais, e por isso uma indicação de gamopatias (18). No Laboratório *Labeto*, a técnica de imuno-eletroforese capilar é utilizada para a identificação e caracterização das proteínas monoclonais, fazendo a imunotipagem com anticorpos específicos para identificar estas frações anormais.

No equipamento *Capillarys 2*, oito capilares funcionam em paralelo. Um dos capilares dá-nos um padrão eletroforético completo das proteínas na amostra. Nos outros capilares são

misturados a amostra com anti-soros específicos contra cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\mu$  (IgM), e contra cadeias leves livres *kappa* e *lambda*, que ligam as respectivas específicas proteínas. É feita a comparação entre o perfil eletroforético das proteínas na amostra com o perfil eletroforético da amostra com os anti-soros. O desaparecimento da banda das imunoglobulinas policlonais no padrão eletroforético com anti-soros é a evidência da sua existência na amostra.

Essencialmente, na interpretação desta análise deve ter-se em conta que:

- na **ausência de componente monoclonal**, uma amostra de soro normal ou uma amostra com hipergamaglobulinémia apresenta o desaparecimento das bandas das imunoglobulinas policlonais nos padrões com anti-soros;
- se existir a **presença de um componente monoclonal** (gamopatia monoclonal), não haverá o desaparecimento de todas as bandas. A presença de uma proteína monoclonal (gamopatia monoclonal) é caracterizada pela presença da banda do anti-soro de uma das cadeias pesadas e de uma das cadeias leves. A reação com o anti-soro de uma das cadeias leves com ausência de reação com qualquer um dos anti-soros contra as cadeias pesadas indica uma gamopatia muito rara de IgD ou IgE, ou uma gamopatia de cadeia leve. A situação reversa pode indicar uma gamopatia de cadeia pesada muito rara;
- no caso da **presença de dois ou mais componentes monoclonais**, a mesma interpretação pode ser feita e a comparação dos padrões eletroforéticos indica o tipo de gamopatias existentes.

#### 2.2.4 Avaliação bioquímica da função renal

O Rim é regulador dos fluidos corporais e é responsável por manter a homeostase ou o equilíbrio dos fluidos e eletrólitos no corpo humano. O rim tem seis funções principais: (19)

1. Formação de urina
2. Regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico
3. Regulação do equilíbrio ácido-base
4. Excreção de produtos do metabolismo proteico
5. Funções hormonais
6. Conservação de proteínas.

Independentemente das causas, a doença renal que evolui para uma Insuficiência Renal Crônica pode ser um processo longo. Os rins têm a capacidade de aumentar a sua capacidade funcional em resposta à lesão. Existem vários testes que ajudam a avaliar a função

dos nefrônios, a sua unidade funcional, baseados na avaliação da filtração glomerular e da secreção e reabsorção tubular (20).

Creatinina, Ureia e Ácido Úrico são metabolitos azotados não-proteicos que são eliminados do organismo através da filtração glomerular no rim. Os seus doseamentos no plasma ou soro são vulgarmente usados como indicadores da função renal.

#### *Doseamento Sérico da Creatinina e Clearance da creatinina*

A creatinina é formada a partir da creatina e creatina-fosfato, por desidratação, numa reação irreversível e não enzimática no músculo esquelético e é excretada para o plasma a uma taxa constante relacionada com a massa muscular. Mostra pouca alteração com mudanças na dieta.

A concentração plasmática da creatinina é muito estável e tem uma variação inferior a 10%/dia em indivíduos normais. Dado que esta concentração é um reflexo direto da massa muscular, a sua concentração sérica é maior nos homens que nas mulheres.

A creatinina é removida da circulação por filtração glomerular e não é praticamente reabsorvida pelos túbulos renais. Só uma pequena quantidade de creatinina na urina final é derivada de secreção tubular. Por causa destas propriedades, a *clearance* da creatinina pode ser usada para avaliar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) (19).

A concentração sérica da creatinina é usada geralmente para determinar a capacidade da função renal, a gravidade da lesão renal e monitorizar a progressão da doença renal. No entanto, é um parâmetro analítico de baixa sensibilidade. Em contraste, o teste “*clearance* da creatinina” é muito sensível para detetar deficiências na TFG.

*Clearance* é definida como o volume de plasma do qual uma quantidade determinada de substância pode ser completamente eliminada para a urina por unidade de tempo. Isto depende da concentração plasmática da substância e da sua taxa excretória que, por sua vez, depende da TFG e do fluxo sanguíneo renal. A *Clearance* da Creatinina é um teste da função renal que é baseado na excreção pelos rins da creatinina metabolicamente produzida, sendo de grande utilidade pelas razões já indicadas para avaliar a TFG (21).

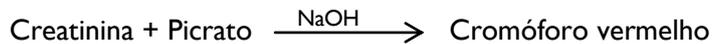
Geralmente, é feita a colheita de urina durante 24 horas. Para calcular a *Clearance* da creatinina é medido o volume de urina e determinada a Creatinina na urina de 24 horas; durante o período de recolha da urina é feita uma determinação da concentração sérica da creatinina.

A *Clearance* da creatinina é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Clearance da creatinina (mL/min)} = UV / P$$

Em que U é a concentração da creatinina urinária (mg/dL), V é o volume de urina excretado por unidade de tempo (mL/min) e P é a concentração de creatinina plasmática (mg/dL).

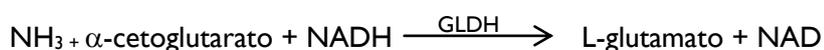
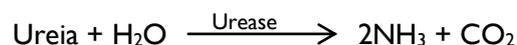
- **Amostra:** Soro, plasma ou urina humanos.
- **Metodologia:** Método modificado da reação de Jaffe, com uma técnica de leitura cinética bicromática. A velocidade do aumento da absorvância causada pela do cromóforo é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra (22).



#### *Doseamento da Ureia Sérica*

À medida que os aminoácidos são desaminados (catabolismo das proteínas) a amónia é produzida. O aparecimento de níveis tóxicos de amónia no sangue é prevenido pela conversão da amónia em ureia no fígado. Após a sua síntese, a ureia é transportada no sangue até aos rins onde é facilmente filtrada do plasma pelo glomérulo. Aproximadamente, 40 a 50% da ureia filtrada é normalmente reabsorvida, de modo passivo, nos túbulos proximais. A ureia no sangue é, por vezes, referida como BUN – Blood Urea Nitrogen. A sua produção aumenta quando um grande número de aminoácidos é metabolizado no fígado. Estas situações podem ocorrer quando temos uma dieta hiperproteica, danos tecidulares, ou diminuição da síntese de proteínas. Pelo contrário, a produção de ureia é reduzida com dietas hipoproteicas e na presença de lesão hepática grave. A produção de ureia excede a excreção renal em indivíduos saudáveis e uma parte é degradada em iões amónio por bactérias intestinais. A concentração da ureia no plasma é condicionada pela função e perfusão sanguínea renal, pelo teor proteico da dieta e pela taxa de catabolismo das proteínas. Os seus aumentos no plasma podem dever-se a causas pré-renais, renais e pós-renais. O doseamento da ureia é usado para avaliar a função renal e o estado de hidratação, ajudar no diagnóstico e monitorização de doença renal aguda e crónica e verificar a eficácia da diálise (19, 21).

- **Amostra:** Soro, plasma ou urina humanos.
- **Metodologia:** Método da urease, com uma técnica de leitura cinética fotométrica. O decréscimo de absorvância devido ao desaparecimento de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra (22).

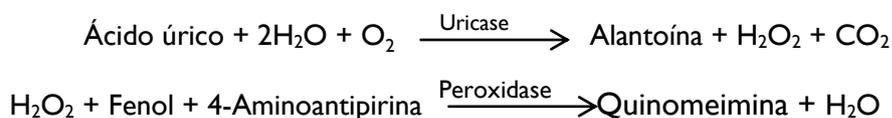


### *Doseamento do Ácido Úrico Sérico*

O ácido úrico é o produto do catabolismo das purinas dos ácidos nucleicos, quer sejam ingeridos, quer sejam resultantes da destruição celular. Parte deste processo ocorre, essencialmente, no fígado, sendo daí transportado no plasma desde o fígado até ao rim. Embora seja completamente filtrado do plasma pelos glomérulos e secretado nos túbulos distais para a urina, a maioria do ácido úrico é reabsorvido nos túbulos proximais e reutilizado. Os níveis plasmáticos de ácido úrico são variáveis e são maiores nos homens que nas mulheres. O ácido úrico é relativamente insolúvel no plasma e, em elevadas concentrações, pode depositar-se nas articulações e tecidos, causando inflamação e dor. A insuficiência renal crónica avançada está associada a um aumento progressivo da concentração plasmática de ácido úrico.

O doseamento do ácido úrico pode ser feito para ajudar no diagnóstico de deficiências genéticas no metabolismo das purinas, confirmar o diagnóstico e monitorizar o tratamento da Gota, ajudar no diagnóstico de cálculos renais e na deteção de disfunções renais (19, 21).

- **Amostra:** Soro, plasma e urina humanos.
- **Metodologia:** Modificação do método da uricase, com técnica de leitura de ponto final. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela ação da uricase na presença de um composto fenólico sofre acção da peroxidase produzindo um composto corado em concentração diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra (22).



### *Microalbuminúria*

Um dos primeiros sinais de doença renal glomerular é muitas vezes a microalbuminúria, eliminação de muito pequena quantidade de albumina na urina, tão pequena que não é detetada com as tiras-reagentes usadas na análise sumária da urina. O doseamento da “microalbumina” é útil para ajudar no diagnóstico de nefropatia renal num estado precoce e por isso antes do desenvolvimento de proteinúria (19).

No *screening* de pacientes com predisposição para doença renal, especialmente com diabetes ou hipertensão, a determinação da microalbuminúria é recomendável. A microalbuminúria é definida como albuminúria persistente entre 30 a 299 mg/24 h. Geralmente, a determinação é feita numa amostra de urina recolhida durante 24 horas (15). Entre os fatores que podem elevar a excreção urinária de albumina incluem-se: exercício nas 24 horas de recolha da urina, infeção, febre, insuficiência cardíaca congestiva, hiperglicémia e hipertensão graves (19, 15).

- **Amostra:** Urina humana.
- **Metodologia:** Imunoturbidimetria. A albumina contida na urina forma complexos imunitários numa reação imunoquímica com anticorpos específicos. O resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida (24).

### *Análise Sumária de Urina*

A análise sumária de urina ou Urina tipo II é um exame útil para avaliar a evolução das doenças renais. Também serve como um indicador rápido do estado do indivíduo em relação à glicose e função hepática-biliar.

Esta análise engloba dois tipos de determinações: 1) sedimento urinário – estimativa semi-quantitativa do número dos elementos figurados presentes na amostra; 2) análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos – cor, glicose, cetonas, densidade, pH, proteínas, urobilinogénio, bilirrubina, leucócitos, nitritos, sangue (27).

A amostra convém ser a primeira urina da manhã (porque é mais concentrada devido à retenção durante a noite da urina na bexiga) ou, pelo menos, a última micção ter sido há mais de 2 horas. Amostras contaminadas com sangue menstrual ou material vaginal devem ser rejeitadas.

A análise dos parâmetros bioquímicos é feita com tiras-reagentes apropriadas. Quando os resultados da tira indicarem a presença de bilirrubina, cetona, urobilinogénio, proteína ou glicose, confirmam-se manualmente com outra tira-reagente, preferencialmente de outra marca comercial (glicose, cetona, urobilinogénio) ou outro método (bilirrubina e proteína), exceto se as análises ao sangue do indivíduo, como glicémia e bilirrubinemia, estiverem em conformidade. No caso da tira-reagente indicar vestígios de proteinúria ou um resultado positivo e se houver valores elevados nos leucócitos, eritrócitos, cilindros e espermatozoides, não há necessidade de confirmação. Valores mais elevados devem ser confirmados com outro método. Os valores de hemoglobina deverão estar de acordo com o número de eritrócitos/campo, caso sejam devidos à hematúria e não a hemoglobinúria.

Na análise do sedimento urinário deve fazer-se a identificação e semi-quantificação de: células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, cristais (oxalatos, uratos, fosfatos, de cistina, entre outros) cilindros (hialinos, granulosos, de eritrócitos, de leucócitos), bactérias, leveduras, células redondas (envolvimento do parênquima renal), espermatozoides e muco (25).

### *Cálculo Urinário*

Cálculos urinários ou renais (também chamados pedras renais) são formados pela combinação de várias substâncias cristalizáveis: oxalato de cálcio, fosfatos, ácido úrico e uratos, carbonatos e cistina.

A análise química dos cálculos é importante para determinar a causa do seu aparecimento. Na tabela 7 são enunciadas as principais causas para cada tipo de cálculo. A avaliação da composição do cálculo urinário pode ajudar na prevenção do desenvolvimento de novos cálculos (nefrolitíase). Para além da aparência macroscópica, este teste normalmente inclui pesquisa da presença de cálcio, carbonatos, cistina, magnésio, oxalatos, fosfatos e uratos no cálculo por técnicas químicas. A composição dos cálculos, por ordem de frequência, é: fosfato de cálcio, oxalato de cálcio, fosfato de amónia e magnésio, carbonato de cálcio, ácido úrico e uratos e cistina (25).

**Tabela 7:** Tipos de cálculos urinários (25).

Composição do cálculo	Causa da formação do cálculo
<b>Oxalato de Cálcio</b>	Hiperparatireoidismo Níveis elevados de cálcio na urina Toxicidade provocada pela Vitamina D Sarcoidose Osteoporose
<b>Fosfato de Cálcio</b>	Consumo excessivo de antiácidos Infeção por organismos produtores de urease
<b>Ácido Úrico</b>	Gota Níveis de ácido úrico elevados na urina e no sangue
<b>Cistina</b>	Cistinúria hereditária

A amostra deve estar liberta de tecido e de sangue que acompanham a expulsão do(s) cálculo(s) e apresentada num contentor limpo e seco. Se necessário, dever-se-á filtrar a urina para recuperar areias ou pedra. Depois de limpa a amostra, pode analisar-se passados alguns dias.

### 2.2.5 Avaliação da Função Hepática

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano. É um órgão complexo que desempenha um papel bioquímico fundamental no metabolismo, digestão, desintoxicação e eliminação de substâncias do organismo, funções que são essenciais à vida. O fígado é único no sentido em que é um órgão com grande capacidade funcional que consegue regenerar células que tenham sido destruídas por algumas lesões ou doenças pontuais. Contudo, se as lesões se repetirem por longos períodos de tempo, o fígado pode sofrer mudanças irreversíveis que interferem com as suas funções (26).

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, porfirinas e ácidos biliares. É responsável pela síntese da maioria das

proteínas plasmáticas, exceto imunoglobulinas. É também o principal local de armazenamento de ferro, glicogênio, lípidos e vitaminas. Desempenha um papel importante na desintoxicação de xenobióticos e excreção de produtos metabólicos finais como bilirrubina, amônia e ureia. As análises laboratoriais para avaliação da função hepática são baseadas na avaliação de algumas destas funções, em particular, funções excretoras e de síntese, e na determinação de atividade de enzimas hepáticas libertadas para o plasma (26).

#### *Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Indireta*

A bilirrubina é o produto do catabolismo do grupo heme, que entra na composição da hemoglobina, mas também da mioglobina e dos citocromos e é degradado no sistema reticuloendotelial pela hemeoxigenase a dióxido de carbono e biliverdina, que é depois convertida em bilirrubina. Esta é insolúvel em água e é transportada no plasma pela albumina para o fígado para continuar o seu metabolismo. A ligação à albumina previne que a bilirrubina, solúvel em lípidos, atravesse as membranas celulares e se acumule nas células. A bilirrubina é conjugada com o ácido glucorónico nos hepatócitos, reação catalisada pela enzima uridinadifosfato-glucoroniltransferase, originando a bilirrubina conjugada hidrossolúvel (26).

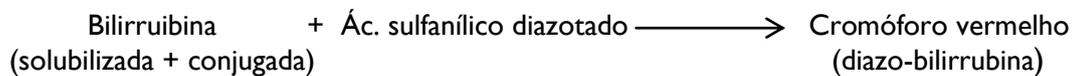
Por um mecanismo de transporte ativo, a bilirrubina conjugada passa para os canalículos biliares. A bÍlis contendo a bilirrubina conjugada chega ao intestino, onde por ação de bactérias intestinais é reduzida a urobilinogénio. O urobilinogénio pode ser reabsorvido no intestino e voltar ao fígado, onde é excretado na bÍlis. O urobilinogénio do plasma também é filtrado para a urina. Um aumento do urobilinogénio indica uma produção de bilirrubina aumentada, como a que ocorre na hemólise, ou sugere uma *clearance* diminuída por danos hepáticos, como os que ocorrem na hepatite recente. Nas situações que impedem a excreção da bilirrubina conjugada na bÍlis, esta passa para o plasma, é filtrada pelos rins e excretada na urina.

A bilirrubina total é a soma das frações conjugadas e não conjugadas. As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite e obstrução da vesícula biliar, hematológicas e metabólicas (26).

Para além da bilirrubina total, determinam-se geralmente a bilirrubina direta (conjugada) e por cálculo, a bilirrubina indireta (bilirrubina total – bilirrubina direta), a fração não conjugada.

As determinações conjuntas são úteis no diagnóstico diferencial e terapêutica de doenças hepatocelulares e colestáticas, doenças hemolíticas e hematológicas.

- **Bilirrubina Total e Bilirrubina Direta - Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Diazo-método com metodologia colorimétrica de ponto final. Na determinação da bilirrubina total, a bilirrubina não conjugada na amostra é solubilizada por diluição numa mistura de cafeína/beonzoato/acetato/EDTA. Esta e a fração conjugada reagem diretamente com o ácido sulfanílico diazotado originando um composto corado. A absorvância deste cromóforo é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina (27).



- **Bilirrubina indireta - Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Diferença entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta.
- **Valores de referência:** <0,70 mg/dL.

### Enzimas

As enzimas hepáticas libertadas para o plasma desempenham um papel importante na avaliação da função hepática porque danos no fígado que originem citólise ou necrose levam à libertação na circulação sanguínea de enzimas celulares. As enzimas também desempenham um papel importante na diferenciação do tipo de doença hepática, hepatocelular ou obstrutiva. São referidas as que têm maior importância clínica na avaliação da função hepática.

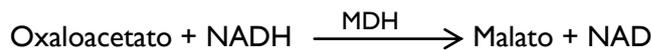
#### ▪ Dano Hepatocelular

Alanina Aminotransferase e Aspartato Animotransferase: as duas aminotransferases mais comuns determinadas no laboratório são a Aspartato Aminotransferase (AST) e a Alanina Aminotransferase (ALP). As aminotransferases são responsáveis por catalisar a conversão do aspartato e da alanina em oxaloacetato e piruvato, respetivamente. Na ausência de necrose ou isquémia aguda de outros órgãos, em conjunto estas enzimas são muito úteis na deteção de dano hepatocelular. ALT é encontrada fundamentalmente no fígado (em menor quantidade no músculo esquelético e rim), enquanto a AST está amplamente distribuída no organismo, está em quantidades iguais no coração, no músculo esquelético e no fígado. Os valores mais elevados de AST e ALP no plasma são encontrados em situações agudas tais como hepatites virais, isquémia hepática e necrose hepática provocada por fármacos e toxinas. Antes da manifestação clínica de icterícia, AST e ALT podem estar normais ou moderadamente elevadas em casos de obstruções hepáticas (27). No caso de uma elevação isolada da AST podemos estar perante outras patologias, como enfarte do miocárdio, pois esta enzima tem uma concentração elevada no músculo cardíaco. No entanto, também pode

aparecer em distrofias musculares e dermatomiosite. Nas patologias do músculo-esquelético estriado a creatina cinase também está aumentada (27). Na maioria das vezes, a ALT tem maior atividade que a AST, mas há exceções a referir, como a hepatite alcoólica, a cirrose hepática e o cancro hepático. Nas hepatites virais e outras formas de necrose hepática, os valores de atividade destas enzimas aumentam antes dos sinais clínicos e do aparecimento de sintomas. A atividade das enzimas pode ser bastante elevada, chegando a alcançar valores de 100 vezes maiores ou mais que o referido valor de referência. Quando a persistência da ALT se prolonga por mais de 6 meses após um episódio de hepatite aguda, é usada também como indicadora de uma hepatite crónica (27).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Métodos enzimáticos cinéticos, com leitura espectrofotométrica no UV. A diminuição na absorvância com o tempo, devida à conversão de NADH em NAD, é diretamente proporcional às atividades de AST e ALT (28).

AST



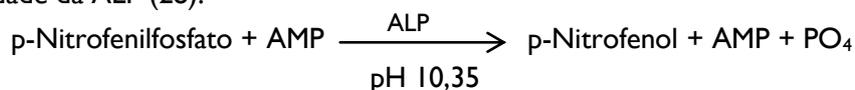
ALT



▪ **Colestase**

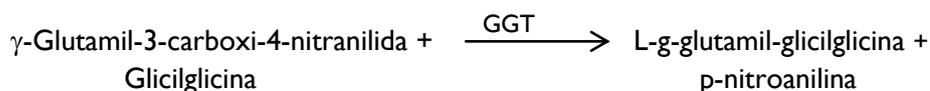
Fosfatase Alcalina (ALP): esta enzima está distribuída largamente em todos os tecidos, mas as maiores atividades são encontradas no fígado, osso, rim e placenta. A utilidade clínica da ALP reside no facto de ajudar a diferenciar doença hepatobiliar de patologias ósseas associada a aumento da atividade de osteoblastos. No fígado a enzima está localizada nas células dos canalículos biliares, sendo por isso é um bom marcador de obstrução biliar extra-hepática, por cálculo no canal biliar comum ou de colestase intrahepática provocada por fármacos ou cirrose biliar primária, apresentando-se aumentada na corrente sanguínea nestas situações. A ALP pode também estar aumentada no plasma em doenças relacionados com os ossos, como um tumor metastizante com reação osteoblástica ou a Doença de Paget. Esta enzima também apresenta aumentos de atividade no plasma nalgumas situações fisiológicas como o crescimento e a gravidez (27).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Método enzimático colorimétrico por técnica cinética. A variação da absorvância causada pela formação de p-nitrofenol é diretamente proporcional à atividade da ALP (28).



$\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT): é uma enzima localizada nas membranas em altas concentrações no rim, fígado, pâncreas, intestino e próstata, mas não no osso. GGT ajuda a diferenciar a causa do aumento de atividade de ALP no plasma, uma vez que os teores mais elevados de GGT são observados na obstrução biliar. A GGT é uma enzima hepática microssomal, indutível pela ingestão de álcool ou de certos fármacos, sendo um parâmetro sensível para a colestase causada pela ingestão de álcool ou fármacos. Em contraste com a ALP, não ocorre aumento plasmático da atividade de GGT nas patologias de carácter ósseo (27).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Método enzimático, colorimétrico com leitura cinética. A variação da absorvância causada pela formação de p-nitroanilina, catalizada pela GGT, é proporcional à atividade desta enzima (28).



### 2.2.6 Avaliação da função pancreática

O pâncreas é uma glândula que está envolvida no processo digestivo, mas está localizada fora do aparelho gastro-intestinal. É composto de tecido endócrino e exócrino. As funções endócrinas do pâncreas incluem a produção das hormonas insulina e glucagon; ambas envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono. A função exócrina envolve a produção do suco pancreático e de muitas enzimas usadas no processo digestivo.

Doenças pancreáticas podem ser agrupadas em: patologias das células dos ilhéus pancreáticos como a Diabetes Mellitus (deficiência de insulina) e excesso de glucagon; insuficiência exócrina, com malabsorção associada; patologias inflamatórias, como a pancreatite aguda e crónica; patologias neoplásicas como adenocarcinomas e tumores das células dos ilhéus, que podem levar a obstrução biliar se a massa cancerígena ocorrer na cabeça do pâncreas (29).

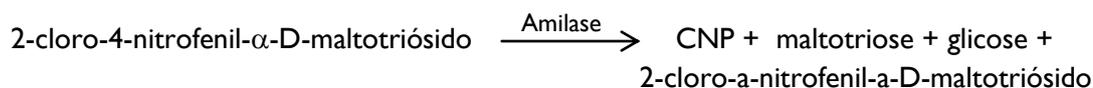
Dependendo da etiologia e do quadro clínico, deve suspeitar-se do envolvimento da função pancreática quando há aumento de  $\alpha$ -amilase e de lipase. A determinação das

atividades da  $\alpha$ -amilase no soro e na urina e da lipase no soro são as análises de rotina mais frequentes na avaliação da função pancreática.

### *Amilase*

A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que pertence à classe das hidrolases e catalisa a hidrólise do amido e do glicogénio, sendo determinante para a digestão dos hidratos de carbono. É produzida pelas glândulas salivares e pelas células acinares do pâncreas. O doseamento da  $\alpha$ -amilase no soro e na urina tem significado clínico, em particular, no diagnóstico da pancreatite aguda. Outras patologias de tecidos, que não do pâncreas, também podem originar o aumento dos níveis da amilase. Por esta razão, um nível elevado de  $\alpha$ -amilase é um dado não específico de patologia pancreática. No entanto, o aumento da  $\alpha$ -amilase é útil no diagnóstico diferencial de pancreatite aguda (30).

- **Amostra:** Soro, plasma e urina humanos.
- **Metodologia:** Método enzimático, colorimétrico, com leitura cinética. A amilase catalisa a hidrólise do derivado de maltotriose, libertando maltotriose e 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), composto corado cuja absorvância é diretamente proporcional à atividade da amilase (32).

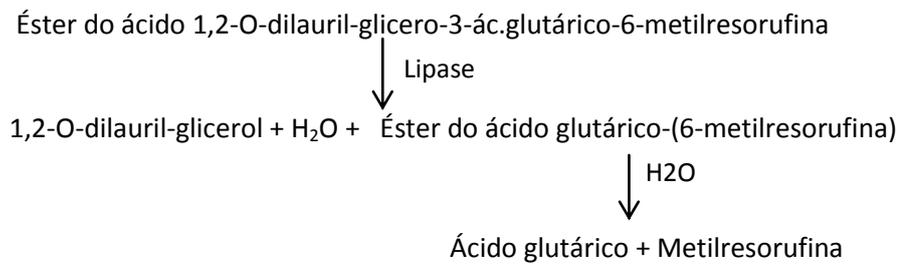


### *Lipase*

A lipase de origem pancreática é uma enzima que catalisa a degradação dos triglicéridos da dieta a glicerol e ácidos gordos. A sua determinação no plasma pode ser útil para diferenciar patologias pancreáticas ou salivares como causa da elevação da amilase no plasma.

A análise da atividade plasmática de lipase é realizada, em geral, para o diagnóstico de pancreatite aguda, sendo considerada mais específica que a amilase. Quer a amilase quer a lipase aumentam rapidamente neste tipo de patologia, mas o aumento de lipase persiste durante aproximadamente 5 dias, enquanto o nível aumentado de amilase persiste por 2 ou 3 dias (30).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Método colorimétrico enzimático, com leitura por técnica cinética. O éster do ácido glutárico-(6metilresorufina) formado pela clivagem do substrato indicado pela lipase, decompõe-se espontaneamente formando metil-resorufina cuja absorvância a 577 nm é proporcional à atividade de lipase na amostra (32).



### 2.2.7 Determinações lipídicas e risco cardiovascular

Os lípidos têm funções importantes em quase todos os aspetos do nosso organismo: servem como fonte de energia, ajudam na digestão, desempenham funções hormonais e são componentes estruturais nas membranas celulares. No entanto, os lípidos e as lipoproteínas desempenham um papel crucial no desenvolvimento de aterosclerose, causa subjacente de problemas cardiovasculares, tais como enfarte do miocárdio, doença vascular periférica ou acidentes vasculares cerebrais.

As concentrações séricas das lipoproteínas diferem no adulto consoante o sexo, principalmente como resultado das diferenças nos níveis das hormonas sexuais. As mulheres têm, em média, níveis mais elevados de colesterol HDL (col-HDL) e níveis mais baixos de colesterol total e triglicéridos, que os homens. As diferenças no colesterol total, contudo, desaparecem depois da menopausa, à medida que os estrogénios diminuem. As concentrações de col-HDL geralmente mantêm-se estáveis depois da puberdade e não diminuem nas mulheres após a menopausa.

Doenças associadas a concentrações lipídicas anormais são referidas como dislipidémias. Estas podem ser causadas diretamente por anomalias genéticas, desequilíbrios ambientais ou do estilo de vida, ou podem desenvolver-se secundariamente a outras doenças.

Os lípidos e as lipoproteínas são indicadores importantes na avaliação de risco de Doença Cardiovascular. E esta é, sem dúvida, a principal razão para a sua determinação em laboratório (33).

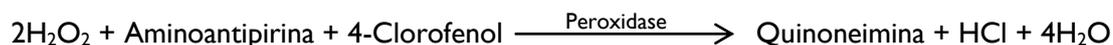
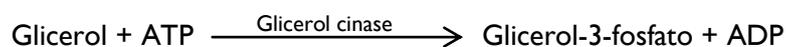
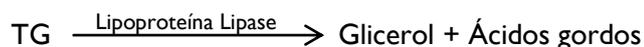
#### *Triglicéridos*

Cerca de 98 a 99% da gordura encontrada na dieta é composta por triglicéridos (TG). O organismo armazena grandes quantidades de TG no tecido adiposo, cuja função primária é a de fornecer energia às células. Esta forma de reserva energética é altamente eficiente dada a magnitude da energia libertada quando os ácidos gordos sofrem o seu catabolismo (34).

A avaliação dos TG deve ser feita em conjunto com o colesterol e os outros parâmetros lipídicos, pois é a integração de todos estes parâmetros que se torna importante no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares.

Existem ainda doenças genéticas, como a hipertrigliceridemia familiar, em que os triglicerídeos chegam a atingir 10 x o seu valor normal e que, por isso, devem ser monitorizados frequentemente. A determinação de triglicéridos é utilizada no diagnóstico e monitorização da terapêutica de doentes com diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática e de outras doenças relacionadas com o metabolismo dos lípidos, bem como de diversas patologias endócrinas (34).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Método enzimático, colorimétrico, com leitura de ponto final. A variação na absorvância a 510 nm devida à formação de quinoneimina é diretamente proporcional à quantidade de TG na amostra (35).



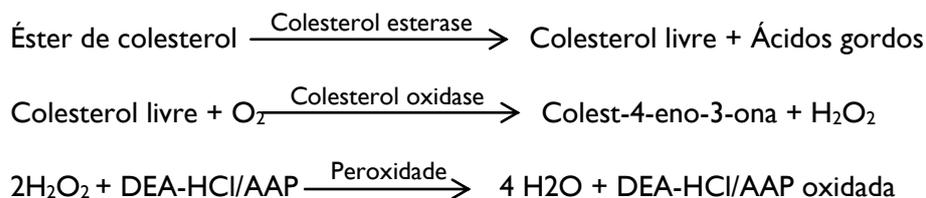
#### *Colesterol total*

O colesterol é encontrado quase exclusivamente em animais e é um elemento chave das membranas das células. Devido à associação positiva entre as concentrações plasmáticas de colesterol e a doença cardíaca coronária, pensa-se muitas vezes no colesterol como uma substância prejudicial. Mas o colesterol é essencial para o normal funcionamento do organismo (34).

O colesterol é proveniente quer da dieta quer da síntese endógena *de novo*. No plasma é transportado principalmente por duas classes de lipoproteínas, LDL e HDL, que têm um papel contrário na patogénese da aterosclerose. Por isso, para além do colesterol total é importante a determinação do colesterol ligado às LDL (col-LDL) e às HDL (col-HDL).

As diferentes determinações de colesterol no plasma são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças ateroscleróticas. As determinações de colesterol são também utilizadas no diagnóstico de doenças metabólicas que envolvem lípidos e lipoproteínas. A concentração de colesterol total sérico depende de muitos fatores, tais como a idade, sexo, dieta, atividade física, doenças hepáticas e outras doenças metabólicas (34).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Método enzimático, colorimétrico com leitura de ponto final. A absorvância medida a 540 nm de N,N-dietilanilina-HCl/4aminoantipirina (DEA-HCl/AAP) oxidada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libertado na reação catalizada pelo colesterol oxidase, é diretamente proporcional à concentração de colesterol total (35).

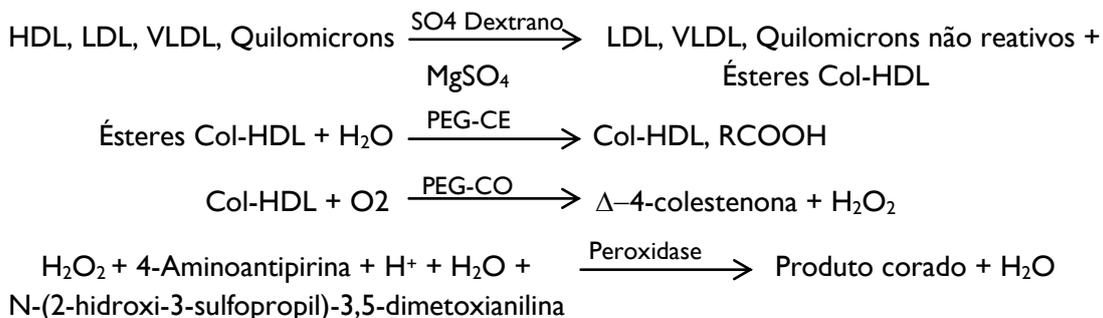


### Colesterol-HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL – High Density Lipoproteins) são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado. No fígado, o colesterol é transformado em sais biliares, que são excretados para o intestino através das vias biliares, juntamente com algum colesterol livre (35).

A concentração de HDL no plasma é determinada nos Laboratórios de Análises Clínicas em termos de colesterol (col-HDL), parâmetro que é clinicamente importante monitorizar, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de HDL e o risco de doença aterosclerótica. Assim, dentro do intervalo de referência, os valores elevados são considerados benéficos para o organismo. Concentrações reduzidas de col-HDL, associadas a teores altos de TG são fatores de risco cardiovascular.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** As lipoproteínas de maior dimensão são precipitadas e o colesterol das HDL no sobrenadante é quantificado pelo método enzimático, colorimétrico, com leitura por de ponto final. A intensidade da cor do corante formado que se mede a 600 nm é diretamente proporcional à concentração sérica de col-HDL (35).



### Colesterol-LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL – Low Density Lipoprotein) são os principais transportadores de ésteres de colesterol para os tecidos periféricos e derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL – Very Low Density Lipoproteins), que são sintetizadas no fígado. A sua remoção é mediada por recetores específicos para LDL, que se encontram em grande quantidade à superfície dos hepatócitos. O seu aumento no plasma tem sido correlacionado fortemente com a formação da placa aterosclerótica.

A penetração e retenção na parede dos vasos sanguíneos das lipoproteínas, nomeadamente das LDL, é um dos fatores que desencadeiam a formação da placa aterosclerótica. As LDL passam através do endotélio vascular e são retidas na matriz intercelular da íntima (camada sub-endotelial). Aqui, as LDL são sujeitas à ação oxidativa de diversas espécies químicas reativas sintetizadas pelas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos. As LDL oxidadas podem atrair os monócitos de circulação, induzir a sua adesão ao endotélio, estimular a formação das *foam cells*, lesar as células endoteliais, induzir a migração das células musculares lisas e a sua proliferação, interferir com a vasodilatação dependente do endotélio e promover a trombose. A hipercolesterolemia prolongada com concentrações elevadas de LDL no sangue aumentam a concentração destas na íntima, aumentando o tempo da sua permanência e consequentemente aumentando a sua exposição às espécies oxidantes.

Entre todos os parâmetros determinados, o col-LDL tem um valor preditivo clínico muito importante em relação à aterosclerose coronária.

As estratégias terapêuticas atualmente adotadas têm por objetivo a redução lipídica e como principal alvo o LDL-col, levando a um melhoramento da função endotelial e à prevenção da aterosclerose, reduzindo a sua progressão e evitando a rutura das placas.

A sua determinação na rotina do laboratório é feita, na maioria dos casos, de forma indireta através da fórmula de Friedwald:

$$\text{Col-LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{TG}/5 + \text{col-HDL})$$

Esta pode ser utilizada sempre que o valor de triglicéridos não ultrapassar os 400 mg/dl, para se obter um resultado válido (35).

#### *Proteína C-reativa de Alta Sensibilidade (hsCRP)*

A doença arterial coronária é hoje descrita não só como uma patologia associada à deposição dos lípidos na parede arterial, mas também como uma patologia subjacente a inflamação desta, de baixo grau.

A inflamação desempenha um papel crucial na adesão celular que inicia o processo aterosclerótico e na progressão e rutura das placas aterotrombóticas. A resposta inflamatória é facilmente medida através da determinação da proteína C-reativa (CRP) usando métodos de elevada sensibilidade (*hsCRP*).

Em vários estudos epidemiológicos realizados em homens e mulheres, aparentemente saudáveis, a sua concentração provou repetidamente poder ser usada como um marcador independente de prognóstico do aparecimento (e recorrência) de acidentes vasculares.

Como tem uma semi-vida longa e a sua concentração não é afetada pelo consumo de alimentos, pode ser medida a qualquer hora do dia (36).

Em situações de urgência, um valor aumentado de *hsHCRP* prognostica instabilidade em doentes com dor no peito; e em doentes com síndrome coronário agudo, este aumento está associado a aumento da mortalidade cardíaca (mesmo quando outros biomarcadores de necrose do miocárdio como a troponina são negativos).

Dados de múltiplos estudos demonstraram que entre indivíduos saudáveis, a concentração de *hsCRP* é estável por longos períodos de tempo e que variações de década para década ou ano para ano mostram correlação comparável às do colesterol e pressão arterial (36).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Imunonefelometria. A intensidade da luz difundida pelos agregados de anticorpos específicos-CRP, medida por nefelometria, é proporcional à concentração de CRP na amostra, o resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida.

## 2.3 Setor Laboratorial de Imunologia

### 2.3.1 Equipamentos e Princípios das Metodologias Utilizadas

#### *Equipamentos*

##### ▪ ***Immulite 2000 Immunoassay System***

Analizador automatizado da Siemens para reações imunoquímicas, que executa imunoensaios de quimioluminescência. Permite a realização de análises no âmbito da Endocrinologia, Marcadores tumorais, Imunoserologia, Alergologia, etc. Este autoanalizador utiliza, como fase sólida, esferas de poliestireno revestidas com anticorpos ou antigénios específicos de cada ensaio num tubo de reação próprio. É onde decorre a reação imune durante todo o tempo até à emissão do sinal. Após a incubação com a esfera, a amostra é incubada uma segunda vez com um reagente marcado com fosfatase alcalina. Entre incubações, o tubo é sujeito a várias lavagens muito rápidas, com remoção do sobrenadante por centrifugação. No final, a esfera permanece no tubo de reação sem quaisquer moléculas não ligadas. A camada ligada é então quantificada utilizando o substrato quimioluminescente de dioxetano para produzir luz. A reação da quimioluminescência consiste na reação do substrato com a fosfatase alcalina ligada à esfera, associada ao complexo formado na esfera. A enzima desfosforila o dioxetano, formando um intermediário instável que emite luz quando se decompõe. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de analito ligado ao

anticorpo ou antígeno específicos na esfera, originalmente presente na amostra. Esta emissão de luz é detetada pelo fotomultiplicador e quantificada.

- **Advia Centaur XP Immunoassay System**

Analisador automatizado de imunoensaios da *Siemens*, que utilizam a tecnologia quimioluminescente direta. Quando uma reação de quimioluminescência é utilizada em combinação com um imunoensaio, a luz produzida pela reação indica a quantidade de analito numa amostra. Os ensaios do *ADVIA Centaur XP* utilizam éster de acridina (EA) como o marcador quimioluminescente, uma vez que este não exige a adição de um catalisador ou de um substrato. A molécula deste marcador é de muito menor massa molecular do que a da fosfatase alcalina utilizada nos ensaios EIA – *Enzyme Immunoassay*, o que diminui o bloqueio dos locais de ligação, aumenta as taxas de difusão e aumenta a sensibilidade do ensaio.

Nos imunoensaios, o antígeno é mais, frequentemente, o analito que se pretende medir. O EA pode ligar-se de forma covalente a um anticorpo específico, sem alterar a capacidade deste para se ligar ao respetivo antígeno. Muitos ensaios do *ADVIA Centaur XP* utilizam anticorpos ligados de forma covalente ao EA para medir antígenos - analitos. A Fase Sólida são cristais de óxido de ferro atraídos por um campo magnético revestidos por anticorpos específicos, designados por Partículas Paramagnéticas (PPM), facto que o distingue do sistema atrás referido *Immulite 2000*. Durante a incubação, na cuvete de reação as PPM revestidas ligam-se ao antígeno alvo da amostra que, por sua vez, se liga ao reagente anticorpo marcado com EA. Quando o sistema expõe a cuvete a um campo magnético, os ímanes atraem as PPM ligadas ao antígeno da amostra e ao marcador quimioluminescente. Enquanto os ímanes mantêm as PPM no devido lugar, o sistema lava a amostra e o reagente não ligados às PPM revestidas. O sistema *ADVIA Centaur XP* mede diretamente a quantidade de luz emitida pelo EA quando este é oxidado pelo reagente oxidante ( $H_2O_2$ ), que é proporcional à concentração do antígeno ligado ao anticorpo marcado. O sistema *ADVIA Centaur XP* aplica os princípios de ligação dos anticorpos do imunoensaio utilizando diversos formatos: formato do tipo *sandwich*; formato competitivo; formato de captura de anticorpos.

- **VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)**

Trata-se de um auto-analisador para imunoensaios da *bioMérieux S.A.* Este equipamento utiliza a técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), que consiste na combinação do método ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*) com uma leitura final em fluorescência. A reação decorre em fase sólida (cone), os determinantes antígenos/anticorpos da amostra são capturados pelas imunoglobulinas monoclonais/antígenos fixados no cone e, após

lavagem dos componentes não fixados, o anticorpo marcado com a enzima- fosfatase alcalina liga-se aos determinantes antigénios.

Uma segunda lavagem elimina o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato é hidrolisado a um composto que tem a propriedade de reemitir a luz a 450 nm após excitação a 370 nm. O produto final emite fluorescência proporcional à concentração dos determinantes antigénios.

Os cones são o suporte de pipetagem e a fase sólida da reação, estando sensibilizados com antigénios (Ag) ou anticorpos (Ac). A barrete contém os reagentes necessários à reação. Os reagentes são unitários e de uso único, tendo a vantagem de ausência de contaminação.

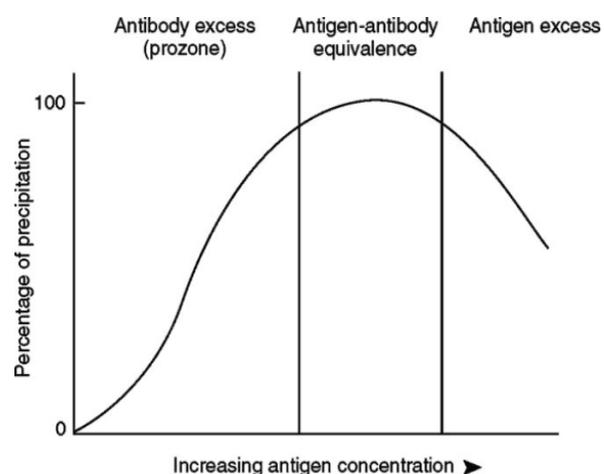
### Imunoensaios

Num imunoensaio uma molécula de anticorpo (Ac) reconhece e liga-se a um antigénio (Ag). A molécula com interesse para o teste pedido tanto pode ser o Ac como o Ag. Esta ligação está relacionada com a concentração de cada reagente, a especificidade do Ac para o Ag, a afinidade e avidéz do par, e condições ambientais.

A interação Ac-Ag pode envolver reagentes não marcados em técnicas analíticas menos sensíveis, ou reagentes marcados em técnicas mais sensíveis.

#### ▪ Imunoensaio de precipitação

É um método simples em que um Ac reage com moléculas solúveis que possuem determinantes antigénicos (epítops). Pode ocorrer *cross-linking* entre os complexos Ac-Ag, e quando estes complexos têm um tamanho razoável, a interação com a água é limitada ocorrendo a precipitação do complexo se torna insolúvel e precipita (figura 3) (37).



**Figura 3** Curva de precipitação mostrando a quantidade de precipitado versus a concentração de Ag, para uma concentração de constante de Ac (37).

Geralmente, os testes que usam este princípio são qualitativos. Mas também podem ser semi-quantitativos, se forem efetuadas diluições em série da amostra.

- **Imunoensaio de aglutinação**

É um método em que há uma agregação ou aglomeração por partículas de anticorpos específicos (por exemplo, glóbulos vermelhos, esferas de latex) às quais determinantes antigênicos, também específicos, estão anexados (38).

As reações de aglutinação dependem da formação de pontes por Ac bivalentes (IgG) ou multivalentes (IgM) entre partículas com múltiplos determinantes antigênicos. Partículas grandes, como glóbulos vermelhos ou bactérias, têm diferentes antígenos que se repetem centenas de vezes na célula ou superfície da partícula. Por isso, é possível à molécula de Ac ligar-se a mais do que um local numa só partícula ou ligar-se a locais equivalentes em partículas diferentes. Esta ligação é chamada de *cross-linking* e pode levar à formação de complexos de elevado peso molecular que precipitam (38).

As reações de aglutinação são lidas a *olho nu* ou com a ajuda de uma lupa. O resultado geralmente é dado de 1+ a 4+ em caso de aglutinação, ou negativo na ausência de aglutinação.

A aglutinação tem sido utilizada em larga escala como um sistema de detecção devido à facilidade e versatilidade da técnica.

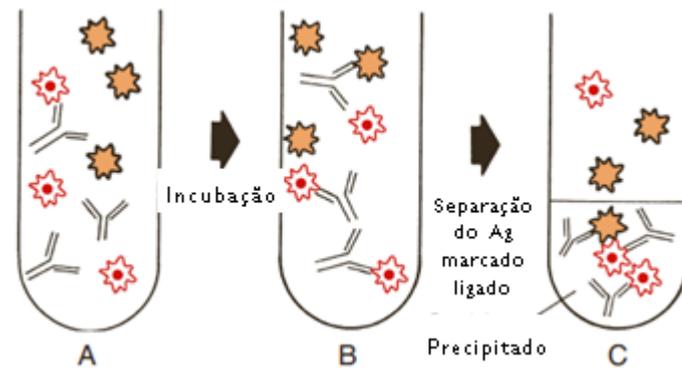
Tal como nos imunoensaios de precipitação, este é também semi-quantitativo.

- **Imunoensaio competitivo**

Neste tipo de ensaio (Figura 4), todos os reagentes são adicionados simultaneamente ou sequencialmente.

No método de adição simultânea, o Ag marcado (com radioisótopo, fluorocromo ou outro agente de detecção) e o Ag da amostra competem para se ligarem ao Ac (reagente) durante o período de incubação. Neste método, a avidéz do Ac pelos dois Ag tem de ser a mesma. Nestas condições, a probabilidade do Ac se ligar ao Ag marcado é inversamente proporcional à concentração do Ag não marcado e que interessa determinar (39, 40).

O imunoensaio competitivo também pode ser realizado em etapas sucessivas. Primeiro a amostra com Ag não marcado é incubada com o Ac (em excesso) e depois é adicionado o Ag marcado. Após uma longa incubação, o Ag marcado ligado ao Ac é medido. Esta abordagem aumenta a sensibilidade analítica do ensaio (39, 40).



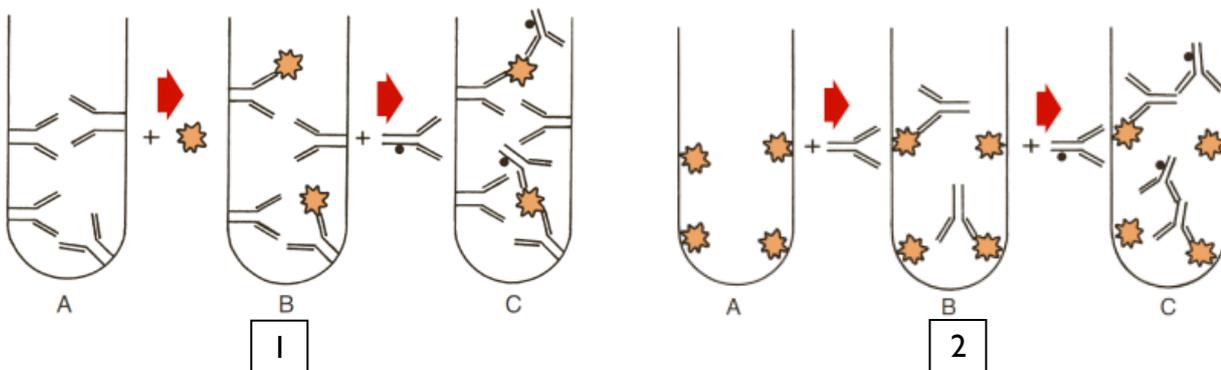
**Figura 4** Imunoensaio competitivo. No método de adição simultânea, o Ag marcado e o Ag da amostra competem para se ligarem ao Ac (40).

▪ **Imunoensaio não-competitivo**

Também conhecido como imunométrico, neste tipo de ensaio pode usar-se um Ac marcado para detetar diretamente o Ag. Tem de haver um excesso de Ac marcado para garantir que não há limitações à reação. A concentração de Ag é diretamente proporcional ao Ac marcado ligado ao mesmo (40).

Nos ensaios formato em *sandwich* para detetar Ag (Figura 5), os Ac específicos são imobilizados numa fase sólida. A amostra é adicionada e as moléculas do Ag aí presentes ligam-se aos Ac. Depois da lavagem para remover moléculas que não reagiram, um Ac marcado (conjugado) é adicionado e vai reagir com um epítipo diferente do Ag da amostra. Depois de nova lavagem para remover o Ac marcado livre, o sinal do Ac marcado é medido e é proporcional ao Ag capturado (39).

Para a deteção de Ac (Figura 5), no ensaio em *sandwich* é imobilizado o Ag na fase sólida, que se vai ligar o Ac da amostra. Após lavagem, é adicionado um Ac marcado que se liga ao Ac já ligado ao Ag. A quantidade de Ac marcado ligado é diretamente proporcional à quantidade de Ac específico presente na amostra (39).



**Figura 5** Imunoensaio não competitivo. Ensaio formato em *sandwich*: 1 - para detetar Ag; 2 - para detetar Ac (40).

▪ **Quimioluminescência**

A quimioluminescência é uma metodologia baseada na utilização de uma reação química em que um dos produtos de reação é a luz. Nas reações quimioluminescentes parte da energia química gerada produz intermediários excitados que decaem para um estado basal com emissão de fótons. A radiação emitida é medida com um fotómetro (quimioluminómetro) e o sinal está dependente da concentração do analito. A quimioluminescência é diferente da fluorescência porque não é necessária radiação de excitação (7).

A maior parte das metodologias de quimioluminescência baseiam-se em reações de oxidação do luminol, ésteres de acridina e dioxetanos, caracterizadas por um rápido aumento na intensidade de luz emitida seguida de uma redução gradual.

Os ésteres de acridina são oxidados na maioria das vezes pelo peróxido de hidrogénio para produzir luz, enquanto os dioxetanos são utilizados como derivados fosfatados de ésteres que, quando hidrolisados, são espontaneamente degradados, emitindo luz como um dos produtos (6).

▪ **ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay**

A técnica ELFA consiste na combinação do método ELISA com uma leitura final em fluorescência.

Os ensaios ELISA usam habitualmente um anticorpo imobilizado num suporte sólido e o ligando é marcado com uma enzima (conjugado). As enzimas utilizadas nos ELISA são úteis como marcadores porque apresentam os seguintes critérios: elevada especificidade de atividade; ligação fácil ao ligando; estabilidade; ausência nos fluidos ou tecidos. Nos ELFA, a enzima ligada utiliza fluorogénios como substrato, sendo a reação detetada por fluorescência.

Para avaliar a presença de um antígeno específico numa amostra, o ELFA pode ser realizado da seguinte forma: um anticorpo, que é específico ao antígeno que se quer detetar, é imobilizado numa superfície sólida. O antígeno da amostra em análise vai ligar-se a esses anticorpos imobilizados, sendo o material não ligado removido por lavagens. Um reagente com um segundo anticorpo específico para o mesmo antígeno ligado a uma enzima é adicionado e consoante a quantidade de antígeno ligado, mais ou menos anticorpo marcado será agora ligado ao antígeno fixado na fase sólida. Finalmente, o substrato enzimático fluorogénico é adicionado e incubado decorrendo uma reação catalisada pela enzima com libertação de um fluorogénio. É medida a intensidade de fluorescência, que é diretamente proporcional à atividade da enzima e conseqüentemente à quantidade de antígeno a determinar na amostra em análise (41).

O método indireto é utilizado para deteção de anticorpos. Neste caso é o antígeno que está imobilizado na fase sólida. O conjugado é, neste caso, um anticorpo anti-imunoglobulina (humana, se forem amostras de soro humano) ligado à enzima. Este conjugado liga-se ao anticorpo presente na amostra e que reagiu com o antígeno imobilizado, levando à formação de ligação antígeno-anticorpo. Adiciona-se o substrato fluorogénico e procede-se tal como igual ao mencionado no parágrafo anterior.

### 2.3.2 Serologia Infeciosa

#### *Técnicas manuais*

##### ▪ **Reação de Waaler-Rose**

É um teste para deteção dos fatores reumatóides de classe IgM no soro humano por uma reação de Waaler-Rose modificada.

Os fatores reumatóides (FR) foram descritos inicialmente por Waaler e Rose como imunoglobulinas presentes no soro de pessoas com poliartrite reumatóide e que aglutinam os glóbulos vermelhos de carneiro cobertos com IgG de coelho. Estes FR são anticorpos dirigidos contra o fragmento Fc das Imunoglobulinas humanas e animais. Estes anticorpos pertencem essencialmente à classe das IgM. Esta é a base da reacção de Waaler-Rose que é um método de hemaglutinação para determinação semi-quantitativa do FR no soro humano. A deteção dos FR é importante para o diagnóstico da poliartrite reumatóide, embora não sejam específicos desta. Não são detetados em todos os casos desta patologia e podem estar presentes tanto em pessoas sãs como em pessoas com outras doenças.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Reação de aglutinação em carta.

##### ▪ **Reação da Rosa de Bengala**

A brucelose humana é uma antropozoonose muito frequente no mundo provocada por *Brucella* spp. A brucelose tem sido descrita como a zoonose mais disseminada pelo mundo e tem repercussões importantes tanto para a saúde pública como para a economia quando infeta animais domésticos. Em Portugal esta doença é de declaração obrigatória.

Das espécies que provocam brucelose em humanos, a *Brucella melitensis* é a responsável pela doença com maior gravidade. No homem, também é chamada de febre de Malta, melitococcia, febre mediterrânica ou febre de Gibraltar. O contágio pode ser direto, por contacto com o animal infetado, ou indireto, através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados e queijo não curado feito com leite cru. A contaminação acidental em laboratório é uma das infeções mais comuns adquiridas em laboratório. No homem é um

parasita intracelular, instalando-se no sistema reticuloendotelial, podendo aparecer no baço, fígado, medula óssea, nódulos linfáticos e rins. Após exposição à bactéria pode formar-se um abscesso localizado e aparecer bacteriemia. A doença tem como sintomas iniciais febre intermitente, mal-estar, suores, fraqueza e emagrecimento (42).

O diagnóstico baseia-se em critérios bacteriológicos e em testes serológicos. O isolamento de *Brucella* a partir de culturas de sangue, medula óssea ou outros tecidos estabelece o diagnóstico de brucelose. A nível serológico, a demonstração da resposta dos anticorpos específicos para *Brucella* pode ajudar no diagnóstico. Os testes serológicos de aglutinação, como a reacção da Rosa de Bengala, são bastantes utilizados na prática laboratorial. Um aumento igual ou superior a quatro no título determinado pelos teste serológicos de aglutinação, em duas amostras sucessivas, é considerado como indicador de positividade (42).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Reacção de aglutinação em lâmina

#### ▪ **Reacção de Widal**

As salmoneloses são infeções provocadas por bactérias de gram-negativo da família das Enterobactérias: *Salmonella spp.* A serotipagem baseia-se na reatividade imunológica dos antígenos somáticos “O”, que são predominantemente lipopolissacáridos, e dos antígenos capsulares “H”.

As estirpes de *Salmonella* são categorizadas em tifoídes e não tifoídes, consoante o síndrome a que estão associadas. Os vários serotipos não-typhi de *Salmonella enterica* causam habitualmente gastroenterites, que podem durar uma semana ou mais. *Salmonella spp.* é ubíqua na população animal e a doença no homem está geralmente relacionada com a ingestão de alimentos e águas contaminados com fezes humanas (43).

A Febre Tifoide, causada por *Salmonella enterica* serotipo *Typhi*, é uma infeção grave com bacteriemia. As estirpes serotipo Paratyphi causam um síndrome similar à febre tifoide.

As manifestações clínicas e a gravidade de infeção depende do serotipo envolvido, é por isso importante distinguirmos as Salmonelas typhi dos serotipos paratyphi.

Quando o organismo humano é invadido por um agente patogénico microbiano, uma variedade de anticorpos é formada. Entre estes anticorpos estão as aglutininas. O soro contendo aglutininas específicas em combinação com o antígeno correspondente, em condições apropriadas e controladas, é capaz de causar aglutinação visível (43).

A Febre Tifoide é uma doença de declaração obrigatória.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Reação de aglutinação em lâmina ou em tubo. A reação em lâmina inclui um conjunto de 4 antígenos: *Salmonella* O, *Salmonella* flagelar grupo a, *Salmonella* flagelar grupo b, *Salmonella* flagelar grupo d (H). A reação em tubo é utilizada para determinar e confirmar titulações inferiores a 1/160.

#### ▪ **RPR – Rapid Plasm Reagin Test**

Os testes serológicos para o *Treponema pallidum*, agente infeccioso da sífilis, são divididos em métodos não-treponémicos e métodos treponémicos. Os métodos não-treponémicos, no qual se inclui o teste em questão, detetam os anticorpos anti-*Treponema pallidum*, designados por reaginas, anticorpos IgM e IgG reativos ao antígeno composto por um complexo de cardiolipina e outros lípidos libertados das células danificadas e dos treponemas, como colesterol e lecitina, agregados a micropartículas de carvão (44).

Estes métodos são utilizados para rastreio de sangue de dadores, rastreio rápido de doentes suspeitos de sífilis, para monitorizar a resposta imunológica ao tratamento e para utilização em programas de rastreio de indivíduos saudáveis ou grupos da população. As limitações destes métodos incluem: a falta de sensibilidade nos estádios iniciais e mais tardios de sífilis; os falsos positivos; uma reação prozona (falsos negativos devido ao elevado quociente de anticorpo/antígeno) (44).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Teste de aglutinação em lâmina.

#### ▪ **Reação de Paul Bunnell**

A reação de Paul Bunnell é um teste de aglutinação para a deteção qualitativa dos Ac heterófilos associados à mononucleose infecciosa em soro humano.

A mononucleose infecciosa (MNI) corresponde à infeção primária provocada pelo vírus de Epstein-Barr (EBV). Nos países desenvolvidos observam-se dois picos de infeção: o primeiro nas crianças em idade pré-escolar (1-6 anos); o segundo nos adolescentes e nos adultos jovens (14-20 anos). Os sintomas da MNI são pouco específicos: febre, faringite, adenopatia, que pode evocar diversas patologias ( toxoplasmose, infeção por CMV, entre outras) (45).

Os Ac heterófilos são Ac da classe IgM, que reagem com glóbulos vermelhos de carneiro ou de cavalo, não específicos para mononucleose infecciosa podendo estar presentes em outras patologias como infeção por citomegalovírus, malária, rubéola, hepatite infecciosa, leucemias e linfomas.

Este é um teste de rastreio e de absorção diferencial pois permite classificar as aglutininas heterófilas encontradas, explorando a particularidade dos Ac heterófilos que

surtem na mononucleose de serem absorvidos pelos glóbulos vermelhos de boi e de não serem absorvidos pelo rim de cobaia, permitindo assim excluir outros anticorpos heterófilos (45).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Teste de aglutinação em lâmina. O teste é constituído por glóbulos vermelhos de cavalo, glóbulos vermelhos de boi e células de rim de cobaia (contém antigénios de Forssman). O teste de rastreio permite a deteção de uma aglutinação de glóbulos vermelhos de cavalo pelos anticorpos heterófilos associados à MNI, mas também pelos anticorpos do tipo de Forssman não específicos. No caso de positividade do teste de rastreio, o teste de absorção diferencial permite distinguir os anticorpos associados à MNI dos anticorpos não específicos: absorção dos anticorpos não específicos pelo antigénio de rim de cobaia, e absorção dos anticorpos associados à MNI pelo antigénio de boi (45).

#### *Serologia na Grávida – Deteção dos Agentes TORCH*

As doenças infeciosas alteram a saúde da mulher, podendo influenciar negativamente a sua função reprodutora. Quando associadas à gravidez, as doenças infeciosas assumem especial relevo e colocam três questões particulares: o tratamento da doença da mãe; o efeito da infeção no curso da gravidez; a influência sobre o feto não só da doença materna, mas também da terapêutica utilizada (46).

O rastreio das doenças infeciosas de transmissão vertical durante a gravidez é de extrema importância e, muitas vezes, o único meio disponível para suspeitar que um recém-nascido assintomático pode estar infetado. Em Portugal estão bem estabelecidos os exames a realizar durante a gravidez e a respetiva periodicidade.

O diagnóstico precoce e correto e o tratamento atempado contribuem para reduzir o risco de complicações, fazendo diminuir a morbidade e mortalidade perinatal e infantil. A prevenção é, sem dúvida, o meio mais simples e eficiente de o fazer. Prevenir as complicações é, antes de tudo, evitar as doenças (46).

O acrónimo TORCH foi formulado em 1971 para chamar a atenção para um grupo de agentes infeciosos que afetam o feto e o recém-nascido. Corresponde a **T**oxoplasmose, **R**ubéola, infeção pelo **C**itomegalovírus, e infeção pelo vírus **H**erpes Simplex. Estes patogénicos produzem achados clínicos e laboratoriais semelhantes, e naquela altura houve a necessidade de encorajar o desenvolvimento de testes laboratoriais aperfeiçoados para o diagnóstico destes agentes em particular (47).

#### ▪ **Toxoplasmose**

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular capaz de infetar a maioria dos mamíferos, incluindo humanos. Sabe-se que a infeção pode seguir-se à ingestão de alimentos contaminados por oócitos (geralmente através das fezes de gatos) ou carne mal cozida contendo quistos de *Toxoplasma gondii*. Mais raramente pode acontecer por transplante de

um órgão infetado com quistos num indivíduo seronegativo e transfusões de sangue contaminados com taquizoítos. Estudos seroepidemiológicos indicam que a infecção é comum, embora a doença clínica seja rara (46).

A toxoplasmose pode ser dividida em quatro grupos: adquirida em indivíduos imunocompetentes, adquirida ou reativada em indivíduos imunodeficientes, congênita e ocular.

A infecção adquirida pelo *Toxoplasma* em indivíduos imunocompetentes é geralmente uma infecção assintomática. Os sintomas mais comuns são: linfadenopatia local (cervical) ou generalizada, febre e rash cutâneo; pode haver confusão com mononucleose ou infecções víricas (*Citomegalovírus*, p.ex.).

A toxoplasmose congênita resulta de uma infecção primária adquirida pela mãe durante a gravidez. A incidência e a severidade da toxoplasmose congênita dependem do trimestre de gravidez no qual a infecção foi adquirida. Quando a infecção materna se verifica no último trimestre, a transmissão ao feto é mais frequente, mas a doença do recém-nascido é quase sempre subclínica. Por outro lado, se a infecção ocorre no início da gravidez, a transmissão fetal é menos frequente, mas a doença no recém-nascido é mais grave. Grávidas com infecção crónica não contaminam o feto durante o desenvolvimento intrauterino (48).

A infecção fetal pode dar-se por dois mecanismos: migração transplacentária durante a parasitemia materna, como consequência de infecção aguda durante a gravidez; ou por via transplacentária ou transamniótica, a partir de quistos de toxoplasma acantonados no endométrio numa infecção latente pré-concepcional (46). Dado que o tratamento da mãe reduz a gravidade dos sintomas na criança devido à infecção congénita, o diagnóstico preciso e imediato é extremamente importante.

O diagnóstico da doença ativa é feito através da titulação de Ac específicos para o *Toxoplasma gondii* (Tabela 8). Os valores dos títulos dependerão da técnica usada pelo laboratório: aglutinação direta, aglutinação indireta, imunofluorescência e imunoenzimática (46).

No diagnóstico serológico, se a mulher grávida apresentar no soro 2 colheitas de sangue consecutivas (com 3 a 4 semanas de intervalo) IgG positiva e IgM negativa (primoinfecção sem IgM), ou 1 colheita com IgG e IgM positivas, deverá fazer-se o teste de Avidéz (IgG) para datação da infecção. A avidéz pode definir-se como a medida da força total de ligação de um antigénio com múltiplos determinantes com anticorpos multivalentes. O teste da avidéz dos anticorpos IgG é baseado na maior força das ligações iónicas entre os antigénios e os anticorpos produzida por infeções antigas, quando comparada com as infeções recentes. Em caso de Avidéz forte a infecção ocorreu há mais de 4 meses. No caso de Avidéz fraca/intermédia não se pode excluir a hipótese de infecção recente (46, 48).

**Tabela 8:** Interpretação dos títulos serológicos da Toxoplasmose na grávida (46).

	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Medidas</b>
<b>IgG - / IgM -</b>	Ausência de infecção (ausência de imunidade)	Vigilância serológica mensal e medidas de prevenção da infecção
<b>IgG + / IgM -</b>	Infeção relativamente antiga (imunidade) ou Primoinfecção sem IgM	A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde: . IgG estáveis/IgM neg – Imunidade antiga . IgG aumentadas/IgM neg – Primoinfecção sem IgM. Realizar Teste de avidéz para datação da infecção.
<b>IgG - / IgM +</b>	Infeção recente	A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde: . IgG - / IgM + - IgM não específica . IgG +/ IgM + - Primoinfecção
<b>IgG + / IgM +</b>	Infeção relativamente recente	Determinação da avidéz: . Avidéz forte – a infecção ocorreu há mais de 4 meses . Avidéz fraca/intermédia – não se pode excluir a hipótese de infecção recente. A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para determinação de IgG e de IgM:** Imunoensaio não-competitivo de fase sólida, com leitura por quimioluminescência
- **Metodologia para a determinação da Avidéz:** Imunoensaio não-competitivo em formato sandwich, com deteção final em fluorescência (ELFA).

#### ▪ **Rubéola**

O Homem é o único reservatório deste vírus. A transmissão ocorre por contacto direto com as secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas (ou por via placentária). O período de maior contágio situa-se, aproximadamente, entre uma semana antes e uma semana depois do aparecimento do *rash*. O período de incubação é de 14-21 dias. Há maior incidência da doença no final do inverno e princípio da primavera.

A rubéola congénita é uma doença de declaração obrigatória. Durante a virémia materna a placenta é atingida, colocando em risco o feto, cujo futuro pode ficar comprometido, podendo ocorrer aborto espontâneo, nado-morto, malformações congénitas (com mortalidade de 5-35%) ou recém-nascido aparentemente normal. A intensidade do envolvimento fetal parece depender da idade gestacional, da agressividade do vírus e da suscetibilidade racial ou genética. A transmissão fetal é mais frequente no 1.º trimestre, parecendo que a placenta madura funciona como barreira à passagem do vírus,

condicionando infeções fetais menos graves, à medida que a idade gestacional aumenta (46, 49).

Existem vários testes serológicos para deteção de anticorpos para o vírus da rubéola. O primeiro teste serológico deve ser realizado antes da conceção, mesmo se a mulher foi vacinada. Se a mulher já estiver grávida, o teste deve ser feito o mais precocemente possível e com o doseamento simultâneo de IgG e IgM específicas. A tabela 9 apresenta a interpretação dos títulos serológicos na rubéola (46).

**Tabela 9:** Interpretação dos títulos serológicos na Rubéola (46).

	<b>Tipo de infeção</b>	<b>Medidas</b>
<b>IgG - / IgM -</b>	Ausência de infeção (ausência de imunidade)	Vigilância serológica mensal e medidas de prevenção da infeção
<b>IgG + / IgM -</b>	Infeção relativamente antiga (imunidade) ou Primoinfeção sem IgM	A confirmar com 2 <sup>a</sup> amostra 3 semanas mais tarde: . IgG estáveis/IgM neg – Imunidade antiga . IgG aumentadas/IgM neg – Primoinfeção sem IgM.
<b>IgG - / IgM +</b>	Infeção recente	A confirmar com 2 <sup>a</sup> amostra 3 semanas mais tarde: . IgG - / IgM + - IgM não específica . IgG +/ IgM + - Primoinfeção
<b>IgG + / IgM +</b>	Infeção relativamente recente	Determinação da avidéz: . Avidéz forte – a infeção ocorreu há mais de 4 meses . Avidéz fraca/intermédia – não se pode excluir a hipótese de infeção recente. Confirmar com 2 <sup>a</sup> amostra 3 semanas mais tarde.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para determinação de IgG e de IgM:** Imunoensaio não-competitivo de fase sólida com leitura por quimioluminescência.

- **Infeção por Citomegalovírus**

O Citomegalovírus (CMV) tem uma distribuição universal e condições socioeconómicas baixas e higiene deficiente facilitam a sua disseminação. A sua transmissão não se faz através de um contacto casual, requer uma exposição íntima e repetida. O CMV pode estar presente no leite, saliva, fezes e urina; tem sido identificado em crianças frequentadoras de creches. Nos adultos o vírus pode ser transmitido por via sexual, através do sémen ou das secreções cervicais; também pode haver contágio a partir da transfusão de sangue contendo leucócitos contaminados (50).

Após a infecção primária, sintomática ou assintomática, o vírus persiste indefinidamente nos tecidos do hospedeiro e o indivíduo será, provavelmente, portador do vírus. A infecção, habitualmente, permanece latente nos leucócitos, tecido linfóide, glândulas secretórias e rins. Os síndromes de reativação, em geral, desenvolvem-se quando há compromisso da imunidade, com baixa dos linfócitos T (como por exemplo em infecção por VIH, imunossupressores).

A infecção por CMV é a infecção mais comum do feto. As consequências da infecção materna para o feto são variáveis, podendo resultar numa infecção ligeira e inaparente ou numa doença grave e disseminada. Petéquias, hepatoesplenomegália e icterícia são os sinais mais comuns; microcefalia, com ou sem microcalcificações cerebrais e prematuridade ocorrem em 30 a 50% dos casos, podendo ocorrer, também, hérnia inguinal e coriorretinite. O recém-nascido pode adquirir a infecção no momento do parto, através das secreções vaginais, ou por contacto pós-natal, através do leite materno. Os recém-nascidos gravemente afetados têm uma taxa de mortalidade de 20 a 30%. Entre 5 e 25% dos recém-nascidos infetados e clinicamente assintomáticos no nascimento desenvolverão anomalias psicomotoras, auditivas, oculares ou dentárias nos anos seguintes. O risco para o feto é menor quando a infecção materna (46).

A infecção fetal por CMV pode provocar anomalias detetáveis por ecografia; neste caso, ou aquando da suspeita clínica de infecção materna o isolamento do vírus no líquido amniótico é o método de escolha para o diagnóstico de infecção congénita.

A suspeita clínica de infecção materna por CMV deve ser confirmada pelo diagnóstico laboratorial, quer através da demonstração de virémia, quer da confirmação de IgM anti-CMV ou de um aumento de 4 vezes do título de anticorpos específicos.

O aumento do nível de anticorpos específicos só pode ser detetado depois de um período de 4 semanas após a primoinfecção e, muitas vezes, os títulos permanecem altos por vários anos. Por esta razão, uma única determinação do título de anticorpos não tem valor para o diagnóstico de doença aguda. A existência de fator reumatoide circulante que pode resultar em teste falso positivo para IgM anti-CMV e o título de IgM que, em casos raros, pode persistir por 6 a 9 meses complicam a interpretação da avaliação serológica na gravidez. As infecções recorrentes são caracterizadas por um aumento de pelo menos 4 vezes no título de IgG (tabela 10) (46, 50).

**Tabela 10:** Interpretação dos títulos serológicos na infecção por Citomegalovírus (46).

	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Medidas</b>
<b>IgG - / IgM -</b>	Ausência de infecção (ausência de imunidade)	Vigilância serológica mensal e medidas de prevenção da infecção
<b>IgG + / IgM -</b>	Infeção relativamente antiga (imunidade)	A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde.
<b>IgG - / IgM +</b>	Infeção recente	A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde: . IgG - / IgM + - IgM não específica . IgG + / IgM + - Primoinfecção
<b>IgG + / IgM +</b>	Infeção relativamente recente	Determinação da avidéz: . Avidéz forte – a infecção ocorreu há mais de 3 meses . Avidéz fraca/intermédia – não se pode excluir a hipótese de infecção recente. A confirmar com 2ª amostra 3 semanas mais tarde.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para determinação de IgG e de IgM:** Imunoensaio não competitivo de fase sólida com medição por quimioluminescência.
- **Metodologia para a determinação da Avidéz:** Imunoensaio não-competitivo em formato sandwich, com deteção final em fluorescência (ELFA).

### Sífilis

É uma doença infecciosa provocada pelo *Treponema pallidum*, cujo período de incubação é, em média, de 3 semanas, mas que pode oscilar entre os 10 dias e as 10 semanas.

Considera-se a sífilis dividida em dois períodos: a sífilis precoce, infecciosa, e a sífilis tardia, não infecciosa. A sífilis precoce engloba a sífilis primária, secundária e latente precoce. As manifestações de sífilis precoce ocorrem no 1.º ano de infecção, podendo, em casos raros, estender-se até aos 4 anos. No estadio de sífilis tardia o doente não transmite o agente infeccioso, mas sofre as consequências destrutivas da resposta imunológica do seu organismo à permanência do *T. pallidum*. A morbidade e a mortalidade são elevadas. A sífilis precoce e a sífilis congénita são doenças de declaração obrigatória. A transmissão da infecção ao feto faz-se por via transplacentária, durante os períodos de espiroquetémia materna e é tanto mais provável acontecer quanto mais elevado for o número de espiroquetas circulantes.

Como resultado de infecção fetal, a gravidez pode terminar em aborto espontâneo, nado-morto, recém-nascido de termo ou pré-termo portador de sífilis congénita sintomática. O diagnóstico correto desta situação, particularmente no período correspondente à sífilis precoce, é importante, dado que o tratamento adequado cura a sífilis na mãe e no feto, prevenindo, assim, as situações de sífilis congénita (44, 46).

O diagnóstico serológico da sífilis é classificado em dois grupos: testes não-treponémicos e testes treponémicos. Habitualmente utiliza-se uma prova serológica não treponémica do tipo RPR, já referido atrás, ou VDRL (*Venereal Disease Research Laboratories*) como primeiro teste diagnóstico.

Testes treponémicos detetam anticorpos específicos e as técnicas utilizadas incluem aglutinação de partículas de *T. pallidum*, Imunoensaios e Immunoblotting (44).

Se RPR ou VDRL for reativo e o teste treponémico for negativo e não houver sintomatologia clínica nem história de sífilis, não há necessidade de fazer qualquer tratamento, dado que a gravidez é uma das causas de falsa positividade nas provas serológicas não treponémicas. Deve repetir-se a titulação de reaginas com intervalos de 4 semanas; se houver um aumento de 4 vezes na titulação, o tratamento deve ser efetuado.

Se as duas provas forem positivas, deve iniciar-se o tratamento, exceto se a titulação do RPR for baixa (até 1:4) e houver história de tratamento adequado de infeção sífilítica, sem história de infeção posterior, mas as provas serológicas não treponémicas deverão ser repetidas com intervalos de 4 semanas. Se a titulação aumentar para o quádruplo, o tratamento deverá ser efetuado novamente, pois pode corresponder a reinfeção.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** Imunoensaio não-competitivo enzimático com leitura por quimioluminescência.

### *Hepatite B*

A hepatite B é uma infeção viral do fígado que tem várias apresentações clínicas. O Vírus da Hepatite B (VHB) pode causar uma doença aguda ou crónica, assintomática ou sintomática. Os doentes podem recuperar por completo da infeção, sofrer hepatite fulminante ou desenvolver uma infeção crónica, que pode evoluir para cirrose (51). A transmissão pode ser por via sexual, mãe-filho, por via percutânea ou mucocutânea.

A infeção por VHB pode ser dividida em quatro estadios que variam na duração. O primeiro ocorre durante a replicação viral quando não é detetada resposta imunitária. O segundo estadio ocorre quando a resposta imunológica ao vírus origina inflamação e danos nos tecidos hepáticos, muitas vezes detetada como hepatite sintomática, mas que também pode ser assintomática. Durante o terceiro estadio as células infetadas com o vírus são eliminadas e o antigénio de replicação viral (AgHBe) deixa de se ser detetado, mas o antigénio de superfície (AgHBs) continua presente. No quarto estadio está desenvolvida a imunidade total ao VHB e o AgHBs é eliminado. Doentes infetados que não progridem para além dos estadios 1 ou 2 tornam-se portadores crónicos do VHB e têm maior risco de desenvolver cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (51).

O diagnóstico inicial de hepatite pode ser feito com base nos sintomas clínicos e aumento da atividade de enzimas hepáticas no sangue. No entanto, a serologia da infecção por VHB ajuda a descrever o curso da doença. Infecções agudas ou crônicas podem ser diferenciadas pela presença de AgHBs e AgHBe no sangue e pelo padrão de anticorpos para cada um dos antígenos individualmente (52). AgHBs e AgHBe são secretados para o sangue durante a replicação viral. Uma infecção crônica pode ser diferenciada pelo contínuo aparecimento de AgHBe, AgHBs, ou ambos, e pela ausência de anticorpos detetáveis. Anticorpos para AgHBs indicam a resolução da infecção ou vacinação. A tabela II ajuda a fazer a interpretação dos marcadores serológicos na infecção por VHB.

**Tabela II:** Interpretação dos marcadores serológicos na infecção por VHB (52).

Reatividade Serológica	Estado da doença				Estado saudável		
	Estadio Precoce	Aguda Precoce	Aguda	Crônica	Aguda tardia	Resolvida	Vacinação
Anti-HBc	-	-	-	+	+/-	+	-
Anti-HBe	-	-	-	-	+/-	+/-	-
Anti-HBs	-	-	-	-	-	+	+
AgHBe	-	+	+	+	-	-	-
AgHBs	+	+	+	+	+	-	-
Vírus	+	+	+	+	+	-	-

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para as determinações) quer de AgHBs, quer dos anticorpos do AgHBs e anti-core VHB totais (anti-HBc:** Imunoensaio não-competitivo em formato de *sandwich*, com medição por quimioluminescência.

### Hepatite C

O vírus da Hepatite C (VHC) é transmitido de forma similar ao VHB, mas também maior capacidade de estabelecer hepatite crônica. Muitos dos indivíduos infetados com VHC também estão infetados com VHB ou Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). A hepatite crônica leva muitas vezes a cirrose e pode potenciar o aparecimento de carcinoma hepatocelular (53).

O VHC causa três tipos de doença: hepatite aguda com resolução da infecção e da hepatite; infecção crônica persistente com possível progressão para hepatite crônica; e rápida progressão para cirrose. A progressão para cirrose é acelerada pelo abuso na ingestão de álcool, infecção por VIH, sexo masculino e pela idade superior a 40 anos (52).

O diagnóstico e a detecção da infecção por VHC são baseados em métodos imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-VHC ou métodos para detecção do RNA genômico.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para determinação dos anticorpos IgG do HCV:** Imunoensaio não-competitivo em formato de *sandwich*, com medição por quimioluminescência.

#### *Vírus da Imunodeficiência Humana*

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pode ser dividida em três fases: infecção aguda ou primária, latência clínica e a progressão final para SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. Cada uma destas etapas está associada a alterações específicas em parâmetros virológicos e imunológicos (54).

A infecção aguda ou primária por VIH-I está associada com um período de doença sintomático, com níveis elevados de replicação do VIH-I e desenvolvimento da resposta imune específica. O diagnóstico muitas vezes não é feito corretamente porque os sintomas não são específicos, assemelham-se ao síndrome mononucleósido, e os anticorpos específicos ainda não são detetáveis.

A latência clínica corresponde a um período assintomático, que pode durar vários anos. É o período entre a infecção primária e o desenvolvimento clínico da imunodeficiência. Durante este período, o número de linfócitos T CD4 diminui gradualmente e o vírus continua a sua replicação (54).

A SIDA é uma das epidemias mais devastadoras. Grande parte dos doentes infetados com VIH tornar-se-á sintomático, e a maioria esmagadora deles irá sucumbir à doença sem tratamento. A deterioração da resposta imunitária é indicada pelo aumento da suscetibilidade a patógenos oportunistas, em especial os que a resposta imunitária controla através dos linfócitos T CD4, macrófagos ativados e linfócitos T CD8. SIDA pode manifestar-se de diferentes formas incluindo linfadenopatias e febre, infecções oportunistas, doenças malignas (55).

A presença do VIH no sangue, sémen, secreções vaginais de pessoas infetadas e o longo período assintomático de infecção são fatores que promovem a disseminação da doença. O feto e o recém-nascido estão em grande risco de adquirirem o vírus através da mãe infetada. Os testes para a infecção por VIH são realizados essencialmente por quatro razões: identificar indivíduos com VIH para poder iniciar a terapêutica antiviral; identificar portadores que possam transmitir a infecção a outros (como dadores de sangue, mulheres grávidas, parceiros

sexuais); seguir o curso da doença e confirmar o diagnóstico de SIDA; ou avaliar a eficácia do tratamento.

O diagnóstico de infecção por VIH é obtido por deteção do anticorpo contra o VIH, usando um teste de *screening* e confirmação por um teste complementar. Os testes serológicos de *screening* podem ser por EIA's ou testes de aglutinação. Testes mais específicos como o teste Western Blot são usados para confirmar um resultado seropositivo (55).

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia para a determinação de anticorpos do HIV-1 e HIV-2:** Imunoensaios não-competitivos em formato de *sandwich*, com medição por quimioluminescência.

### 2.3.3 Imuno-hematologia

#### *Teste de Coombs Indireto*

O Teste antiglobulina é uma modificação da reação de aglutinação que permite a deteção de certas imunoglobulinas (anticorpos IgG irregulares) que podem não produzir aglutinação mesmo depois de se ligarem à superfície das partículas. Se uma anti-imunoglobulina, ou reagente de Coombs, é adicionado às não-aglutinadas partículas revestidas de IgG, o reagente de Coombs vai estabelecer pontes entre as partículas através de ligações bivalentes. Isto possibilita o *cross-linking* para que haja aglutinação. O teste de Coombs direto é usado em bancos de sangue para determinar a presença de anticorpos IgG para células dos GV (38).

O teste de Coombs indireto é uma variação do teste de antiglobulina que é usado para detetar Ac livres para as células de GV no soro dos pacientes. O soro é analisado com um painel de células de GV de antigenicidade conhecida e variada. A aglutinação de células para as quais o soro a analisar e o reagente foram adicionados indica a presença de Ac no soro a um Ag presente nas células aglutinadas (38).

Porque o fator do complemento C3 pode afetar a aglutinação, a inativação do complemento pode ser necessária. As placas com os microtubos, usualmente, usadas nesta técnica têm o C3 inativado.

- **Amostra:** Soro e plasma humanos.
- **Metodologia:** O teste associa os princípios de aglutinação e de filtração em gel.

## **Conclusão**

Candidatei-me a este Mestrado com os objetivos de expandir conhecimentos na área das Análises Clínicas e ampliar as minhas perspetivas profissionais como Farmacêutica.

Considero que o que distingue o mestrado em Análises Clínicas dos restantes mestrados da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra prende-se com o facto de assegurar a aquisição de uma especialização de natureza profissional numa área importante no âmbito da Saúde. E por isso o estágio e a integração na prática laboratorial foram fundamentais para a perceção de todas as responsabilidades que tem um Técnico Superior de Análises Clínicas. Serviu para a aplicação prática dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo do curso e para a aquisição de novos conhecimentos científicos e competências técnicas, nomeadamente na fase pré-analítica.

A integração de alguém de novo na rotina laboratorial nem sempre é fácil e nossa capacidade de levar para o laboratório os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado é fundamental para o sucesso do nosso trabalho.

Embora os Laboratórios de Análises Clínicas possam estar divididos por setores, a multidisciplinaridade está sempre presente e para sermos profissionais de excelência temos de formatar o nosso pensamento neste sentido. A individualidade de cada disciplina lecionada ao longo do mestrado entrelaça-se no desenrolar do trabalho diário e o que nos parece demasiado teórico ao longo das aulas, justifica-se na prática laboratorial.

O contacto com os utentes humaniza o nosso trabalho. Recorda-nos que os números e códigos de barras que identificam as amostras com que trabalhamos diariamente representam as expectativas e as angústias desses mesmos utentes. Participar na Fase Pré-analítica, estabelecendo contato com os utentes e aprendendo a realizar colheitas de sangue, foi para mim uma experiência muito enriquecedora e que deu ainda mais valor ao facto de ter realizado este Mestrado.



## Bibliografia

1. McCall R.E., Tankersley C.M., *Phlebotomy and Specimen Considerations*. In Bishop M. L., Fody E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 33-73.
2. Guia das Boas Práticas Laboratoriais. In Despacho n.º 8835/2001 (2.ª série).
3. Cooper G., *Choosing a Quality Control Product*. In *Basic Lessons in Laboratory Quality Control*, Bio-Rad Laboratories, Inc. – Quality Systems Division (2011), pp 42-44.
4. Cooper G., *Levey-Jennings and Westgard Rules*. In *Basic Lessons in Laboratory Quality Control*, Bio-Rad Laboratories, Inc. – Quality Systems Division (2011), pp 20-28.
5. Kricka L.J, F.R.S.C., Park J.Y., *Optical Techniques*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 63-83.
6. Drees J.C., Wu A.H.B., *Analytical Techniques*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 130-165.
7. Pesce A.J., *Spectral Techniques*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 44-67.
8. Heineman W.R. et al., *Electrochemistry: Principles and Measurements*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 222-236.
9. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, in Norma da Direção Geral de Saúde nº 002/2011.
10. Dods R.F., *Diabetes Mellitus*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th edition (2010), pp 729- 754.
11. Chapman J., Hammett-Stabler C., Grenache D., *Pregnancy and Fetal development*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th edition (2010), pp 854-879.
12. Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c, in Norma da Direcção Geral de Saúde N° 033/2011.
13. Kaplan L., Pesce A., *Classifications and Descriptions of Proteins, Lipids, and Carbohydrates*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 507-526.
14. Tymchak L., *Amino Acids and Proteins*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 223-264.

15. Freeman V.S., *Carbohydrates*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 309-327.
16. Klinberg S., *Serum Protein Electrophoresis*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical References - Methods of Analysis*, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Evolve.
17. Silva R., Lopes A., et al., *Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation*, *Revista Médica de Minas Gerais* 18 (2008) pp 116-122.
18. Levison S.S., *Immunoelectrophoresis*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical References - Methods of Analysis*, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Evolve.
19. Kaplan J.M., First M.R., *Renal Fuction*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 567-585.
20. Delaney M.P., Price C.P, Lamb E.J., *Kidney Function and Disease*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 631-654.
21. Frank E.L., *Nonprotein Nitrogen Compounds*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 266-280.
22. Lamb E.J., Price C.P., *Creatinine, Urea and Uric Acid*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 363-372.
23. Kaplan A.L., Pesce A.J., *Examination of Urine*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical References - Methods of Analysis*, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Evolve.
24. Sacks D.B., *Carbohydrates*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 373-401.
25. Lynch K.L., Wu A.H., *Renal Fuction*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 557-577.
26. Dufour R., *The Liver: Fuction and Chemical Pathology*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 586-600.
27. Chiasera J.M., Xu, X., *Liver Fuction*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 516-540.

28. Panteghini, M., Bais, R., *Enzymes*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 317-336.
29. Dufour R., *The Pancreas: Function and Chemical Pathology*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 651-662.
30. Johnson-Davis K., McMillin G.A., *Enzymes*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 281-308.
31. Ming J., *Amylase*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical References - Methods of Analysis*, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Evolve.
32. Ming J., *Lipase*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical References - Methods of Analysis*, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Evolve.
33. Sethi A.A., Warnick R., Remaley A.T., *Lipids and Lipoproteins*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 328-355.
34. Burnett J.R., *Coronary Artery Disease: Lipid Metabolism*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 691-728.
35. Rifai N., Warnick G.R., Remaley A. T., *Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Others Cardiovascular Risk Factors*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 402-430.
36. Ridker P.M., MYocardial Infarction in a 72-Year-Old Woman with Low LDL-C and Increased hsCRP: Implications for Statin Therapy. *Clin Chem* 55:2 (2009) pp 369-375.
37. Feldkamp C.S., *Immunological Reactions*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 151-161.
38. Feldkamp C.S., *Immunochemical Techniques*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 162-179.
39. Kricka L.J. et al., *Principles of immunochemical Techniques*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 155-170.

40. Orton S., Immunoassays. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 185-201.
41. Thompson S.G., *Principles for Competitive-Binding Assays*. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 180-199.
42. Lindquist D., Chu M.C., Probert W.S., *Francisella and Brucella*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 824-828.
43. Nataro J.P. et al., *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 679-683.
44. Pope V., Norris S.J., Johnson, R. E., *Treponema and Other Human Host-Associated Spirochetes*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 987-1001.
45. *Human Herpesviruses*. In Murray P.R., Rosenthal K. S., Pfaller M.A., (Eds) *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7<sup>th</sup> Edition (2013), pp 461-483.
46. Saúde reprodutiva: Doenças infecciosas e gravidez. In *Orientações técnicas I I*, Direcção-Geral da Saúde (2000), Lisboa.
47. Cullen A., Brown S., Cafferkey M., O'Brien N., Griffin E., Current Use of the TORCH Screen in the Diagnosis of Congenital Infection. *Journal of Infection* 36 (1998), 185-188.
48. Wilson M., Jones J.L., McAuley J.B, *Toxoplasma*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 2070-2081.
49. Bellini W.J., Icenogle J.P., *Measles and Rubella Viruses*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 1378-3191.
50. Hodinka R.L., *Human Cytomegalovirus*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 1549-1563.
51. Horvat R.T., Tegtmeir G.E., *Hepatitis B and D Viruses*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 1641-1658.
52. *Hepatitis Viruses*. In Murray P.R., Rosenthal K. S., Pfaller M.A., (Eds) *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7<sup>th</sup> Edition (2013), pp 583-597.

53. Scott J., Gretch D. R., *Hepatitis C and G Viruses*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 1437-1452.
54. Griffith B.P., Campbell S., Mayo D.R, *Human Immunodeficiency Viruses*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, 9<sup>th</sup> Ed. (2007), pp 1308-1329.
55. *Retroviruses*. In Murray P.R., Rosenthal K. S., Pfaller M.A., (Eds) *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7<sup>th</sup> Edition (2013), pp 567-582.