

Catarina Isabel dos Santos Pereira

Relatório de Estágio em Análises Clínicas

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Amato Lusitano

Orientadores:

Dra. Mariana Martins

Dra. Maria Tavares

Professora Doutora Sara Domingues

Setembro, 2015

Universidade de Coimbra

“Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram e apostaram na minha formação académica e pessoal.

Ao meu irmão e às minhas primas Mariana e Inês que, apesar das minhas ausências, sempre me lembraram o quão a família é importante.

Aos meus amigos, às pessoas maravilhosas que o mestrado me deu a conhecer. Obrigado, por terem feito parte desta etapa da minha vida.

Um agradecimento especial à Ana, que foi a grande cúmplice destes últimos anos, e ao João por conseguir encurtar a distância que nos separava.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Dra. Mariana Martins e à Dra. Maria Tavares por me terem dado a oportunidade de realizar o estágio no laboratório do Hospital Amato Lusitano. A todas as Técnicas de Análises Clínicas, que me acompanharam neste processo, às auxiliares e administrativas por toda a simpatia demonstrada. À Professora Doutora Sara Domingues pela orientação na realização deste relatório e à Professora Doutora Leonor Almeida por toda ajuda e preocupação.

Índice

Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas	XV
Resumo.....	XIX
Abstract	XIX

1. Introdução.....	1
2. Caracterização do Laboratório	2
2.1. Orgânica do Laboratório	2
2.2. Organização Física do Laboratório.....	2
2.3. Da fase pré-analítica à fase pós-analítica.....	3
2.4. Controlo da Qualidade.....	4
3. Estágio	5
3.1. Hematologia	5
3.2. Microbiologia.....	7
4. Setor de Bioquímica.....	10
4.1. Equipamentos Automáticos.....	10
4.2. Iões	13
4.3. Função Renal.....	16
4.4. Função Hepática.....	19
4.5. Função Pancreática	23
4.6. Glicémia e Diabetes.....	24
4.7. Estudo do Perfil Lipídico	25
4.8. Marcadores Cardíacos.....	28
4.9. Proteínas de Interesse Clínico	30
4.10. Marcadores de Fase Aguda.....	32
4.11. Metabolismo do ferro.....	33

5. Setor de Imunologia	35
5.1. Equipamentos Automáticos.....	35
5.2. Endocrinologia.....	39
5.2.1. Tiróide.....	39
5.2.2. Reprodução e Fertilidade	42
5.2.3. Outras Hormonas	45
5.3. Marcadores Tumorais.....	46
5.4. Vitaminas.....	49
5.5. Serologia Infeciosa	51
5.6. Hepatites Virais	55
6. Conclusão	62
7. Referências bibliográficas	63
Anexos	69

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma representativo da sequência de atividades a realizar após receção de uma amostra biológica, no setor de microbiologia.....	7
Figura 2. Esquema representativo de um <i>microslide</i> de reagentes (química seca).....	11
Figura 3. Figura representativa de uma eletroforese normal.....	32
Figura 4. Imunoensaio não competitivo.....	36
Figura 5. Imunoensaio competitivo, envolvendo Ag marcado com EA.....	37
Figura 6. Imunoensaio competitivo, envolvendo Ac marcado com EA.....	37
Figura 7. Esquema representativo da evolução de uma infeção aguda por VHC.....	56
Figura 8. Curso serológico típico de uma infeção aguda resolvida, pelo VHB.	60
Figura 9. Curso químico e serológico de uma infeção aguda por VHB.....	60
Figura 10. Curso químico e serológico de uma infeção crónica por VHB.	61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tipos de tubos de recolha e respetivo tratamento da amostra.....	3
Tabela 2. Parâmetros analisados nos equipamentos <i>Advia 2120</i> e <i>2120i</i>	6
Tabela 3. Analitos bioquímicos analisados no <i>VITROS Fusion 5.1</i>	10
Tabela 4. Metodologia do <i>Vitros FS 5.1</i> na determinação do ionograma.....	13
Tabela 5. Funções do rim.....	16
Tabela 6. Metodologia do <i>Vitros FS 5.1</i> na determinação dos indicadores da função renal	17
Tabela 7. Metodologia do <i>Vitros FS 5.1</i> na determinação dos indicadores da função hepática	19
Tabela 8. Metodologia do <i>Vitros FS 5.1</i> na determinação da amilase e lipase.....	23
Tabela 9. Critérios no diagnóstico da diabetes, segundo a DGS.....	25
Tabela 10. Metodologia do <i>Vitros FS 5.1</i> na determinação das proteínas.....	30
Tabela 11. Valores de referência das frações das proteínas séricas	31
Tabela 12. Analitos analisados e tipo de imunoensaio utilizado no <i>ADVIA Centaur XP</i>	35
Tabela 13. Analitos analisados e tipo de imunoensaio utilizado no <i>Architect i2000sr</i>	38
Tabela 14. Valores de referência dos indicadores da função da tiróide.....	39
Tabela 15. Doenças da tiróide.....	41
Tabela 16. Valores de referência das hormonas da reprodução e fertilidade	42
Tabela 17. Valores de referência dos marcadores tumorais	47
Tabela 18. Títulos serológicos de na pesquisa de VIH, Toxoplasmose, Rubéola e CMV	52
Tabela 19. Interpretação dos resultados serológicos na Toxoplasmose	53
Tabela 20. Infecção por VHB: risco de cronicidade.....	57
Tabela 21. Marcadores do VHB e seu significado	58

Lista de Abreviaturas

Ac	Anticorpos
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
ADH	Hormona Antidiurética
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AFP	Alfa-Fetoproteína
Ag	Antigénios
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Transaminase
AST	Aspartato Transaminase
aTG	Anticorpos anti-Tiroglobulina
ATP	Adenosina Trifosfato
aTPO	Anticorpos anti-Peroxidase
BK	Bacilo de <i>Koch</i>
BuBc	Bilirrubina não Conjugada e Conjugada
CA	<i>Cancer Antigens</i>
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CK	Creatinaquinase
CMV	Citomegalovírus
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DBIL	Bilirrubina Direta

DGS	Direção Geral de Saúde
EA	Éster de Acridina
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FSH	Folículo-estimulina
GnRH	Hormona Libertadora da Gonadotropina
HAL	Hospital Amato Lusitano
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina A1C
HBC	Hepatite B Crónica
hCG	Gonadotropina Coriónica Humana
HDL	Lipoproteína de Elevada Densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermédia
INR	Ratio Internacional Normalizado
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormona Luteinizante
NBIL	Bilirrubina Neonatal
PCR	Proteína C-reativa
PCT	Procalcitonina
PPM	Partículas Paramagnéticas
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH	Hormona Paratiroideia
RLUs	Unidades Relativas de Luz

SEQC	Sociedade Espanhola de Química Clínica
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIL	Sistema de Informação Laboratorial
TBIL	Bilirrubina Total
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TICB	Capacidade Total de Ligação do Ferro
Tn	Troponina
TRH	Hormona Libertadora da Tireotrofina
TSH	Hormona Estimulante da Tiróide
UFCs	Unidades Formadoras de Colónias
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
β -hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
γ -GT	Gama-Glutamiltransferase

Resumo

No presente relatório são descritas as atividades realizadas no estágio, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio teve lugar no Hospital Amato Lusitano, na cidade de Castelo Branco, onde tive a oportunidade de integrar a rotina normal de funcionamento do laboratório, nas áreas de Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia.

Neste relatório é feita uma caracterização geral do Serviço de Patologia Clínica e da sua dinâmica de funcionamento, e uma breve descrição das atividades realizadas nos setores de Hematologia e Microbiologia.

Mais detalhadamente, são discutidas as secções de Bioquímica e Imunologia, dando algum ênfase ao diagnóstico laboratorial de hepatites virais, uma área de particular interesse.

Abstract

The following report describes the activities developed in the curricular internship of the Master degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of University of Coimbra.

The internship took place at the Amato Lusitano Hospital in Castelo Branco, where I had the opportunity to integrate the normal operating routine of the laboratory in the areas of Hematology, Microbiology, Clinical Biochemistry and Immunology.

In the present report is made a general characterization of the Clinical Pathology Service and its working dynamics and a brief description of the activities carried out in Hematology and Microbiology sectors.

Clinical Biochemistry and Immunology are discussed in more detail, giving some emphasis on laboratory diagnosis of viral hepatitis, an area of particular interest.

I. Introdução

Cada vez mais o Laboratório Clínico desempenha um dos papéis mais importantes no processo de diagnóstico. Hoje em dia, os resultados analíticos são utilizados na confirmação de diagnósticos, mas também servem para alertar para a possibilidade de determinadas alterações ou patologias. Deste modo, uma boa interpretação dos exames laboratoriais tornou-se uma das principais ferramentas utilizadas pelo clínico no diagnóstico, prognóstico e monitorização de patologias.

Os laboratórios encontram-se cada vez mais automatizados, fornecendo resultados mais rápidos e menos sujeitos ao erro humano. O laboratório tem a responsabilidade de garantir resultados precisos e exatos, assegurando sempre a qualidade dos serviços prestados.

A quantidade de análises que se podem determinar numa amostra de sangue é muito variada, por isso é necessário uma boa relação entre os testes analíticos, a sua utilidade em cada situação clínica e os custos monetários.

Durante o 1º ano do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, foram muitos os conhecimentos teóricos que nos foram facultados. O 2º ano foi essencialmente preenchido pela realização de um estágio curricular a nível laboratorial, uma forma prática de cimentar todos esses conhecimentos, vivenciando o exercício da profissão.

O estágio no laboratório do Hospital Amato Lusitano teve início no dia 19 de Outubro de 2014 e prolongou-se até ao fim do mês de Maio de 2015. Durante os meses de estágio integrei a rotina de funcionamento das áreas de Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. Como proposto, neste relatório são discutidas duas das quatro áreas integrantes do estágio, sendo elas a Bioquímica e a Imunologia.

2. Caracterização do Laboratório

2.1. Orgânica do Laboratório

O estágio do Mestrado em Análises Clínicas foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Amato Lusitano (HAL), Serviço sob a direção da Dra. Mariana Martins.

O Serviço de Patologia Clínica do HAL é responsável pelos resultados laboratoriais de todas as amostras que chegam ao laboratório, sejam elas de utentes do serviço de urgência, da consulta externa ou de utentes do internamento hospitalar. O laboratório clínico intervém desde a colheita das amostras, passando pelo tratamento e determinação dos testes requisitados, até à validação biopatológica dos resultados. Em média, são tratadas 300 amostras por dia, sendo que existe um número variável, fundamentalmente em várias alturas do ano.

2.2. Organização Física do Laboratório

O laboratório do HAL está dividido fisicamente em várias secções, de acordo com as diferentes áreas laboratoriais e as suas necessidades funcionais:

- Secção de Imunologia
- Secção de Microbiologia
- Secção de Bioquímica
- Secção de Hematologia
- Outros setores:
 - Receção/Administração;
 - Sala de colheitas;
 - Armazém de materiais;
 - Sala de lavagem de material;
 - Gabinetes;
 - Vestiário e casa de banho;
 - Sala de refeições.

2.3. Da fase pré-analítica à fase pós-analítica

A fase pré-analítica é a primeira fase do processo, e é uma etapa muito importante, que está diretamente relacionada com a qualidade de amostra. Se a colheita, o armazenamento e o transporte das amostras não forem realizados de forma adequada, pode comprometer a veracidade dos resultados.

No HAL, as colheitas são realizadas por técnicos devidamente qualificados. No estágio tive a oportunidade de aprender a realizar colheitas e de perceber a sua importância na qualidade das amostras, de modo a que haja o mínimo de interferência possível nos resultados de determinados analitos. No entanto, essa experiência fez-me perceber que em certas situações, é extremamente difícil fazer uma recolha de sangue, respeitando os critérios pré-analíticos, como por exemplo o volume da amostra.

Uma colheita de sangue adequada é um passo pré-analítico crítico, necessário para a integridade dos resultados laboratoriais [1]. No laboratório do HAL, usa-se maioritariamente o sistema de extração a vácuo. O uso de sistemas fechados de colheita de sangue, baseados na extração a vácuo, reduz o risco de exposição direta ao sangue e torna mais fácil a colheita de múltiplas amostras com uma única punção venosa. Os tubos de recolha são diferentes, de acordo com a finalidade da análise, como descrito na tabela I.

Tabela I. Tipos de tubos de recolha e respetivo tratamento da amostra

	Anticoagulante	Ação do anticoagulante	Centrifugação	Produto
Tubo para coagulação	Citrato de Sódio (1 parte: 9 partes de sangue)	Quelante de iões de Cálcio	3500 rpm, 10 min, (5 min urgências)	Plasma
Tubo para hemograma	EDTA*	Quelante de iões de Cálcio	Não é centrifugado	Sangue Total
Tubo para Velocidade de Sedimentação	Citrato de sódio (1 parte: 4 partes de sangue)	Quelante de iões de Cálcio	Não é centrifugado	Sangue Total
Tubo para serologia com esferas	Não tem anticoagulante	—————	3500 rpm, 10 min (5 min urgências)	Soro

* EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

A cada utente faz-se corresponder uma requisição, onde consta a lista dos parâmetros a analisar. As requisições dos utentes são integradas no sistema informático. A partir desse momento, os pedidos ficam registados no sistema informático.

No momento da colheita, todas as amostras são devidamente identificadas e rotuladas com uma etiqueta onde constam as seguintes informações: código de barras, que vai ser lido pelos respetivos aparelhos, fornecendo a informação dos parâmetros a ser analisados; nome do utente, processo e episódio; serviço do qual a amostra é proveniente; e anticoagulante/amostra presente no tubo.

Quando as amostras chegam ao laboratório, é feita a triagem, processo muito importante que indica a entrada das amostras no laboratório. Nessa altura as amostras são encaminhadas para as diferentes secções, conforme os pedidos.

Segue-se a fase analítica, onde as amostras são tratadas e analisadas. Na maioria das secções, esta é a fase em que há maior envolvimento dos equipamentos automáticos. Cada tipo de amostra é inserida no equipamento correspondente, que, após leitura do código de barras, inicia a determinação dos parâmetros pedidos.

Todos os equipamentos estão ligados em rede ao Sistema de Informação Laboratorial (SIL), por ligação bidirecional entre o computador central e o terminal do equipamento. Assim, após a análise das amostras, toda a informação é automaticamente enviada para o sistema informático, ficando disponível para posterior validação. No caso das técnicas manuais, o registo dos resultados no sistema informático é realizado pelo Técnico de Análises Clínicas.

2.4. Controlo da Qualidade

A qualidade num laboratório clínico pode ser definida como a precisão, exatidão e a pontualidade dos resultados fornecidos aos clínicos. Para que a qualidade seja garantida, estão definidos procedimentos e são efetuados controlos internos e controlos externos.

O controlo de qualidade interno (CQI) é realizado diariamente e, no caso das análises que não se realizam todos os dias, deve ser passado o controlo interno em cada corrida. O CQI tem como objetivo validar a precisão dos testes e a fiabilidade dos resultados.

Os controlos são substâncias que contêm uma quantidade conhecida do analito e são testados do mesmo modo que as amostras dos pacientes. Numa corrida de controlo interno, as amostras controlo utilizadas correspondem a dois ou três níveis, consoante o teste e o

equipamento. As cartas de *Levey-Jennings* são desenhadas automaticamente a partir dos dados (média, desvio padrão) fornecidos em cada lote de controlo e geração de reagente, que devem ser introduzidos no equipamento. Em cada corrida de CQI, os resultados são introduzidos nas cartas e cabe aos profissionais fazer a sua análise, interpretação e correção. Os critérios de aceitação ou rejeição do laboratório têm por base as regras de *Westgard*.

O Controlo de Qualidade Externo (CQE), ou a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), permite a comparação do desempenho de um determinado teste laboratorial com um grupo de laboratórios ou com um laboratório de referência. O CQE avalia a exatidão dos resultados apresentados; alerta precocemente para erros sistemáticos; evidencia objetivamente a qualidade do teste utilizado; e identifica as necessidades de formação [2].

O laboratório do HAL está inscrito em programas de controlo externo do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e da Sociedade Espanhola de Química Clínica (SEQC).

3. Estágio

O estágio teve início no dia 19 de Outubro de 2014 e prolongou-se até ao fim do mês de Maio de 2015. Durante as 2 semanas do mês de Outubro, tive um primeiro contacto com o laboratório. Passei alguns dias em cada área, com a finalidade de conhecer o funcionamento e a dinâmica de trabalho em cada uma delas. O restante tempo de estágio foi dividido pelas diferentes secções do laboratório: Hematologia; Microbiologia; Bioquímica e Imunologia.

3.1. Hematologia

A hematologia é a área laboratorial que tem como função a análise e o estudo dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, plaquetas e leucócitos), o estudo da coagulação e as patologias relacionadas. O hemograma é o exame mais pedido ao laboratório. Além de ser essencial nas análises de rotina e na avaliação do estado de saúde dos utentes, o hemograma é fundamental no diagnóstico e no controlo evolutivo de doenças infecciosas, doenças crónicas em geral, emergências médico-cirúrgicas e no acompanhamento de doentes oncológicos [3].

Hemograma

O laboratório do HAL está equipado com 2 equipamentos automáticos de diagnóstico, o *Advia 2120* e o *Advia 2120i*, cuja metodologia é baseada na citometria de fluxo (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros analisados nos equipamentos *Advia 2120* e *2120i*

Eritrograma

RBC (contagem de eritrócitos), $\times 10^6$ células/ μL

HGB (concentração de hemoglobina), g/dL

HCT (hematócrito), %

MCV (volume médio do eritrócitos), fL

MCH (concentração de hemoglobina por eritrócito), pg

MCHC e CHCM (concentração corpuscular média de hemoglobina), g/dL

RDW (amplitude da variação do volume eritrocitário), %

HDW (amplitude da variação da concentração de Hb), g/dL

Retics (contagem de reticulócitos), células/ μL e %

Alarmes: microcitose, macrocitose, hipocromia, hipercromia, anisocitose, fragmentos eritrocitários, eritrócitos *Ghosts*

Plaquetograma

PLT (contagem de plaquetas), $\times 10^3$ células/ μL

MPV (volume plaquetar médio), fL

PDW (amplitude da variação do volume plaquetar), %

PCT (plaquetómetro)

Alarmes: plaquetas grandes, agregados plaquetares

Leucograma

WBC (contagem de célula brancas), $\times 10^3$ células/ μL

Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Basófilos ($\times 10^3$ células/ μL e %)

Alarmes: desvio esquerdo, granulócitos imaturos, blastos, linfócitos atípicos, défice de mieloperoxidase

Coagulação

O aparelho utilizado para a determinação dos parâmetros relacionados com a coagulação sanguínea é o *Stago STA-R Evolution*, cujos métodos de detecção são: coagulométrico (detecção mecânica do coágulo), cromogénico e/ou imunológico (medição da densidade óptica a 405 nm e a 540 nm). Os parâmetros analíticos determinados são: Tempo de protrombina em segundos, % de atividade, e Ratio Internacional Normalizado (INR); Tempo de tromboplastina parcial ativada em segundos; Fibrinogénio em mg/dL; e D-dímeros em µg/mL.

Velocidade de sedimentação (VS)

A VS é a medição, em milímetros, da sedimentação dos eritrócitos, em 1 hora. Durante o processo, os tubos permanecem posicionados verticalmente e imóveis num suporte adequado para a posterior medição. A VS varia com vários fatores, como a concentração plasmática de proteínas de inflamação e imunoglobulinas séricas. É um teste sensível da inflamação, embora não específico.

3.2. Microbiologia

A Microbiologia é uma área laboratorial dedicada à pesquisa de infeções em diversos produtos biológicos. Na secção de microbiologia, trata-se uma grande diversidade de amostras, tendo cada tipo de amostra um tratamento distinto, tanto no seu processamento como na interpretação dos resultados obtidos (figura 1).

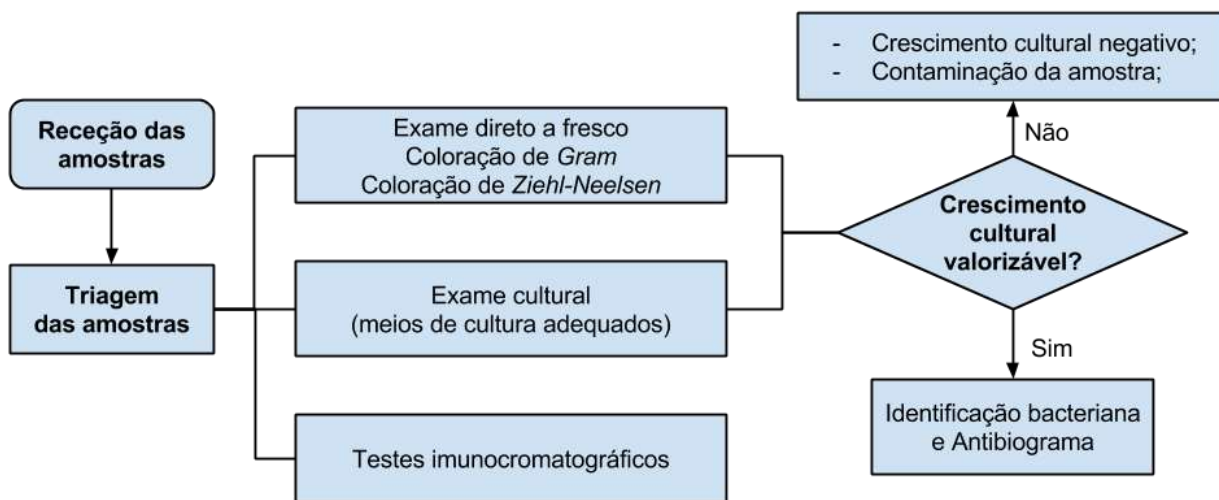


Figura 1. Fluxograma representativo da sequência de atividades a realizar após receção de uma amostra biológica, no setor de microbiologia

Em anexo (anexo I), são indicadas as amostras e os meios de cultura usados em cada uma delas, segundo os procedimentos operativos do setor de microbiologia do laboratório do HAL.

Os pedidos de uroculturas no laboratório são muito frequentes. Para o isolamento e quantificação de bactérias na urina usa-se o meio cromogéneo *Uriselect4*. É um meio não seletivo onde crescem os microrganismos presentes na urina. Pode ser usado para identificação direta e presuntiva, em que a cor e o aspeto cultural das colónias dá a indicação da bactéria responsável pela infeção.

Outros meios cromogéneos usados no laboratório são:

- ✓ Gelose *Candiselect4* → identificação de leveduras do género *Candida*;
- ✓ Gelose *Granada* → identificação de *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*). A identificação deste grupo de bactérias é aconselhada na prevenção da doença perinatal. *Streptococcus* do grupo B são bactérias colonizadoras da região vaginal e retal das mulheres que, durante o parto, estão associadas a uma variedade de riscos para o bebé.

A gelose sangue e a gelose chocolate são meios de enriquecimento. São meios altamente nutritivos que promovem o crescimento de todos os microrganismos, inclusive dos microrganismos fastidiosos, como *Streptococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, e espécies de *Neisseria*.

Como meios seletivos, usam-se no laboratório as geloses *MacConkey* e *Chapman*, em que o primeiro é utilizado para o isolamento de bacilos *Gram* negativos e o segundo para o isolamento de cocos *Gram* positivos.

Sempre que há um pedido adicional de pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), ou seja, pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como Bacilo de Koch (BK), faz-se um esfregaço da amostra, para coloração de *Ziehl-Neelsen*, que permite identificá-los.

O meio de *Lowenstein-Jensen* é um meio de enriquecimento para micobactérias. Inocula-se sempre que a coloração *Ziehl-Neelsen* seja positiva ou que haja pedido de exame cultural.

Nas coproculturas, o meio *Hektoen* é o meio seletivo e diferencial usado para o diagnóstico presuntivo de gastroenterites por espécies de *Salmonella* e *Shigella*. A gelose *Yersinia* é um meio de isolamento seletivo e diferencial de espécies de *Yersinia* a partir de amostras

fecais. O caldo Tetracionato com iodina é um caldo de enriquecimento usado para favorecer o crescimento de espécies de *Salmonella*, inibindo o crescimento de outras enterobactérias.

Para a realização de hemoculturas, o sangue é colhido para garrafas de hemocultura, seguindo regras definidas de desinfecção. As garrafas de hemocultura contêm nutrientes e um sensor que deteta o CO₂ produzido pelo crescimento bacteriano; são colocadas a incubar no equipamento *BACTEC 9240* e, se passados 5 dias as amostras não positivarem, o resultado é validado como negativo. Assim que numa garrafa de hemocultura é detetado crescimento bacteriano, é necessário proceder à coloração de *Gram*, inoculação de meios de cultura, identificação e antibiograma.

Identificação bacteriana e antibiograma

Após incubação 24/48h em aerobiose ou/e microaerofilia, os meios previamente inoculados são analisados. Dependendo do tipo de amostra e do respetivo crescimento, assim serão efetuados ou não a identificação e o antibiograma.

A identificação assim como o antibiograma são realizados no equipamento automático *MicroScan WalkAway*. Neste processo, a inoculação das galerias é feita por um método *standardizado*, utilizando um aplicador descartável. As galerias contêm várias provas bioquímicas e várias concentrações de antibióticos, de modo a identificar a bactéria causadora de infeção, assim como as concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos. O aparelho inocula, adiciona reagentes e executa a leitura das galerias. Realiza a leitura das provas bioquímicas através de um sistema ótico colorimétrico, e mede a transmissão e a absorção da luz nos poços do antibiograma, para determinar as concentrações mínimas inibitórias.

4. Setor de Bioquímica

Neste capítulo, são apresentados os equipamentos automáticos utilizados na secção de bioquímica, as suas metodologias e os parâmetros que determinam. Os analitos encontram-se agrupados por critérios de organização pessoal, tendo a consciência de que se podem relacionar de diversas formas.

4.1. Equipamentos Automáticos

4.1.1. VITROS Fusion 5.1 Chemistry System Analyzer

VITROS Fusion 5.1 Chemistry System Analyzer, da *Ortho Clinical Diagnostics* é o equipamento, no setor de bioquímica, onde são determinados os analitos apresentados na tabela 3. O laboratório está equipado com dois destes aparelhos automáticos. Organicamente, um é responsável pela análise de amostras do serviço de urgência e do internamento hospitalar, e outro pela análise das amostras dos utentes das consultas externas.

Tabela 3. Analitos bioquímicos analisados no *VITROS Fusion 5.1*

Sódio	Lactato desidrogenase
Potássio	Amilase
Cloreto	Lipase
Cálcio	Glicose
Magnésio	Colesterol total
Fósforo	Colesterol HDL
Creatinina	Colesterol LDL
Ureia	Triglicéridos
Ácido úrico	Creatinaquinase
Microalbuminúria	Creatinaquinase MB
Bilirrubinas	Proteínas totais
Aspartato Aminotransferase	Albumina
Alanina Aminotransferase	Pré-albumina
Gama Glutamyltransferase	Proteína C reativa
Fosfatase Alcalina	Ferro
Amónia	Capacidade total de fixação do ferro

O *VITROS Fusion 5.1 Chemistry System Analyzer* é um equipamento cujos testes bioquímicos utilizam química seca e, minoritariamente, química líquida; dispõe de testes potenciométricos, colorimétricos, cinéticos e turbidimétricos, cuja medição é realizada por espectrofotometria de refletância. Além dos métodos apresentados, este equipamento possui um sistema *MicroSensor* que deteta interferências nas amostras (hemólise, icterícia, turbidez) nos comprimentos de onda entre 400 – 800 nm, sem que sejam necessários reagentes, amostras ou consumíveis adicionais.

✓ **Espectrofotometria de refletância**

Na química seca, os reagentes necessários às reações estão impregnados em *microslides*, compostos por várias camadas (figura 2). Sobre o *microslide*, é depositada uma pequena quantidade de amostra do paciente, que é uniformemente distribuída pelas camadas, onde se inicia a sequência de reação. Os produtos resultantes absorvem a luz em comprimentos de onda entre 340 – 680 nm, e difundem para a camada subjacente do slide. Este processo é monitorizado por espectrofotometria de refletância, ou seja a radiação não absorvida é refletida e detetada na forma de espectro.

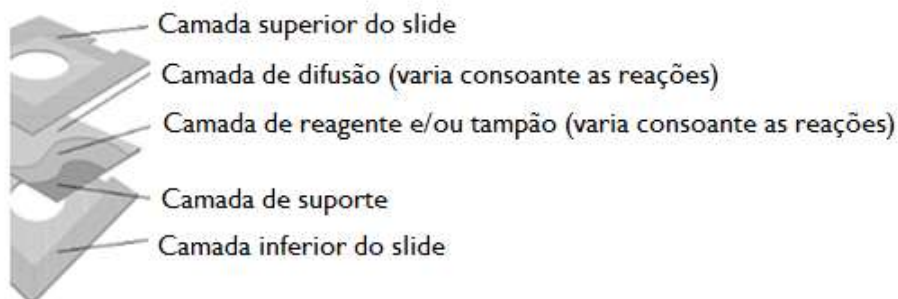


Figura 2. Esquema representativo de um *microslide* de reagentes (química seca)

✓ **Potenciometria**

A potenciometria é a medição de uma diferença de potencial elétrico entre dois elétrodos (elétrodo da amostra e elétrodo de referência) imersos numa solução, numa célula eletroquímica [4]. Os *microslides* são constituídos por dois elétrodos seletivos de iões. Ao aplicar-se a amostra do paciente e o líquido de referência em metades separadas do *microslide*, há a migração de ambos até ocorrer a junção dos líquidos, e a ligação do elétrodo de referência ao elétrodo da amostra. Cada elétrodo produz um potencial eletroquímico. A diferença de potencial entre os dois elétrodos é proporcional à concentração do analito na amostra.

✓ **Colorimetria**

A colorimetria baseia-se na comparação da intensidade da cor do complexo formado numa reação com a intensidade da cor padrão. Neste método, o analito forma um complexo com o reagente (corante) impregnado no *microslide*. A intensidade da cor é determinada por espectrofotometria de refletância, sendo diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra.

✓ **Cinética**

Os métodos cinéticos são utilizados em reações mediadas por enzimas. A camada de difusão do *microslide* contém um substrato específico, e outros componentes necessários à reação enzimática. O produto formado é monitorizado por espectrofotometria de refletância, onde a alteração de densidade do reflexo é convertida em atividade enzimática.

✓ **Turbidimetria**

O *Vitros FS 5.1*, recorre à turbidimetria nos testes que utilizam química líquida. As medições turbidimétricas são realizadas através de um espectrofotómetro, para determinar a concentração de partículas de um determinado analito numa amostra. A suspensão de partículas aumenta a turbidez da solução proporcionalmente à concentração do analito [5].

Em anexo (anexo 2), são descritas as reações bioquímicas que ocorrem na determinação de cada um dos parâmetros.

4.1.2. ADAMS AIC HA-8160

O *ADAMS AIC HA-8160*, da *Akroy*, é um analisador automático que mede a fração AIC da Hemoglobina, utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). A HPLC consiste num método que separa, identifica e quantifica substâncias químicas, consoante as suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais.

4.1.3. Access 2

No *Access 2*, da *Beckman Coulter* é realizada a determinação quantitativa dos marcadores cardíacos no soro. Este equipamento é usado para a determinação dos níveis de mioglobina e troponina I, através de imunoensaio de quimioluminescência.

✓ Imunoensaio de quimioluminescência

Uma amostra é adicionada a uma cuvete de reação, onde ocorre a combinação de partículas paramagnéticas, revestidas com anticorpo anti-analito, com o analito da amostra. Após a incubação, os materiais não ligados são removidos por lavagem. De seguida, o substrato quimioluminescente, Lumi-Phos* 530, é adicionado à cuvete e a luz gerada pela reação é medida com um fotómetro. A produção de luz é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra.

4.2. Iões

O ionograma corresponde ao doseamento dos principais eletrólitos presentes no sangue:

- os catiões: Sódio (Na^+), Potássio (K^+);
- os aniões: Cloreto (Cl^-), Bicarbonato (HCO_3^-), fosfatos, proteínas [6].

O *Vitros FS 5.1* utiliza testes potenciométricos para a determinação dos iões de sódio, potássio e cloreto. Para a determinação de cálcio, magnésio e fósforo os testes utilizados são colorimétricos, todos eles através de química seca (tabela 4).

Tabela 4. Metodologia do *Vitros FS 5.1* na determinação do ionograma

Metodologia	Tipo de teste	Analito	Valores de referência
Química seca	Potenciométrico	Sódio	136 – 145 mmol/L
		Potássio	3,6 – 5,0 mmol/L
		Cloreto	98 – 107 mmol/L
	Colorimétrico	Cálcio	8,4 – 10,2 mg/dL
		Magnésio	1,6 – 2,3 mg/dL
		Fósforo	2,5 – 4,5 mg/dL

Todos os valores de referência apresentados neste relatório correspondem aos valores de referência utilizados no laboratório do HAL.

Sódio

O sódio é o principal catião extracelular, representando assim cerca de 90% dos catiões plasmáticos [7].

A concentração sérica de Na^+ depende da ingestão e eliminação de água, assim como da função renal. O Na^+ é filtrado livremente pelos glomérulos e, normalmente, 70 a 80% de sódio filtrado é reabsorvido no túbulo proximal juntamente, com Cl^- e água, mantendo a eletroneutralidade. O restante é reabsorvido na ansa de Henle, novamente com Cl^- e água. No túbulo distal, a reabsorção de Na^+ é controlada pela ação da Aldosterona, onde a secreção de Na^+ na urina se dá por troca com K^+ [7].

Resultados inferiores ou superiores aos valores de referência podem indicar situações de hipo- ou hipernatrémia. Observam-se hiponatrémias por:

- diminuição da ingestão de Na^+ na dieta;
- depleção de Na^+ , quer por perdas digestivas (geralmente associada a vômitos e diarreia), quer por perdas urinárias (mais frequentemente por uso de diuréticos);
- retenção de água, predominantemente relacionada com insuficiência cardíaca, síndrome nefrótica, cirrose ascítica, secreção inadequada de Hormona Antidiurética (ADH) e queimaduras graves.

Nos casos de hiponatrémia, é essencial o estudo da natriúria, para identificação da sua etiologia; os valores de Na^+ na urina são mais elevados quando a causa é renal [8].

Por outro lado, a causa mais frequente de hipernatrémia é a desidratação. A diabetes insípida é das causas mais comuns de desidratação, onde as perdas de água são renais [8].

Potássio

O K^+ é o principal catião intracelular e encontra-se em concentrações 20 vezes superiores no espaço intracelular comparativamente ao espaço extracelular [9]. Esta elevada concentração intracelular é mantida por bombas $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase.

O K^+ intervém em vários processos bioquímicos como a contração muscular e a manutenção da pressão osmótica celular. A nível renal, o K^+ é filtrado no glomérulo, sendo reabsorvido, quase na sua totalidade, nos túbulos proximais. Posteriormente, sob o efeito da Aldosterona, dá-se a troca com iões Na^+ e o K^+ é secretado na urina [9].

A hipocaliémia é resultante essencialmente de perdas de potássio. Semelhante à hiponatremia, as perdas de potássio podem ser: digestivas (vômitos, diarreia) e renais (diuréticos, síndrome de *Cushing*) [8]. Uma forma eficaz de distinguir as causas de hipocaliémia é através do doseamento de K^+ eliminado na urina.

Na hiperkaliémia, há diminuição da excreção urinária de K^+ , devido sobretudo à insuficiência renal. Outras situações que podem ocorrer são hiperkaliémias em casos de acidoses, queimaduras, lise muscular e hemólise [8].

Cloreto

O cloreto é o principal anião extracelular. Está envolvido na manutenção da pressão osmótica, distribuição de água, e neutralidade elétrica. O Cl^- ingerido na dieta é absorvido quase na totalidade pelo trato intestinal, sendo o seu excedente eliminado por via renal e através da sudorese. O Cl^- é filtrado no glomérulo e, posteriormente, é reabsorvido nos túbulos proximais juntamente com Na^+ [9].

A clorémia aumenta e diminui proporcionalmente à natremia, sendo as causas de alterações da clorémia e natremia semelhantes. A hipoclorémia sem hiponatremia pode ser causada por: vômitos prolongados; alcalose metabólica e pielonefrites. As hiperclorémias não acompanhadas de hipernatremia, podem ocorrer em acidose metabólica, devido a perdas digestivas de bicarbonatos [9].

Cálcio

O Ca^{2+} encontra-se, quase na sua totalidade (99%), no tecido esquelético. No sangue, o cálcio existe sob três formas: livre (Ca^{2+} ionizado), que corresponde a 50 % do Ca^{2+} plasmático; ligado a proteínas plasmáticas (40%); e complexado com pequenos aniões (10%) [10].

A diminuição do Ca^{2+} sérico pode ser devido à diminuição do Ca^{2+} ligado à albumina, do Ca^{2+} livre ou ambos. A causa mais comum de hipocalcémia é a hipoalbuminémia, em doenças hepáticas crônicas, síndrome nefrótica e desnutrição [10]. São conhecidas outras causas de hipocalcémia, como o déficit da hormona paratiroideia (PTH), no hipoparatiroidismo primário e no déficit de vitamina D [8]. A hipercalcémia pode resultar de um aumento da absorção intestinal, retenção a nível renal ou aumento da reabsorção óssea (tumores ósseos, hiperparatiroidismo primário) [10].

Magnésio

55% do Mg^{2+} no organismo encontra-se a nível do esqueleto e 45% no interior das células ligado a proteínas. Mg^{2+} é um elemento essencial, cofator de mais de 300 enzimas [10]. A hipomagnesémia surge principalmente associada a perdas digestivas. Os casos de hipermagnesémia são frequentes nas insuficiências renais agudas ou crónicas, que diminuem a excreção urinária de Mg^{2+} [8].

Fósforo

O fósforo encontra-se distribuído pelo organismo sob a forma de fosfato. O fosfato no plasma existe na forma de aniões monovalentes (H_2PO^-) e na forma de aniões bivalentes (HPO_4^{2-}). No sangue, o fosfato orgânico encontra-se sobretudo no espaço intracelular, incorporado nos ácidos nucleicos, fosfolípidos e adenosina trifosfato (ATP) [10].

A hipofosfatémia pode ser causada por transferência de fosfato do espaço extracelular para o espaço intracelular; aumento da excreção a nível renal; ou diminuição da absorção intestinal. A hiperfosfatémia é geralmente secundária à incapacidade de excreção renal do fosfato [10].

4.3. Função Renal

Os rins são órgãos vitais, desempenhando uma variedade de funções essenciais ao organismo (tabela 5).

Tabela 5. Funções do rim

Produzir	Urina
Excretar	Catabolitos das proteínas (ureia, creatinina) Catabolitos dos ácidos nucleicos (ácido úrico) Compostos estranhos ao organismo (drogas e toxinas)
Conservar	Proteínas
Regular	Equilíbrio hidroeletrólítico Equilíbrio ácido-base
Sintetizar hormonas	Renina Eritropoietina 1,25-di-hidroxi vitamina D3 Prostaglandinas

No laboratório clínico, os testes de função renal são utilizados essencialmente para avaliar doenças renais e os equilíbrios hídrico e ácido-base.

A creatinina, a ureia e o ácido úrico são metabolitos nitrogenados, excretados do organismo por filtração glomerular (tabela 6). As suas concentrações séricas são vulgarmente utilizadas como marcadores da função renal [11].

Tabela 6. Metodologia do Vitros FS 5.1 na determinação dos indicadores da função renal			
Metodologia	Tipo de teste	Analito	Valores de referência
Química seca	Cinético	Creatinina	0,7 – 1,2 mg/dL (homem) 0,5 – 1,0 mg/dL (mulher)
	Colorimétrico	Ureia	19 – 42,8 mg/dL (homem) 15 – 36 mg/dL (mulher)
		Ácido úrico	3,5 – 8,5 mg/dL (homem) 2,5 – 6,2 mg/dL (mulher)
Química Líquida	Turbidimétrico	Microalbuminúria	< 30 mg/24 horas

Creatinina

A creatinina é produzida durante o catabolismo da creatina muscular. Os seus níveis plasmáticos refletem a massa muscular e, em situações normais, permanecem aproximadamente constantes em cada indivíduo.

Atualmente, é o composto endógeno mais utilizado como marcador da taxa de filtração glomerular (TFG), quer através da sua concentração sérica quer da *clearance* renal. Considerado um bom marcador, a creatinina possui uma baixa massa molecular; é livremente filtrada no glomérulo renal; e não é reabsorvida nos túbulos renais. A sua concentração sérica é inversamente proporcional à TFG [11].

Resultados acima dos valores de referência estão geralmente associados a casos de insuficiência renal, onde se verifica diminuição da excreção urinária da creatinina. Contudo, é importante ter em consideração a possibilidade de rabdomiólise, que ocorre normalmente na sequência de traumatismos musculares ou atividade física excessiva, por exemplo [12].

De modo a esclarecer a etiologia da creatininémia e avaliar a função renal, especialmente no acompanhamento de pacientes sujeitos a diálise, é essencial determinar a creatininúria na urina das 24 horas e a *clearance* da creatinina.

Clearance da creatinina

Historicamente, a *clearance* da creatinina tem sido vista como um método mais sensível na detecção de alterações renais, comparativamente à medição isolada da creatinina sérica. Esta medição é realizada na urina das 24 horas, o que por vezes é inconveniente, na medida em que é difícil controlar as boas condições da colheita.

O volume total de urina é medido e a *clearance* da creatinina é calculada pela fórmula:

$$\text{Clearance da Creatinina} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{CrU} \times \text{Vu}}{\text{CrS}},$$

onde CrU, Vu e CrS correspondem, respetivamente, à creatinina na urina, ao volume urinário em 24 horas e à creatinina sérica [11].

Ureia

A ureia resulta do catabolismo das proteínas e aminoácidos, e é a principal via de excreção de nitrogénio. Mais de 90% da ureia é excretada por via renal, consequentemente, a presença de patologias renais está associada à acumulação de ureia no organismo. A *clearance* da ureia foi um dos primeiros testes realizados para avaliar a *clearance* renal; atualmente, a ureia não é utilizada isoladamente como um marcador renal, mas juntamente com outros marcadores, auxilia na interpretação dos resultados e na evolução de patologias renais [13].

Ácido úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, que provêm da degradação de ácidos nucleicos da dieta e de ácidos nucleicos endógenos. Embora seja filtrado pelos glomérulos e secretado para a urina pelos túbulos distais, a maioria do ácido úrico é reabsorvido nos túbulos proximais. As hipouricémias estão relacionadas com: doença hepatocelular grave (síntese de purinas reduzida) ou défice na reabsorção tubular do ácido úrico. As hiperuricémias têm maior significado clínico e estão frequentemente associadas a crises de gota. A determinação do ácido úrico é utilizada na avaliação de distúrbios hereditários do metabolismo das purinas, monitorização de tratamentos de gota e no diagnóstico de insuficiência renal [13].

Microalbuminúria

A microalbuminúria mede pequenas concentrações de albumina na urina; é um marcador precoce da lesão renal associada à diabetes *mellitus*, patologia que provoca alterações progressivas a nível renal, nomeadamente, aumento da permeabilidade glomerular, que pode resultar em nefropatia diabética [14]. No equipamento *Vitros FS 5.1*, a presença de microalbuminúria é detetável se a albumina urinária se encontrar entre 30-300 mg/24 horas.

4.4. Função Hepática

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano. Funcionalmente, é um órgão complexo que desempenha um papel crítico no metabolismo, na digestão e na conjugação de substâncias tóxicas. Está envolvido na síntese, metabolização e excreção de moléculas, funções que são essenciais à vida [15]. Os parâmetros laboratoriais determinados na avaliação da função hepática são: Bilirrubina total (TBIL), Bilirrubina não conjugada (Bu) e Bilirrubina conjugada (Bc), Amónia, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Gama-Glutamiltransferase (γ -GT), Fosfatase Alcalina (ALP) e Lactato desidrogenase (LDH) (tabela 7).

Tabela 7. Metodologia do *Vitros FS 5.1* na determinação dos indicadores da função hepática

Metodologia	Tipo de teste	Analito	Valores de referência
Química seca	Colorimétrico	TBIL ¹	0,20 – 1,30 mg/dL
		Bu ² e Bc ³	Bu: 0,00 – 1,10 mg/dL Bc: 0,00 – 0,30 mg/dL
		Amónia	9 – 30 μ mol/L
	Cinético	AST ⁴	17 – 59 U/L (homem) 14 – 36 U/L (mulher)
		ALT ⁵	21 – 72 U/L (homem) 9 – 52 U/L (mulher)
		γ -GT ⁶	15,0 – 73,0 U/L
		ALP ⁷	38 – 126 U/L
		LDH ⁸	313 – 618 U/L

1-Bilirrubina total; 2-Bilirrubina não conjugada; 3-Bilirrubina conjugada; 4-Aspartato Aminotransferase; 5-Alanina Aminotransferase; 6-Gama-Glutamiltransferase; 7-Fosfatase Alcalina; 8-Lactato desidrogenase

Bilirrubinas

A bilirrubina é produzida a partir de proteínas que contêm um grupo heme. Aproximadamente 85% da bilirrubina total produzida é derivada do grupo heme da hemoglobina dos eritrócitos, que são destruídos no sistema reticulo-endotelial do fígado, baço, e medula óssea. Os restantes 15% são produzidos a partir do catabolismo de outras proteínas como a mioglobina, citocromos e peroxidases [16].

Na corrente sanguínea, a Bu é transportada para o fígado ligada à albumina, onde posteriormente sofre o processo de conjugação com o ácido glucorónico. No intestino, a Bc é hidrolisada pela β -glucuronidase proveniente do fígado, das células epiteliais intestinais e das bactérias intestinais, originando urobilinogénio. Parte desse urobilinogénio é reabsorvido pelo intestino, retorna ao fígado e é excretado na bÍlis. Além disso, uma pequena fração do urobilinogénio entra na circulação sanguínea e é eliminado na urina. Na parte inferior do trato intestinal, o urobilinogénio é oxidado em urobilina, o pigmento das fezes [16].

Quando retida no organismo, a bilirrubina é potencialmente tóxica. O seu aumento sérico origina um sinal clínico característico: a icterícia. A determinação das concentrações plasmáticas da Bc, Bu e TBIL é fundamental na compreensão da etiologia de quadros ictericos. Normalmente, observa-se um aumento de Bu em doenças hemolíticas e em patologias que provocam defeitos na conjugação (síndrome de Gilbert). As hiperbilirrubinémias conjugadas ocorrem em patologias hepatobiliares, como colestase hepática e colestase biliar.

O *Vitros FS 5.1* faz a medição quantitativa das concentrações séricas de Bu, Bc e TBIL; e calcula as concentrações da bilirrubina direta (DBIL) e da bilirrubina neonatal (NBIL):

- As **bilirrubinas (Bu e Bc)** são determinadas em simultâneo no *MicroSlide BuBc*;
- A **TBIL** sérica consiste na quantificação da bilirrubina não conjugada, da bilirrubina conjugada e da bilirrubina delta, uma fração da bilirrubina ligada covalentemente à albumina;
- A **DBIL** inclui as bilirrubinas conjugada e delta. É calculada pelo equipamento, utilizando os resultados medidos e a seguinte equação: $DBIL = TBIL - Bu$;
- A **NBIL**, que é a soma de Bu e Bc, encontra-se aumentada na eritroblastose fetal (doença hemolítica do recém nascido). Na maioria das vezes, a hiperbilirrubinémia traduz-se numa icterícia fisiológica, não estando necessariamente associada a uma patologia. É calculada pela equação: $NBIL = Bu + Bc$.

AST e ALT

As transaminases são enzimas presentes em várias células do organismo. A AST é uma enzima encontrada principalmente no coração, fígado, músculo esquelético e rim, enquanto que a ALT é encontrada essencialmente a nível hepático e renal. Relativamente à localização intracelular, a ALT encontra-se exclusivamente no espaço citoplasmático e a AST no espaço citoplasmático e mitocondrial. As patologias hepáticas, como hepatite alcoólica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e hepatites virais, são as causas mais importante de alterações séricas das transaminases [17].

Em processos que afetem a integridade dos hepatócitos, verifica-se sempre aumento das concentrações séricas de ambas as enzimas, ALT e AST. Contudo, o aumento da atividade da ALT no soro persiste por mais tempo e é mais específica do fígado; raramente se encontra aumentada em patologias que não envolvam o parênquima hepático. A concentração sérica da AST também pode aumentar após um enfarte agudo do miocárdio (EAM), em distrofias musculares e, mais moderadamente, em doenças hemolíticas [17].

γ -GT

A γ -GT é uma enzima envolvida na transferência de resíduos γ -glutamil. A γ -GT encontra-se principalmente nos rins, fígado, pâncreas e intestino. No entanto, as aplicações clínicas do doseamento da γ -GT estão confinadas à avaliação da função hepática e do sistema biliar.

O aumento das suas concentrações séricas está geralmente associado a casos de obstrução intra- ou pós-hepática, atingindo cerca de 5 a 30 vezes o limite superior do intervalo de referência. Além disso, os níveis de γ -GT encontram-se particularmente elevados em casos de alcoolismo, sendo a sua determinação sérica utilizada na monitorização em indivíduos alcoólicos ou em recuperação [17].

ALP

A ALP pertence a um grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de vários ésteres de fosfato, a um pH alcalino. A ALP é encontrada em concentrações mais elevadas no intestino, rim, fígado, osso e placenta. No osso, a sua atividade limita-se aos osteoblastos, estando envolvida na produção de matriz óssea [18].

A determinação dos níveis séricos da ALP tem maior significado no diagnóstico e na avaliação de patologias hepatobiliares e ósseas. Em resposta a situações de obstrução hepatobiliar, ocorre aumento da síntese da ALP pelos hepatócitos. Esse aumento tende a ser mais significativo em obstruções extra-hepáticas e é tanto maior quanto maior a obstrução. No que diz respeito a patologias ósseas, a ALP é um excelente indicador da formação óssea, auxiliando no diagnóstico da doença de *Paget*, osteomalácia, raquitismo e osteosarcoma. Nas crianças e adolescentes, na fase de crescimento ósseo, observa-se um aumento fisiológico dos níveis de ALP [17].

Amónia

A amónia é formada durante o catabolismo de aminoácidos e convertida em ureia, no fígado. Posteriormente, a ureia é removida do organismo e excretada por via urinária. Assim, a amoniémia pode fornecer informações úteis na avaliação de insuficiência hepática e em deficiências enzimáticas hereditárias do ciclo da ureia.

A insuficiência hepática grave é a causa mais comum de perturbações no metabolismo da amónia, provocando uma diminuição na formação da ureia, que se traduz num aumento da amónia sanguínea. Em concentrações elevadas, a amónia é tóxica ao organismo, provocando encefalopatias hepáticas.

LDH

A LDH é uma enzima que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato. A LDH encontra-se presente no citoplasma de todas as células. É encontrada em maior concentração no coração, fígado, músculo esquelético, rim e eritrócitos. Sendo um marcador de lesão hepática, não apresenta no entanto especificidade para o fígado, ou seja, o seu aumento na corrente sanguínea pode ser provocado por uma grande variedade de situações clínicas, como neoplasias, cirroses hepáticas, anemias hemolíticas, EAM, traumatismos e danos musculares [17].

4.5. Função Pancreática

A insuficiência pancreática traduz-se na incapacidade do pâncreas produzir e/ou transportar enzimas digestivas suficientes para permitir uma boa absorção intestinal dos nutrientes. As principais doenças pancreáticas que surgem no adulto são: pancreatite aguda; pancreatite crónica; e carcinoma do pâncreas. No diagnóstico das pancreatites, utiliza-se essencialmente a análise de duas enzimas pancreáticas, a amilase e a lipase (tabela 8) [19].

Metodologia	Tipo de teste	Analito	Valores de referência
Química seca	Cinético	Amilase	30 – 110 U/L
		Lipase	23 – 300 U/L

Amilase

A amilase é uma enzima pertencente à classe das hidrolases responsáveis pela degradação do amido, durante a digestão. Devido ao seu baixo peso molecular, é a única enzima encontrada fisiologicamente na urina. Está presente em maior concentração nas glândulas salivares e no pâncreas [17].

Não é um marcador específico da função pancreática, contudo a deteção de valores elevados desta enzima é útil no diagnóstico diferencial de pancreatites agudas, principalmente, quando associada à determinação sérica da lipase.

Lipase

A lipase é uma enzima segregada pelo pâncreas, importante na digestão dos lípidos. É uma molécula pequena, filtrada através do glomérulo e totalmente reabsorvida pelos túbulos renais, por conseguinte, em situações normais não é detetada na urina [17].

A determinação dos níveis de lipase no soro é utilizada no diagnóstico de pancreatites agudas, no entanto a sua concentração plasmática não é necessariamente proporcional à gravidade da pancreatite [17].

4.6. Glicémia e Diabetes

A diabetes *mellitus* é uma situação clínica de grande prevalência associada a distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono. A diabetes é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicémia, devido à deficiência de insulina ou à resistência das células à sua ação. A hiperglicémia a longo prazo está associada a lesões vasculares, que podem levar a retinopatia, nefropatia e neuropatia [20]. Os principais testes laboratoriais utilizados no diagnóstico e monitorização da diabetes são a glicémia em jejum; a prova de tolerância à glicose (PTGO); e a hemoglobina glicada ou hemoglobina A1C (HbA1C).

Glicémia em jejum e PTGO

No *Vitros FS 5.1*, o doseamento da glicémia sérica, seja em jejum ou no seguimento da PTGO, é realizado através de um teste colorimétrico.

A glicémia em jejum e a PTGO são utilizadas como critérios no diagnóstico da diabetes *mellitus* e são consideradas provas essenciais no que se refere ao seguimento da grávida com diabetes gestacional [21].

Segundo a Direcção-Geral da Saúde (DGS), a diabetes gestacional define-se como uma intolerância à glicose, de grau variável, que é diagnosticada, pela primeira vez, durante a gravidez. Geralmente é transitória, desaparecendo com o fim da gestação. A PTGO deve efectuar-se com sobrecarga de 75g de glicose, com colheitas aos: 0, 60 e 120 minutos [22].

HbA1C

A hemoglobina (Hb) de uma pessoa adulta, geralmente, consiste em 97% HbA; 2,5% HbA2; e 0,5% HbF. Uma fração da HbA, a HbA1, pode sofrer glicação não enzimática, ou seja, adição de resíduos de açúcar aos grupos amino, formando assim a fração HbA1C. Esta ligação é estável e irreversível, acompanhando o ciclo de vida média de um eritrócito (120 dias) [21].

A HbA1C é determinada, por rotina, em todas as pessoas que sofrem de diabetes, para a monitorização da glicémia e controlo da terapêutica aplicada. No laboratório do HAL, para a quantificação de fração de HbA1C, utiliza-se o equipamento *ADAMS A1C HA-8160*, da *Akroy*, que apresenta os resultados em percentagem e em concentração, expressa em mmol/mol.

Diagnóstico da diabetes

Segundo a DGS, para que um indivíduo seja diagnosticado com diabetes, tem que se enquadrar num dos critérios apresentados na tabela 9 [23].

Tabela 9. Critérios no diagnóstico da diabetes, segundo a DGS

Diabetes	<ul style="list-style-type: none">• Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dL• Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dL• Glicémia ≥ 200 mg/dL aos 120 minutos, na PTGO¹ com 75g de glicose• HbA1c² $\geq 6,5\%$
Hiperglicémia intermédia/ Risco aumentado para diabetes	Anomalia da Glicémia em Jejum: glicémia em jejum ≥ 110 e < 126 mg/dL
	Tolerância Diminuída à Glicose: glicémia aos 120 minutos na PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dL
Diabetes gestacional	Glicémia em jejum, realizada na 1ª consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL
	Se a glicémia em jejum < 92 mg/dL, realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores: <ul style="list-style-type: none">• aos 0 minutos, glicemia ≥ 92 mg/dL• aos 60 minutos, glicemia ≥ 180 mg/dL• aos 120 minutos, glicemia ≥ 153 mg/dL

1- Prova de tolerância à glicose; 2-Hemoglobina A1C ou hemoglobina glicada

4.7. Estudo do Perfil Lipídico

Os lípidos exercem funções essenciais ao organismo. São importantes constituintes das membranas celulares, mantendo a estrutura e integridade das células, são precursores na síntese hormonal e são das principais fontes de energia do organismo [24].

O estudo do perfil lipídico e lipoproteico tem vindo a assumir, cada vez mais, um papel importante na prática clínica, principalmente devido à sua associação a doenças arteriais coronárias. Numerosos estudos epidemiológicos demonstraram que há uma clara associação entre os níveis de lípidos no sangue e o desenvolvimento da aterosclerose. No estudo do perfil lipídico, avaliam-se os seguintes parâmetros analíticos: Colesterol total; Colesterol associado às Lipoproteínas de Elevada Densidade (HDL); e Triglicéridos, determinados no *Vitros FS 5.1*, através de química seca, por testes colorimétricos; e o Colesterol associado às Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) não se determina diretamente.

Colesterol total

O colesterol é um álcool insaturado da classe dos esteróides, podendo apresentar-se sob a forma livre ou esterificada. É, juntamente com os fosfolípidos, um elemento estrutural das membranas celulares; no fígado, é convertido em ácidos biliares, que promovem a absorção intestinal da gordura da dieta; é um importante precursor na biossíntese de hormonas esteróides; e pode ser transformado em vitamina D3 pela radiação solar [24].

Por dia, 30 a 60% do colesterol da dieta é absorvido no intestino delgado. Contudo, uma grande parte do colesterol provém da biossíntese endógena que ocorre essencialmente no fígado e intestino. Os valores do colesterol total devem encontrar-se inferiores a 190 mg/dL e são considerados elevados acima dos 240 mg/dL.

Colesterol associado às lipoproteínas

Os lípidos sintetizados no fígado e intestino são transportados no plasma em complexos macromoleculares, as lipoproteínas. As lipoproteínas contêm diferentes proporções de lípidos/proteínas, ou seja apresentam diferentes densidades. De acordo com essa densidade, foram classificadas nas seguintes categorias: Quilomícrons; Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade (VLDL); Lipoproteína de Densidade Intermédia (IDL); LDL; e HDL [25].

Embora o colesterol seja necessário, o seu excesso pode tornar-se tóxico para as células. As LDL são as lipoproteínas responsáveis pelo transporte do colesterol aos diversos tecidos, sendo a sua internalização mediada pela ligação das LDL a recetores específicos, presentes nas membranas celulares [25].

Na maioria dos laboratórios, a quantificação do colesterol LDL é feita por estimativa, a partir da equação de Friedewald:

$$\text{Colesterol LDL} = (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol HDL}) - (\text{Triglicéridos} / 5),$$

onde (Triglicéridos/5) representa o colesterol ligado às VLDL. Os valores de triglicéridos devem ser inferiores a 150 mg/dL. Em pacientes com TG > 400mg/dL a equação é imprecisa. Nestes casos, a quantificação do colesterol LDL deve ser obtida por doseamento direto [24]. No laboratório do HAL, não se realiza o doseamento direto do colesterol LDL logo, nestas circunstâncias, a amostra é enviada para um laboratório exterior.

As lipoproteínas HDL têm a capacidade de remover o excesso de colesterol celular dos tecidos periféricos para o fígado, para posterior excreção; chama-se a este processo o transporte reverso do colesterol. São, portanto, benéficas e reduzem o risco de doenças ateroscleróticas [24]. Os valores do colesterol HDL são considerados baixos se inferiores a 40,0 mg/dL.

Triglicéridos

Os triglicéridos são moléculas que contêm três ácidos gordos ligados a um glicerol, e representam cerca de 95% da gordura armazenada nos tecidos. Os triglicéridos provenientes da dieta são absorvidos no intestino; nos enterócitos, vão-se incorporar aos quilomícrons, as maiores lipoproteínas, em termos de diâmetro, e as menos densas. Uma vez que entram na circulação, os triglicéridos dos quilomícrons são rapidamente hidrolisados pelas lipases e, dentro de algumas horas, são transformados em quilomícrons remanescentes, que são reconhecidos pelo fígado. Deste modo, o principal papel destas lipoproteínas é fornecer ao fígado os lípidos provenientes da dieta [25].

Após uma refeição, verifica-se um aumento significativo dos triglicéridos no plasma, associado a um aumento dos quilomícrons em circulação. Por esta razão, e de maneira a garantir resultados fidedignos, é crucial que a recolha do sangue seja realizada quando o utente se encontra em jejum de 12 horas [26]. Os valores dos triglicéridos são considerados normais quando inferiores a 150 mg/dL; elevados quando se encontram entre 200 – 499 mg/dL; e muito elevados quando superiores ou iguais a 500 mg/dL.

A quantificação sérica do colesterol associado às lipoproteínas LDL e HDL, apresenta um grande significado clínico no diagnóstico de dislipidémias e na avaliação do risco de aterosclerose. Níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicéridos, acompanhados de valores baixos de colesterol HDL, são situações preocupantes que representam um elevado risco de doenças cardiovasculares. No entanto, os resultados laboratoriais devem ser interpretados consoante o contexto clínico. A avaliação do risco de doenças cardiovasculares baseia-se na presença de evidências clínicas e fatores de risco como: doença coronária existente; doenças vasculares; hipertensão arterial; excesso de peso e obesidade; tabagismo; diabetes; e história familiar de doenças cardiovasculares.

4.8. Marcadores Cardíacos

A determinação dos marcadores cardíacos auxilia no diagnóstico e na monitorização do tratamento de doentes com dor torácica e suspeita de EAM [27].

O EAM é definido como uma necrose do músculo cardíaco, provocada por isquémia prolongada. Devido à falta de um marcador ideal de lesão cardíaca, tem sido recomendada uma combinação de marcadores. Atualmente, os biomarcadores mais utilizados são: creatinaquinase (CK) e creatinaquinase MB (CK-MB); mioglobina; e as troponinas cardíacas.

No laboratório do HAL, as determinações de CK e CK-MB realizam-se no equipamento *Vitros FS 5.1*, através de química seca. A determinação destes analitos é realizada por um teste cinético. As quantificações séricas da mioglobina e da troponina I são realizadas no equipamento *Access 2* da *Beckman Coulter*, através de um imunoensaio de quimioluminescência.

CK e CK-MB

A CK é uma enzima envolvida, essencialmente, na produção de ATP na contração muscular, apresentando uma maior atividade no músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro. Por se encontrar em concentrações elevadas no tecido muscular, a CK é considerada um marcador sensível de lesões como o EAM e distrofias musculares. Os níveis séricos de CK são influenciados pela massa muscular de cada indivíduo, dependendo assim do sexo, raça, idade e condição física [18].

A CK é um dímero composto por duas subunidades, B e M. Deste modo, pode apresentar três isoformas: CK-BB, CK-MB e CK-MM. A distribuição destas isoenzimas nos tecidos é mais específica, portanto a sua quantificação tem uma maior relevância clínica comparativamente à quantificação dos níveis totais de CK. De um modo geral, CK-BB encontra-se em maior concentração no cérebro; CK-MB no miocárdio; e CK-MM no músculo esquelético [18]. Os valores de referência de CK e CK-MB encontram-se entre 55 – 170 U/L e 0 – 16 U/L, respetivamente.

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína globular de cadeia simples, responsável pelo transporte do oxigênio nas células musculares; encontra-se no músculo esquelético e cardíaco. Juntamente com outros marcadores cardíacos, desempenha um papel importante no diagnóstico de EAM, por ser um marcador precoce, contudo pode estar alterada em outras situações (por exemplo: distrofias musculares e rabdomiólise), não apresentando por isso especificidade para lesões do miocárdio [28]. O intervalo de referência para a mioglobina é: 17,4 – 105,7 ng/mL.

Troponina I

A troponina é uma proteína estrutural, localizada no músculo esquelético e cardíaco, que regula a interação entre a actina e a miosina. É constituída por três frações: troponina C (TnC); troponina I (TnI); e troponina T (TnT) [27].

A determinação de TnI pode ser realizada por si só ou juntamente com outros biomarcadores cardíacos. Hoje em dia, as troponinas começam a substituir a CK e CK-MB no diagnóstico de lesões do miocárdio, pois são específicas e mantêm-se elevadas no soro por um longo período de tempo. Os valores de referência para a Troponina I são: negativo < 0,04 ng/mL; lesão > 0,5 ng/mL.

Biomarcadores Cardíacos de EAM

A mioglobina é o marcador de lesão cardíaca mais precoce que aparece na corrente sanguínea. É detetável no soro 1 a 4 horas após início dos sintomas de EAM, atingindo o pico de concentração entre 6 e 9 horas. Devido ao seu baixo peso molecular, é rapidamente eliminado na urina e os seus níveis séricos voltam ao normal após 18 a 24 horas [29].

O nível sérico da CK-MB começa a aumentar 4 a 6 horas após o início da sintomatologia do EAM, atingindo o pico entre as 12 e as 24 horas. A concentração sérica de CK-MB regressa aos níveis basais dentro de 2 a 3 dias após o EAM [29].

As troponinas apresentam alta sensibilidade e especificidade para lesões do miocárdio. Os seus níveis séricos aumentam 4 a 10 horas após o início dos sintomas, atingem o pico em 12 a 48 horas, e permanecem elevadas na corrente sanguínea por 4 a 10 dias. As troponinas são portanto biomarcadores tardios, que se mantêm aumentados durante longos períodos de tempo. A sua determinação é bastante útil em pacientes que não procuram ajuda médica em 2 ou 3 dias após o EAM [29].

4.9. Proteínas de Interesse Clínico

No corpo humano existem milhares de proteínas diferentes; muitas são elementos estruturais de células ou tecidos e outras são solúveis nos líquidos intra- ou extracelulares. As proteínas plasmáticas são imprescindíveis à manutenção da pressão oncótica e do equilíbrio hidroeletrolítico. A grande maioria destas proteínas são sintetizadas no fígado e circulam na corrente sanguínea, sendo responsáveis pelo transporte de hormonas, vitaminas, metais, fármacos e outras moléculas [30]. As principais proteínas plasmáticas podem ser divididas em dois grupos: albumina e globulinas. Na tabela 10 são referidos os parâmetros determinados no *Vitros FS 5.1*, relativamente às proteínas séricas; as respetivas metodologias aplicadas na sua determinação; e os seus valores de referência.

Tabela 10. Metodologia do *Vitros FS 5.1* na determinação das proteínas

Metodologia	Tipo de teste	Analito	Valores de referência
Química seca	Colorimétrico	Proteínas totais	6,3–8,2 g/dL
		Albumina	3,5–5,0 g/dL
Química líquida	Turbidimetria	Pré-albumina	17,6-36 mg/dL

Proteínas totais

A concentração de proteínas totais no soro pode ser utilizada para avaliar o estado nutricional dos pacientes. Entre as causas de elevada concentração de proteínas totais no soro encontram-se a desidratação, o Mieloma Múltiplo, hipergamaglobulinémia, infeções e inflamações. Por outro lado, a diminuição da concentração de proteínas totais no soro pode estar associada à gravidez, a cirrose, alcoolismo crónico, síndrome nefrótica, glomerulonefrite, neoplasias, malabsorção e desnutrição grave.

Albumina

A albumina é uma pequena proteína com uma massa molecular de 66,3 kDa. É a proteína plasmática mais abundante, correspondendo a cerca de 50% das proteínas totais do plasma. A sua síntese ocorre essencialmente a nível do parênquima hepático. É responsável pelo transporte de um grande número de compostos, incluindo ácidos gordos, drogas, hormonas e bilirrubina [28, 30].

Pré-albumina

A pré-albumina ou transtirretina é uma proteína sintetizada no fígado e é responsável pelo transporte das hormonas da tiróide. Além disso, forma um complexo com a proteína transportadora de retinol (vitamina A). A pré-albumina encontra-se diminuída em lesões hepáticas, respostas inflamatórias de fase aguda, necrose tecidual e desnutrição [28, 30].

Proteinograma eletroforético

O proteinograma eletroforético é uma técnica utilizada no laboratório, para identificar patologias onde se verificam alterações nas proteínas séricas, como o Mieloma Múltiplo. A eletroforese é uma técnica que faz a separação das proteínas séricas, consoante a mobilidade das moléculas, quando submetidas a um campo elétrico.

No laboratório do HAL, o equipamento no qual se realizam os proteinogramas eletroforéticos é o *InterLab G26*. Neste equipamento, as proteínas são separadas, a pH alcalino, em placas de gel de agarose. Em meio alcalino, as proteínas estão carregadas negativamente e, na presença de um campo elétrico, migram em direção ao ânodo a uma velocidade dependente da sua carga e peso molecular. Após a separação, as bandas eletroforéticas são coradas e lidas através de um densitómetro.

Os resultados de cada fração, obtidos a partir de densitometria, são expressos em percentagem (tabela 11); após multiplicação desse valor pela concentração de proteínas totais, obtém-se valor da concentração de cada banda, expresso em g/L. A largura das bandas depende do número de proteínas presentes na referida fração.

Tabela 11. Valores de referência das frações das proteínas séricas	
Frações	Valores de referência
Albumina	54 – 66 %
Alfa-1 (α 1- Antitripsina; α 1- Glicoproteína ácida)	1,4 – 2,8 %
Alfa-2 (α 2- Macroglobulina; Ceruloplasmina; Haptoglobina; α -Lipoproteínas)	9,1 – 13,8 %
Beta (Hemopexina; Transferrina; Plasminogénio; C3; β -Lipoproteínas)	8,7 – 14,4 %
Gama (Fibrinogénio; Imunoglobulinas; Proteína-C Reativa)	10,6 – 19,2 %

De acordo com a migração, do cátodo para o ânodo, as proteínas séricas separam-se em cinco bandas (figura 3).

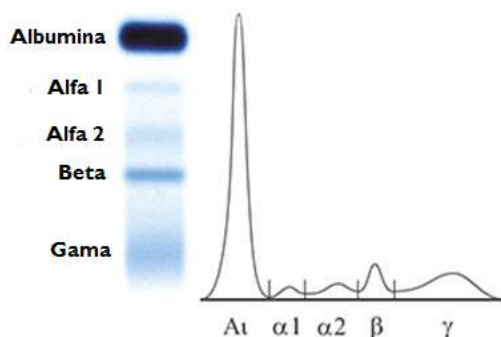


Figura 3. Figura representativa de uma eletroforese normal, em gel de agarose, e respetivo gráfico, onde são evidentes as diferentes densidades das frações

Os níveis séricos de proteínas são úteis na avaliação de inflamações agudas, traumas, necrose e queimaduras. Reações de fase aguda envolvem aumento sérico de Proteína-C Reativa (PCR), α 1-glicoproteína ácida, α 1-antitripsina, haptoglobina, fibrinogénio, ceruloplasmina e componente C3 do complemento. Por outro lado, a albumina é uma proteína negativa de fase aguda, isto é, nessas situações encontra-se diminuída na corrente sanguínea [31].

Na interpretação da eletroforese, a região gama é particularmente importante; o aumento sérico das gamaglobulinas pode ser originado por: doença de *Hodgkin*; Leucemia Linfocítica Crónica; Mieloma Múltiplo e macroglobulinemia de *Waldenstrom* [31].

4.10. Marcadores de Fase Aguda

As infeções bacterianas, traumas, lesões hemorrágicas e tecidulares são situações que provocam respostas inflamatórias de fase aguda [32, 33]. Ao longo dos anos, a PCR e a procalcitonina (PCT) têm vindo a assumir uma contribuição importante no diagnóstico de processos inflamatórios e septicémias.

No laboratório do HAL, a PCR é determinada no *Vitros FS 5.1*, através de química seca, por um teste imuno-cinético. A quantificação da PCT sérica é realizada no equipamento *ADVIA CENTAUR XP*, na secção de Imunologia. Contudo, uma vez que se trata de um parâmetro importante na avaliação de reações de fase aguda, vai ser discutido neste capítulo.

PCR

A PCR deve o seu nome à sua capacidade de precipitar em contacto com o polissacarídeo C da parede celular de Pneumococos. A PCR é sintetizada no fígado e é uma das primeiras proteínas de fase aguda a aumentar na corrente sanguínea. É responsável por facilitar a fagocitose de microrganismos através do processo de opsonização; processo pelo qual a ligação da PCR a bactérias e fungos ativa a cascata do complemento e dos fagócitos [28].

Os valores de referência da PCR são <10 mg/L. Verifica-se um aumento sérico de PCR em enfartes do miocárdio, traumas, infeções, inflamação e proliferação neoplásica.

Procalcitonina

A PCT é a pré-hormona da calcitonina, segregada pelas células parafoliculares da tiróide. A PCT é produzida ubiquamente em resposta a endotoxinas bacterianas. Com base neste facto, a sua determinação sérica destaca-se como um marcador específico de infeções bacterianas, assim como da gravidade da infeção [33, 34]. Os valores de referência da PCT são <0,1 ng/mL.

4.1.1. Metabolismo do ferro

O ferro apresenta funções essenciais ao organismo: participa no transporte de oxigénio; está envolvido na respiração celular (componente essencial de enzimas como o citocromo c); e é um cofator de enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores [35].

Encontra-se sob diferentes formas: como componente do grupo heme da hemoglobina; armazenado sob a forma de ferritina; armazenado nos tecidos, onde atua como cofator enzimático; e como componente da mioglobina.

Os enterócitos duodenais absorvem apenas 10% do ferro proveniente da dieta. Circula no plasma ligado à transferrina, uma glicoproteína com alta afinidade para o Fe^{3+} . A transferrina fornece o ferro aos tecidos, principalmente, ao osso e à medula. Além do ferro da dieta, o organismo tem um mecanismo de “reciclagem”: após 120 dias em circulação, os eritrócitos são destruídos e o ferro que constitui o grupo heme da Hb é reutilizado; retoma à circulação sanguínea, e liga-se novamente à transferrina.

No laboratório do HAL, o Ferro sérico e a Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC) são determinados no equipamento *Vitros FS 5.1*, através de química seca, por um teste cinético.

A quantificação da Ferritina sérica é realizada no equipamento *ARCHITECT i2000sr*, na secção de imunologia, contudo, uma vez que se trata de um parâmetro envolvido essencialmente na homeostase do ferro, vai ser discutido neste capítulo.

Ferro

Na mulher, os valores de referência do ferro sérico encontram-se entre 37 e 170 µg/dL; enquanto no homem se situam entre 49 e 181 µg/dL. Os principais distúrbios associados ao metabolismo do ferro são: deficiência e sobrecarga de ferro.

A deficiência de ferro é uma das doenças mais comuns no Homem. É frequente em crianças devido a deficiências nutricionais; em adultos, é quase sempre resultante de perdas crónicas de sangue; e especialmente nas mulheres em idade fértil, por perdas menstruais.

Relativamente ao excesso de ferro (hipersiderémia), é frequentemente provocado por transfusões sanguíneas, excesso de absorção intestinal e anemias sideroblásticas [8].

TIBC

TIBC é a quantidade de ferro que pode ser ligado à transferrina até esta se encontrar saturada.

No homem, os valores de referência de TIBC encontram-se entre 261 – 462 µg/dL e na mulher entre 265 – 497 µg/dL. Há determinadas situações que provocam aumento da TIBC, nomeadamente a deficiência de ferro. Por outro lado, ocorre diminuição da TIBC em consequência de hipersiderémias, infeções crónicas e neoplasias. A saturação da transferrina, pode então ser calculada a partir da seguinte fórmula [16]:

$$\text{Saturação da transferrina (\%)} = 100 \times \text{Ferro sérico} / \text{TIBC}$$

Ferritina

A ferritina está presente na corrente sanguínea em concentrações muito baixas. Embora seja uma proteína de fase aguda, em condições normais, reflete o conteúdo de ferro no organismo. No desenvolvimento de anemias microcíticas hipocrómicas, por deficiência de ferro, a concentração sérica de ferritina diminui muito antes de ocorrerem variações nos valores da hemoglobina, microcitose ou diminuição do ferro sérico. Deste modo, a ferritina constitui um indicador precoce e sensível, útil no diagnóstico e acompanhamento de anemias por deficiência de ferro. Os valores de referência da ferritina situam-se entre 14 e 233 ng/mL.

5. Setor de Imunologia

Neste capítulo, são apresentados os equipamentos automáticos utilizados na secção de imunologia, as suas metodologias e os parâmetros por eles determinados. Após determinação dos parâmetros bioquímicos, as amostras de soro que assim necessitarem são separadas em alíquotas devidamente identificadas e, posteriormente, são analisadas na secção de imunologia.

5.1. Equipamentos Automáticos

A secção de imunologia é composta por dois equipamentos automáticos, *ADVIA CENTAUR XP* e *Architect i2000sr*.

5.1.1. *ADVIA CENTAUR XP*

O sistema *ADVIA Centaur XP* é um analisador automatizado de imunoensaio; este inclui o estudo da fertilidade, funcionamento da tiróide, oncologia, anemias, doenças infecciosas, entre outros (tabela 12).

Tabela 12. Analitos analisados e tipo de imunoensaio utilizado no *ADVIA Centaur XP*

	Analito	Imunoensaio
Tiróide	TSH ¹	<i>Sandwich</i>
	T3 ² e T4 ³ ; FT3 e FT4 ; aTG ⁴ e aTPO ⁵	Competitivo
Fertilidade	FSH ⁶ e LH ⁷ ; Prolactina	<i>Sandwich</i>
	Estradiol; Progesterona; Testosterona	Competitivo
Outras hormonas	Cortisol	<i>Sandwich</i>
	iPTH ⁸	Competitivo
Marcadores Tumorais	AFP ⁹ ; CEA ¹⁰ ; CA ¹¹ 125; CA 19.9; PSA ¹² e fPSA	<i>Sandwich</i>
	CA 15.3	Competitivo
Vitaminas	Ácido Fólico e Vitamina B12	Competitivo
Outros	Procalcitonina	<i>Sandwich</i>

1-Tireoestimulina; 2-Triiodotironina; 3-Tiroxina; 4-Anticorpos anti-tiroglobulina; 5-Anticorpos anti-peroxidase; 6-Hormona Folículo-estimulante; 7-Hormona Luteinizante; 8-Hormona paratiroideia; 9-Alfa-fetoproteína; 10-Antígeno Carcinoembrionário; 11-Cancer Antigens; 12-Antígeno específico da Próstata

Todos os ensaios utilizam a tecnologia quimioluminescente. Os imunoenaios utilizam o éster de acridina (EA) como marcador quimioluminescente e partículas paramagnéticas (PPM) revestidas por anticorpos (Ac) ou antígenos (Ag). O equipamento aplica o imunoenasiao baseado na ligação antígeno-anticorpo, utilizando diferentes formatos: imunoenasiao não competitivo, do tipo *sandwich*, e imunoenasiao competitivo.

✓ Imunoenasiao de quimioluminescência do tipo não competitivo

Num imunoenasiao não competitivo (*sandwich*), Ac específicos para o analito, ligados a PPM, são imobilizados num suporte sólido.

Após a adição do reagente, contendo Ac marcado com EA, à amostra, ocorre um tempo de incubação e dá-se a ligação do analito (Ag da amostra) ao Ac marcado (figura 4, 1ª etapa). Em seguida são adicionadas as PPM revestidas com Ac específicos, que também se ligam ao analito da amostra (figura 4, 2ª etapa). Assim, nesta etapa do imunoenasiao, forma-se um complexo: PPM revestidas com Ac - Ag da amostra - Ac marcado com EA. Através da exposição das cuvete a um campo magnético, as PPM são atraídas por ímanes. A amostra e o reagente não ligados às PPM são removidos por lavagem, permanecendo na cuvete apenas os complexos com o analito de interesse.

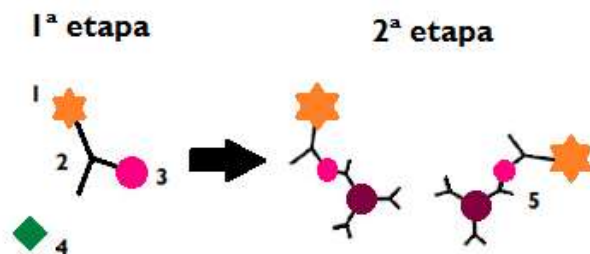


Figura 4. Imunoenasiao não competitivo. 1-EA; 2-Ac; 3- Ag da amostra; 4- Outros Ag; 5- Complexo PPM-Ac-Ag da amostra- Ac marcado com EA

Por último, o equipamento mede a emissão de luz em unidades relativas de luz (RLUs). Num imunoenasiao *sandwich*, a concentração do Ag específico do analito na amostra e a emissão de luz em RLUs têm uma relação direta; quanto maior a concentração de analito na amostra, maior a emissão de luz.

✓ Imunoensaio de quimioluminescência do tipo competitivo

O primeiro passo corresponde à adição do reagente, contendo Ag ou Ac marcado com EA, e PPM revestidas com Ac ou Ag, respetivamente.

Em imunoensaios cujo reagente contém Ag marcado com EA, este compete com o Ag da amostra (analito) pelos locais de ligação ao Ac ligado às PPM. Após exposição magnética e lavagem, permanecem na cuvete: PPM revestidas de Ac ligadas ao Ag da amostra; e PPM revestidas de Ac ligadas ao Ag marcado com EA (figura 5).

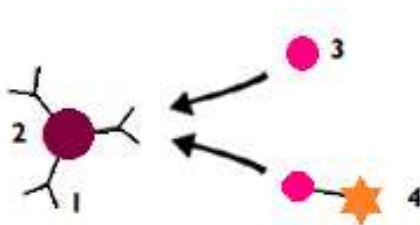


Figura 5. Imunoensaio competitivo, envolvendo Ag marcado com EA. 1- Ac; 2- PPM revestidas por Ac; 3- Ag da amostra; 4- Ag marcado com EA

Por outro lado se o imunoensaio envolver um reagente que contém Ac marcado com EA, o Ag que reveste as PPM compete com o antigénio da amostra por locais de ligação ao Ac marcado com EA. Devido à exposição magnética e lavagem, as cuvetes de reação contêm apenas as PPM revestidas de Ag ligadas ao Ac marcado com EA (figura 6).

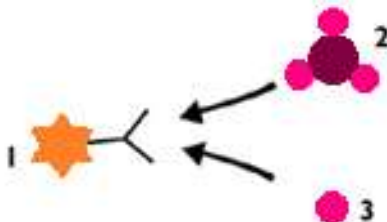


Figura 6. Imunoensaio competitivo, envolvendo Ac marcado com EA. 1-Ac marcado com EA; 2- PPM revestidas por Ag; 3- Ag da amostra

Finalmente, em ambas as reações de imunoensaio competitivo, o equipamento mede a emissão de luz em RLUs, onde a concentração de analito na amostra e a emissão de luz são inversamente proporcionais; quanto maior a emissão de luz, menor a concentração de analito na amostra analisada.

5.1.2. Architect i2000sr

O *Architect i2000sr* é um equipamento automatizado de imunoenaios. No laboratório do HAL, este analisador está configurado, maioritariamente, para a pesquisa de marcadores virais, através de imunoenensaio de quimioluminescência (tabela 13).

Tabela 13. Analitos analisados e tipo de imunoenensaio utilizado no *Architect i2000sr*

	Analito
Fertilidade	Beta-hCG ¹
Vírus da Imunodeficiência Humana	VIH ² I/2
Toxoplasmose	IgG ³ e IgM ⁴
Rubéola	IgG e IgM
Citomegalovírus	IgG e IgM
Hepatite A	Ac ⁵ VHA ⁶ - IgG Ac VHA-IgM
Hepatite C	Ac VHC ⁷
Hepatite B	Ag ⁸ HBs Ac HBs Ac HBc Ac HBc-IgM Ag HBe Ac HBe
Outros	Ferritina

1-Gonadotrofina Coriônica Humana; 2-Vírus da Imunodeficiência Humana; 3-Imunoglobulina G; 4-Imunoglobulina M; 5-Anticorpo; 6-Vírus da Hepatite A; 7-Vírus da Hepatite C; 8- Antígeno

Todos os testes realizados por imunoenaios de quimioluminescência do *Architect i2000sr* são imunoenaios não competitivos, do tipo *sandwich*, à exceção do imunoenensaio utilizado para determinação do Ac HBe cuja metodologia é baseada num imunoenensaio de quimioluminescência competitivo, metodologias explicadas anteriormente.

5.2. Endocrinologia

Uma hormona é uma substância bioquímica produzida no organismo, responsável pelo controlo e regulação de atividades específicas de células e órgãos; são produzidas num local no corpo e exercem a sua ação/ações em locais distantes, através do sistema endócrino.

A nível laboratorial, a avaliação do sistema endócrino é realizada pela determinação da concentração hormonal, fornecendo ao clínico dados essenciais para que o diagnóstico seja precoce e eficaz. Os distúrbios endócrinos por deficiência hormonal, assim que diagnosticados, são facilmente tratados através da administração e hormonas exógenas [36].

5.2.1. Tiróide

A tiróide é uma das maiores glândulas endócrinas, responsável pela síntese de duas hormonas de grande importância clínica: a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3). Estas hormonas são importantes na diferenciação celular, durante o desenvolvimento; na termorregulação; e na homeostase metabólica [36].

O eixo hipotálamo-hipófise-tiróide é um exemplo simples de um ciclo de *feedback* endócrino. O hipotálamo e a hipófise produzem as hormonas que regulam a atividade da tiróide, são elas a hormona libertadora de tirotropina (TRH) e a tireoestimulina (TSH). A TRH, sintetizada no hipotálamo, atua sobre a hipófise, induzindo a secreção de TSH; a TSH estimula diretamente a tiróide, levando à secreção das hormonas tiroideias (T3 e T4) para a corrente sanguínea. O aumento dos níveis de T3 e T4 em circulação provocam um efeito de *feedback* negativo; a secreção de TRH é suprimida e, conseqüentemente, a secreção das hormonas tiroideias diminui [37]. Alterações na síntese ou regulação destas hormonas traduzem-se em hipo- ou hipertiroidismos (tabela 15). No HAL, para a avaliação da tiróide, determinam-se os parâmetros (tabela 14): TSH; T3; T4; FT3; FT4; anticorpos anti-tiroglobulina (aTG) e anticorpos anti-peroxidase (aTPO).

Tabela 14. Valores de referência dos indicadores da função da tiróide

Analito	Intervalos de referência
TSH ¹	0,40 – 4,40 µUI/mL
T3 ² / T4 ³	0,60 - 1,81 ng/dL / 4,50 – 10,9 µg/dL
FT3 / FT4	2,00 - 4,20 pg/mL / 0,89 – 1,76 ng/dL
aTG ⁴ e aTPO ⁵	0 - 60 U/mL

1-Tireoestimulina; 2-Triiodotironina; 3-Tiroxina; 4-anticorpos anti-tiroglobulina; 5-anticorpos anti-peroxidase

TSH

As determinações séricas da TSH são utilizadas no diagnóstico de hiper- e hipotiroidismo, ajudando sobretudo na diferenciação entre hipotiroidismo primário e secundário.

O hipotiroidismo secundário é caracterizado por níveis baixos de T3 e T4, na sequência de níveis baixos de TSH. Se, por outro lado, o hipotiroidismo for acompanhado de valores elevados de TSH, o mais provável é se tratar de um hipotiroidismo primário. Uma síntese inadequada das hormonas da tiróide, provoca, através de um *feedback* negativo, uma constante estimulação da hipófise, provocando um aumento dos níveis séricos de TSH. Mais raramente, uma sobreprodução de TSH pode também estar relacionada com adenomas secretores dessa hormona. Naturalmente, esta produção exacerbada de TSH reflete-se num hipertiroidismo e numa hiperplasia da tiróide [36].

T3 e T4 / FT3 e FT4

As hormonas da tiróide constituem os principais produtos de secreção desta glândula: 10% de T3 e 90% de T4. A T3 e a T4 derivam das tiroglobulinas iodadas sintetizadas no interior das células foliculares da tiróide. A biossíntese de T3 e T4 envolve as seguintes etapas:

- Captação de iões de iodo pelas células foliculares da tiróide;
- Incorporação do iodo às moléculas de tirosina das tiroglobulinas;
- Combinação de duas moléculas de di-iodotirosina das tiroglobulinas para dar origem à T4; e combinação de uma molécula de mono-iodotirosina com uma molécula de di-iodotirosina para formar T3 [38].

A T4 é segregada pela tiróide cerca de vinte vezes mais em relação à T3. Ambas circulam na corrente sanguínea ligadas a proteínas plasmáticas, incluindo a globulina transportadora de tiroxina, a pré-albumina e a albumina. Aproximadamente 99,98% de T4 e 99,7% de T3 encontram-se ligadas a proteínas transportadoras; apenas uma fração muito pequena de cada uma dessas hormonas se encontra livre e biologicamente ativa (FT3 e FT4). Uma vez que a maior percentagem das hormonas da tiróide se encontram então ligadas a proteínas, as alterações nos níveis séricos de T3 e T4 totais podem não estar diretamente relacionadas com doenças da tiróide. Assim, as determinações das formas livres, FT3 e FT4, são hoje em dia mais utilizadas [36].

aTG e aTPO

A pesquisa de aTG e aTPO no soro é o método mais utilizado no diagnóstico de doenças auto-imunes da tiróide. Os anticorpos anti-TPO são os que apresentam uma relação mais estreita com as disfunções auto-imunes da tiróide. A sua presença é sugestiva de inflamação linfocítica e lesão da glândula. A tiroidite auto-imune crónica e a doença de Graves são as doenças auto-imunes da tiróide mais comuns (tabela 15) [36].

A tiroidite autoimune crónica é a tiroidite mais frequente, sendo a causa mais comum de hiperplasia da tiróide (bócio) e hipotiroidismo, em regiões onde o aporte de iodo na dieta é considerado suficiente. É frequentemente designada de tiroidite de *Hashimoto*, sendo que esta designação implica a presença de bócio. Atualmente no laboratório clínico, os anticorpos aTPO e aTG são os marcadores com maior relevância para definir esta patologia. Os primeiros apresentam-se positivos em 90% dos casos de tiroidite auto-imune, e os segundos em 20 a 50%. Nesta patologia, os valores séricos de TSH podem encontrar-se dentro dos valores de referência ou aumentados e muito raramente se encontram diminuídos. A doença de Graves é uma doença auto-imune, caracterizada por hipertiroidismo e bócio, causados pela estimulação da tiróide por anticorpos dos receptores da TSH [39].

Tabela 15. Doenças da tiróide

Hipotiroidismo primário	Hipotiroidismo secundário	Hipertiroidismo
<ul style="list-style-type: none">• Tiroidite de <i>Hashimoto</i>• Tireoidectomia• Hipotiroidismo congénito (Tiróide ausente ou ectópica)• Deficiência de iodo	<ul style="list-style-type: none">• Hipopituitarismo (Tumores, cirúrgias hipofisárias)• Deficiência na atividade de TSH¹	<ul style="list-style-type: none">• Doença de Graves• Tumores secretores de TSH

1- Tireoestimulina

5.2.2. Reprodução e Fertilidade

O estudo das hormonas da reprodução engloba o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. Os níveis séricos das seguintes hormonas são essenciais para uma função reprodutiva adequada: a Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH); a Hormona Luteinizante (LH); a hormona Folículo-estimulante (FSH); as hormonas sexuais esteróides (estradiol, progesterona, testosterona); a Prolactina e a Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (β -hCG). O hipotálamo sintetiza GnRH, que atua na hipófise, estimulando a secreção de FSH e LH. Por sua vez, FSH e LH circulam na corrente sanguínea até as gónadas, onde induzem a síntese das hormonas esteróides [40, 41]. Na tabela 16 são referidos os parâmetros determinados no laboratório do HAL, assim como os respetivos valores de referência.

Tabela 16. Valores de referência das hormonas da reprodução e fertilidade	
Analito	Valores de referência
FSH ¹	Mulher: 2,5-10,2 UI/L (fase folicular); 3,4-33,4 UI/L (meio do ciclo); 1,5-9,1 UI/L (fase luteínica); < 0,3 UI/L (gravidez); 23,0-116,3 UI/L (pós-menopausa)
LH ²	Mulher: 1,9-12,5 UI/L (fase folicular); 8,7-76,3 UI/L (meio do ciclo); 0,5-16,9 UI/L (fase luteínica); <0,1-1,5 UI/L (gravidez); 15,9-54,0 UI/L (pós-menopausa);
Estradiol	Mulher: 19,5-144,2 pg/mL (fase folicular); 63,9-356,7 pg/mL (meio do ciclo); 55,8-214,2 pg/mL (fase luteínica); 0-32,2 pg/mL (pós-menopausa); Homem: 0-39,8 pg/mL
Progesterona	Mulher adulta: < 1,40 ng/mL (fase folicular); 3,34-25,56 ng/mL (fase luteínica); < 0,73 (pós-menopausa); ng/mL
Testosterona	Mulher: 14-76 ng/dL Homem: 241- 827 ng/dL
Prolactina	2,8-29,2 ng/mL (não grávida); 9,7-208,5 ng/mL (grávida) 1,8-20,3 ng/mL (pós-menopausa)
β -hCG ³	< 5 mIU/mL (não grávida); 3-60000 mIU/mL (grávida, dependendo das semanas de gravidez)

1-Hormona Folículo-estimulante; 2-Hormona Luteinizante; 3-Gonadotrofina Coriónica Humana

FSH e LH

No homem, a LH atua sobre as células de *Leydig* dos testículos, provocando a síntese de testosterona; enquanto a FSH atua sobre as células de *Sertoli* dos tubos seminíferos, apoiando a espermatogénese. Relativamente à mulher, a FSH e a LH estimulam os ovários para produção de progesterona e estrogénios, importantes na regulação do ciclo menstrual; a FSH estimula o desenvolvimento dos folículos, e a LH induz a ovulação e a transformação do folículo em corpo lúteo [41].

O aumento ou a diminuição dos níveis séricos das hormonas FSH e LH relacionam-se com hipogonadismo:

- ✓ No hipogonadismo hipogonadotrófico ocorre uma secreção inadequada de FSH e LH, que se reflete na diminuição da síntese de hormonas sexuais. Dentro dos vários fatores que podem desencadear este processo, destacam-se: desnutrição; anorexia; exercício físico intenso, tumores da hipófise [40, 42].
- ✓ O hipogonadismo hipergonadotrófico é caracterizado por uma disfunção das gónadas. Nestes casos, há diminuição da síntese das hormonas sexuais, que, por *feedback* negativo, provoca um aumento das concentrações séricas de FSH e LH. Este processo ocorre natural e inevitavelmente com o envelhecimento, denominando-se menopausa nas mulheres e andropausa nos homens [40, 42].

Estradiol

O estradiol é o estrogénio predominante na mulher em idade fértil e é responsável pelo desenvolvimento e manutenção dos órgãos sexuais femininos e características sexuais secundárias. Além disso, desempenha um importante papel na homeostase do cálcio e diminui a reabsorção óssea. Em condições normais, a maioria dos estrogénios são segregados pelo ovário, e, durante a gravidez, pela placenta. Os níveis baixos de estradiol encontram-se associados a descalcificações ósseas; aumento de fraturas; e osteoporose pós-menopausa. No homem, o excesso de estrogénios causa aumento do tecido glandular mamário, condição conhecida por ginecomastia [42,43].

Progesterona

Tal como o estradiol, a progesterona é uma hormona sexual feminina envolvida na regulação do ciclo menstrual. É especialmente importante na preparação do útero para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. Geralmente é segregada pelo corpo lúteo, mas nas grávidas a placenta torna-se a principal fonte de progesterona.

Testosterona

A testosterona é o principal androgénio segregado pelas células de *Leydig* dos testículos, e sua produção aumenta durante a puberdade. Os andrógenos provocam a masculinização do trato genital e o desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias masculinas. A estimulação das células de *Leydig* induz a produção da testosterona e a espermatogénese. O uso excessivo de testosterona exógena, tal como acontece em alguns atletas, reduz a concentração de testosterona intratesticular, levando à diminuição da espermatogénese [40, 42].

As mulheres, apesar de em concentrações muito inferiores comparativamente aos homens, também produzem testosterona, a nível do ovário. No entanto, em determinadas condições, como a síndrome do ovário policístico, a síntese de testosterona pode aumentar, conduzindo a hirsutismo e virilização da mulher [42].

Prolactina

A prolactina é uma das várias hormonas que são produzidas pela hipófise, cuja principal função envolve a estimulação das glândulas mamárias para o período da amamentação. A dopamina exerce uma ação inibitória sobre a secreção de prolactina; deste modo, qualquer composto que afete a atividade dopaminérgica (como alguns antidepressivos e antipsicóticos), irá também provocar alterações na secreção desta hormona.

Por outro lado, a secreção de dopamina também é regulada pela ação indutora da TRH e estrogénios, por exemplo. Dentro das possíveis causas de hiperprolactinémia, destacam-se: lactação (hiperprolactinémia fisiológica na gravidez); tumores que comprimem a haste hipofisária (interrupção do fluxo de dopamina); medicamentos antagonistas dos recetores de dopamina; prolactinomas (produção de prolactina); hipotireoidismo primário (aumento da TRH) [38].

Na avaliação de hiperprolactinémias é essencial a determinação da TSH e da FT4, uma vez que ajuda a descartar ou não a hipótese de hipotiroidismo primário como uma causa de valores elevados de prolactina. Se, por outro lado, houver suspeita de um tumor da hipófise, a quantificação de FSH e LH constituem outra forma de avaliar a função hipofisária [38].

β -hCG

A β -hCG é uma glicoproteína composta por subunidades α e subunidades β , ligadas covalentemente, que podem degradar-se em múltiplos fragmentos. Assim, no soro, pode haver hCG intacta, fragmentos de hCG e a subunidade β -hCG livre, sendo esta última a subunidade pesquisada na maioria dos ensaios para detetar a presença de hCG.

A hCG é uma hormona sintetizada pelo tecido trofoblástico da placenta, durante a gravidez, embora possa também ser segregada em tumores trofoblásticos, coriocarcinomas e tumores das células germinativas do ovário e testículos; posto isto, em determinadas situações, a β -hCG é quantificada como um marcador tumoral[44].

5.2.3. Outras Hormonas

Cortisol

O cortisol é uma hormona glucocorticóide produzida pelo córtex suprarenal, em resposta à hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona segregada pela hipófise. O cortisol é uma hormona hiperglicemiante, produzida em resposta ao stress e a hipoglicémia. A determinação sérica do cortisol é utilizada essencialmente para o esclarecimento de patologias do córtex suprarenal [45].

Concentrações elevadas de cortisol são características da síndrome de *Cushing*. Esta patologia pode ser dependente da ACTH, onde o aumento do cortisol é provocado por um aumento da secreção de ACTH (adenomas na hipófise, ou secreção ectópica de ACTH); ou independente da ACTH, geralmente provocadas por hiperplasias ou tumores do córtex adrenal, e nestes casos o aumento do cortisol não é acompanhado por aumento da ACTH. A doença de *Cushing* é um termo utilizado exclusivamente quando a síndrome de *Cushing* é causada por um adenoma da hipófise. Em contrapartida, diminuição dos níveis séricos de cortisol associados a aumento de ACTH verificam-se em insuficiências primárias do córtex adrenal, a doença de *Addison* [45].

No laboratório do HAL, a concentração do cortisol é determinada no soro e na urina das 24 horas. Os seus valores de referência são: entre 4,30 e 22,40 µg/dL no soro e entre 28,5 e 213,7 µg/24h na urina das 24 horas.

PTH

A PTH é sintetizada e segregada pelas paratiróides, glândulas localizadas bilateralmente à tiróide. É sintetizada a partir do precursor pré-pró-PTH, isto é, PTH intacta (iPTH) que, intracelularmente, é degradada em fragmentos inativos. A iPTH é a sua forma biologicamente ativa e a que é determinada laboratorialmente [46].

A PTH atua no tecido ósseo, estimulando a reabsorção do osso e a libertação de cálcio para a corrente sanguínea; e atua a nível renal, estimulando a reabsorção renal de cálcio e a ativação da vitamina D. Estas ações são responsáveis por regular a concentração de cálcio na corrente sanguínea; a concentração de cálcio livre em circulação é o principal regulador da síntese e secreção da PTH.

A quantificação de PTH sérica é útil no diagnóstico diferencial de hipocalcémia e hipercalcémia, e na avaliação funcional das paratiróides em patologias como a insuficiência renal e patologias ósseas. O hiperparatiroidismo primário provoca a secreção excessiva de PTH e, geralmente, está associado a adenomas [46].

5.3. Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias bioquímicas produzidas por células tumorais ou em resposta a tumores. Estes marcadores podem ser produtos endógenos que são produzidos a uma maior velocidade em células tumorais; ou o produto da expressão génica de substâncias, que em células normais permanece em repouso, como as substâncias produzidas, em situações normais, pelo tecido embrionário. A pesquisa contínua e adequada de marcadores tumorais no soro e outros fluidos corporais, durante o processo neoplásico, é de utilidade clínica no tratamento e acompanhamento de pacientes oncológicos [47, 48].

Nem todos os marcadores tumorais são específicos para um tipo de tumor; alguns deles são encontrados em vários tipos de tumor, e por vezes, até em patologias não neoplásicas. Por conseguinte, estes marcadores não são utilizados para diagnóstico, mas sim para monitorizar a evolução tumoral em pacientes oncológicos, após o início do tratamento. Nessas situações, as

concentrações sanguíneas dos marcadores tumorais, geralmente, refletem a atividade e o volume do tumor [47, 48].

No laboratório do HAL são quantificados os seguintes marcadores tumorais: Alfa-fetoproteína (AFP), Antígeno Carcinoembrionário (CEA), *Cancer Antigens* (CA) 125, CA 15.3, CA 19-9 e Antígeno Específico da Próstata (PSA) (tabela 17).

Tabela 17. Valores de referência dos marcadores tumorais

Analito	Associação tumoral	Intervalos de referência
AFP ¹	Carcinoma hepatocelular primário	0,0 – 8,1 ng/mL
CEA ²	(Inespecífico)	< 5 ng/mL (não fumadores); > 10 ng/mL (fumadores)
CA ³ 125	Cancro do ovário	0,00 – 30,2 U/mL
CA 15.3	Carcinoma da mama	0,00 – 32,4 U/mL
CA 19-9	(Inespecífico)	0,00 – 37,00 U/mL
PSA ⁴ total e PSA livre	Cancro da próstata	0,00 – 4,0 ng/mL

1- Alfa-fetoproteína; 2-Antígeno Carcinoembrionário; 3-Cancer Antigens; 4-Antígeno específico da Próstata

AFP

A AFP é uma glicoproteína/antígeno oncofetal e é uma das principais globulinas do soro fetal. É produzida durante a vida intra-uterina do feto e em situações neoplásicas. O gene da AFP é totalmente reprimido após a maturação do feto, levando ao desaparecimento desta proteína após o nascimento [49].

A determinação sérica de AFP auxilia no diagnóstico, prognóstico e monitorização de carcinoma hepatocelular primário, e tumor testicular das células germinativas seminomatoso e não seminomatoso. Aproximadamente 60 – 90% dos pacientes com carcinoma hepatocelular primário apresentam concentrações de AFP bastante elevadas [47, 49].

CEA

O CEA, é uma glicoproteína oncofetal expressa, normalmente, em células da mucosa do trato gastrointestinal e sobre-expressa em adenocarcinoma, principalmente em tumores colorretais. Além disso, podem ocorrer aumentos séricos de CEA noutras circunstâncias, não associados a neoplasias, como o tabagismo, úlceras pépticas, doença intestinal inflamatória, pancreatite, obstrução biliar e cirrose [49].

Geralmente, os valores mais elevados de CEA encontram-se associados à metastização de tumores. Este marcador deve ser analisado somente após confirmação de doença neoplásica e não como um marcador de diagnóstico [49].

CA 125

O CA 125 faz parte de um grupo de marcadores tumorais, os antígenos associados a tumores (*Cancer Antigens*). Além do CA 125, encontram-se também neste grupo: o CA 15.3 e o CA 19.9 [47].

O marcador tumoral CA 125 é uma glicoproteína normalmente expressa durante o desenvolvimento fetal. O aumento sérico deste marcador está frequentemente associado ao cancro do ovário, sendo encontrado em cerca de 85% das mulheres com este tipo de tumor. O CA 125 tem sido utilizado como adjuvante no diagnóstico de massas pélvicas palpáveis, mais frequentemente detetadas em mulheres pós-menopausa.

CA 15.3

É uma glicoproteína produzida como resposta ao carcinoma da mama. No entanto, é um marcador de baixa sensibilidade; além do cancro da mama, o CA 15.3 encontra-se aumentado no soro também em doenças benignas da mama e cirrose hepática aguda e crónica.

Atualmente, o CA 15.3 é o marcador tumoral mais utilizado na monitorização da terapêutica e progressão da doença em pacientes diagnosticados com cancro de mama [47, 48].

CA 19.9

O CA 19.9 é um marcador tumoral utilizado essencialmente na monitorização de pacientes com cancro colo-retal e carcinoma pancreático. Em situações normais, é sintetizado pelo pâncreas e pelas células do ducto biliar, estômago e cólon. Além das neoplasias referidas anteriormente, o CA 19.9 encontra-se elevado na corrente sanguínea em pacientes com neoplasias biliares, cirrose, colestase e pancreatite [49].

PSA

O PSA é uma glicoproteína produzida no epitélio prostático; a sua concentração sérica pode aumentar no cancro da próstata, prostatite, hipertrofia prostática benigna e traumas da próstata.

É um marcador específico do tecido prostático, mas não do cancro da próstata. Por si só, a determinação do PSA não é suficiente na deteção precoce de tumores, sendo essencial a palpação prostática por parte do clínico.

Na corrente sanguínea, o PSA existe tanto na forma livre, como sob a forma de complexos. A maioria de PSA total encontra-se complexado a diferentes proteínas, enquanto o PSA livre constitui a forma minoritária do PSA plasmático [48, 49].

Em circunstâncias onde realmente se verifica um aumento dos níveis de PSA total, a melhor forma de avaliar esses resultados é através da razão entre o PSA total e o PSA livre. Quanto menor essa razão, ou seja, quanto menor a percentagem de PSA livre em relação ao PSA total, maior o risco de se tratar de uma neoplasia. O laboratório deve determinar da relação PSA livre/total sempre que o resultado do PSA total se encontrar entre 4 e 10 ng/mL.

Segundo a DGS, a monitorização de pacientes com carcinoma da próstata após tratamento é a principal indicação para a determinação sérica do PSA. De um modo geral, sempre que o paciente apresenta um valor de PSA > 10 ng/mL; ou um valor de PSA entre 4-10 ng/mL com percentagem de PSA livre < 25%, o clínico prossegue para outras técnicas de diagnóstico mais invasivas, como a biópsia prostática [50].

5.4. Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos, obtidos a partir da dieta e são cruciais ao normal funcionamento do organismo. Os níveis de vitaminas encontram-se diminuídos, quer por défice de ingestão de vitaminas, quer por uma inadequada absorção intestinal. As manifestações clínicas das hipovitaminoses são muito variáveis; essa variabilidade resulta do grau e da duração da deficiência vitamínica [51].

De acordo com a sua estrutura química, as vitaminas são classificadas em dois grandes grupos:

- Hidrossolúveis, onde se incluem, por exemplo: Vitaminas B1, B2, B6, B12, C e Folato.
As vitaminas solúveis em água são facilmente excretadas por via urinária, sendo por isso menos provável a sua retenção no organismo
- Lipossolúveis, onde se incluem: Vitaminas, E, D e K.

Vitamina B 12 e Ácido fólico

A vitamina B12, também conhecida como cobalamina, desempenha um papel importante na síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN); na maturação dos eritrócitos; e na função neurológica. A vitamina B12 é sintetizada exclusivamente por bactérias. As principais fontes dietéticas de vitamina B12 são produtos de origem animal: carne e produtos derivados; produtos lácteos; e ovos. As deficiências de vitamina B12 na dieta são mais frequentes em indivíduos com idades avançadas; vegetarianos estritos, devido à alimentação pouco variada; e também em pacientes com doenças de malabsorção intestinal [51].

A cobalamina constitui um cofator importante em muitas reações bioquímicas, como a síntese de ácidos nucleicos, síntese de metionina a partir da homocisteína e conversão metil-malonil-CoA em succinil-CoA [52]. A vitamina B12 é gradualmente destruída pela exposição à luz; por esta razão, a determinação deste parâmetro requer que o tubo de recolha esteja protegido da luz.

O ácido fólico é sintetizado por microrganismos e plantas. Assim, os vegetais, frutas e produtos lácteos são as suas principais fontes na dieta. Como coenzima, o folato está envolvido na transferência de carbono no metabolismo de ácidos nucleicos e aminoácidos.

A deficiência de vitamina B12 e ácido fólico em humanos está associada a anemias megaloblásticas, que podem muitas vezes ser revertidas se diagnosticadas e tratadas precocemente, e a neuropatias. Estas neuropatias podem provocar condições tais como: perda de sensibilidade nas extremidades, fraqueza, paralisia, confusão, desorientação, e demência [51,52].

Os valores de referência para a vitamina B12 e o ácido fólico são, respetivamente, 211 – 911 pg/mL e > 5,38 ng/mL.

5.5. Serologia Infeciosa

O sistema imunitário é um sistema que evoluiu de forma a proteger o organismo de doenças infecciosas. Desde vírus a parasitas, o sistema imunitário é altamente adaptável, tendo a capacidade de reconhecer e destruir uma grande diversidade de potenciais agentes patogênicos. No setor de imunologia, a pesquisa de agentes patogênicos realiza-se através da determinação sérica de Ag específicos do microrganismo ou Ac produzidos especificamente em resposta a essa infecção. Os anticorpos são moléculas produzidas por linfócitos B durante uma resposta imunológica humoral, protegendo o hospedeiro contra um microrganismo específico [53].

Os Ac são divididos em quatro classes principais: IgM, IgG, IgA e IgE. Os Ac do tipo IgM são a primeira classe de anticorpos a ser produzida durante uma resposta imunitária. É uma molécula de elevado peso molecular, que não atravessa a barreira placentária, portanto a sua presença em fetos e em recém-nascidos indica a presença de uma infecção primária. A síntese de IgM é um processo que dura algumas semanas ou meses, sendo por isso utilizado como um indicador de infecção recente ou decorrente. Eventualmente, a síntese de IgM diminui, sendo substituída pela produção de Ac do tipo IgG [53, 54].

Em contraste, os Ac IgG são produzidos continuamente por longos períodos de tempo, muitas vezes durante a vida inteira, conferindo imunidade contra reinfecções pelo mesmo agente patogênico. Os Ac IgG têm a capacidade de atravessar a placenta, fornecendo proteção durante os primeiros meses de vida do recém-nascido. Deste modo, a pesquisa de Ac IgG evidencia uma infecção passada, a seroconversão. Além disso, o mesmo perfil de produção de Ac IgG é observado durante a imunização conferida por vacinação [53, 54].

A pesquisa de Ag e Ac específicos de microrganismos, além de ser essencial no diagnóstico de infecções virais, parasitárias e bacterianas, é hoje em dia um recurso indispensável na vigilância pré-natal. As infecções na gravidez aumentam o risco de malformações fetais e de mortalidade neonatal, caso não sejam diagnosticadas e tratadas atempadamente. Na vigilância pré-natal realiza-se o rastreio das principais infecções na gravidez: Toxoplasmose, Rubéola, infecção por Citomegalovírus (CMV) e infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (tabela 18), por exemplo.

Particularmente na serologia infecciosa, todos os resultados positivos são confirmados por duplo ensaio na mesma amostra, e caso se mantenha o resultado, as amostras são enviadas para laboratórios exteriores, onde são analisadas por uma técnica diferente.

Tabela 18. Títulos serológicos de na pesquisa de VIH, Toxoplasmose, Rubéola e CMV

Analito		Intervalos de referência
VIH ¹	Anti-VIH 1,2	Negativo <1,00 S/CO; Reativo >>1,00 S/CO
Toxoplasmose	IgG ²	Negativo <1,6 UI/mL; Equívoco 1,6 – 2,9 UI/mL; Positivo >3,00 UI/mL
	IgM ³	Negativo <0,499 UI/mL; Equívoco 0,500 – 0,599 UI/mL; Positivo >0,600 UI/mL
Rubéola	IgG	Negativo <5 UI/mL; Equívoco 5 – 10 UI/mL; Positivo >10 UI/mL
	IgM	Negativo <1,20 UI/mL; Equívoco 1,20 – 1,60 UI/mL; Positivo >1,60 UI/mL
Citomegalovírus	IgG	Não reativo <6,0 UA/mL; Reativo ≥6,0 UA/mL
	IgM	Não reativo <0,85 Index; Zona cinzenta 0,85 – 0,99 Index; Reativo ≥1,0 index

1-Vírus da Imunodeficiência Humana; 2-Imunoglobulina G; 3- Imunoglobulina M

Vírus da Imunodeficiência Humana

O VIH é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). São conhecidos dois tipos de VIH: VIH-1 e VIH-2. Quando presente, o VIH encontra-se nos fluidos biológicos e é transmitido essencialmente durante relações sexuais não protegidas, transfusões sanguíneas, picadas e cortes por materiais contaminados ou por transmissão vertical [55].

O VIH apresenta tropismo para linfócitos T CD4⁺, ligando-se especificamente aos recetores CD4 expressos à superfície de linfócitos T. No início da infeção, há elevadas taxas de replicação viral, provocando uma diminuição na contagem absoluta de linfócitos T CD4⁺. Após a resolução da infeção primária, a contagem de linfócitos volta a aumentar. Segue-se a fase de latência clínica, onde o paciente não apresenta sintomatologia. Esta fase é caracterizada por uma perda gradual de células T e a sua duração varia de indivíduo para indivíduo. Após uma diminuição significativa da contagem de linfócitos T, o paciente entra na fase de SIDA, tornando-se suscetível a infeções oportunistas por microrganismos como *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, citomegalovírus, Vírus do herpes simplex e *Toxoplasma gondii* [55].

O ARCHITECT VIH Ag/Ac é um imunoenensaio que deteta qualitativamente e em simultâneo o Ag p24 (proteína estrutural da cápside) do VIH e os Ac anti-VIH-1 e VIH-2, no soro. O resultado obtido não faz a distinção entre o Ag p24 do VIH, Ac anti-VIH-1 ou Ac anti-VIH-2. O equipamento calcula um resultado baseado no quociente entre as RLUs da amostra e as RLUs do *cutoff* para cada amostra e controlo ($S/CO = \text{RLUs da amostra} / \text{RLUs do cutoff}$).

Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose; um parasita intracelular obrigatório que pode ser encontrado numa grande variedade de reservatórios naturais, incluindo aves e mamíferos, sendo o gato o seu reservatório definitivo. Os humanos são infetados a partir de duas fontes: ingestão de carne infetada mal cozinhada; e ingestão de ooquistos libertados nas fezes de gatos infetados, que após 2 a 5 dias no meio ambiente se tornam infecciosos [56].

A maioria das infeções por *Toxoplasma gondii* são benignas e assintomáticas. Contudo, primo-infeções contraídas pela mãe durante a gravidez causam efeitos devastadores no feto. Devido às graves repercussões associadas à toxoplasmose congénita, é essencial a vigilância da grávida e determinar a sua imunidade. Em pacientes imunodeprimidos, o maior problema é a reativação de uma toxoplasmose latente, que geralmente apresenta sintomas neurológicos [56].

Os Ac IgM são detetados em indivíduos que contraíram recentemente a infeção, mas esses anticorpos podem persistir até 12 meses após a infeção aguda. A presença de Ac IgG indica que o paciente já sofreu infeção, mas não distingue se essa infeção é recente ou passada. Para distinguir entre infeção recente e infeção passada, as amostras positivas para anticorpos IgM e IgG devem ser analisadas com testes de avidéz da IgG. Um elevado índice de avidéz de Ac IgG é um forte indício de que a infeção ocorreu há mais de 3 meses (tabela 19) [56, 57].

Tabela 19. Interpretação dos resultados serológicos na Toxoplasmose			
Ac IgG	Ac IgM	Avidéz IgG	Significado possível
-	-	————	Ausência de infeção (vigilância ao longo da gravidez)
-	+	————	Início de infeção ou IgM inespecífica
+	-/+	Elevada	Infeção passada há mais de 3 meses

Rubéola

O Homem é o único reservatório do vírus da rubéola. A transmissão ocorre por contacto direto com as secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas. O período de incubação é, normalmente, de 14 a 16 dias, podendo variar entre 10 e 21.

A rubéola pós-natal não é uma doença fatal; o mesmo não se pode afirmar em relação à rubéola congénita. A rubéola congénita é o resultado de uma infeção primária na mãe, durante as primeiras 16 semanas de gravidez. Na ausência de Ac maternos, o vírus atravessa a placenta e pode provocar aborto espontâneo, nato-morto ou malformações congénitas [56, 57].

A vacina contra o vírus da rubéola faz parte do plano nacional de vacinação. Uma mulher não imunizada que pense em engravidar deve ser vacinada antes da conceção. Numa mulher grávida, o teste deve ser feito o mais precocemente possível e com o doseamento simultâneo de IgG e IgM específicos do vírus da rubéola.

Citomegalovírus

O CMV é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*. A prevalência da infeção por CMV depende das condições de higiene e socio-económicas, sendo maior nos países sub-desenvolvidos. O nome “Citomegalovírus” deriva do facto de as células infetadas se tornarem gigantes e com inclusões intranucleares e citoplasmáticas [57, 58].

O CMV pode estar presente no leite materno, saliva, fezes e urina; tem sido frequentemente identificado em crianças nas creches. Nos adultos, o vírus pode ser transmitido por via sexual, através do sémen ou secreções cervicais. O CMV é uma das causas virais mais comuns de malformações congénitas. Embora a infeção por CMV seja, geralmente, assintomática, este vírus é um agente patogénico oportunista particularmente importante em pacientes imunocomprometidos [57, 59].

Uma infeção congénita por CMV pode causar Doença da Inclusões Citomegálicas, uma doença caracterizada por erupções cutâneas; trombocitopenia; microcefalia; hepato-esplenomegália; icterícia; e atraso no crescimento. As infeções perinatais podem ser contraídas durante o parto ou através do aleitamento [59]. A suspeita clínica de infeção materna por CMV geralmente é confirmada pelo diagnóstico laboratorial, através da verificação do título de anticorpos IgG e IgM, sendo a presença de IgM específica característica de doença aguda.

5.6. Hepatites Virais

A hepatite é uma inflamação do fígado, caracterizada por icterícia, hepatomegália, dor abdominal e alterações nos valores dos marcadores da função hepática. Em muitos pacientes, o fígado consegue regenerar e manter a sua capacidade funcional, contudo em hepatites mais graves, o processo de cicatrização do tecido hepático origina cirrose, que pode evoluir para Carcinoma Hepatocelular (CHC). O CHC é o tumor maligno primário mais comum do fígado e representa a terceira causa de morte por cancro, em todo o mundo [60].

A hepatite pode ter várias causas, como o consumo excessivo de álcool e infeções virais. Uma hepatite viral é a inflamação aguda ou crónica do tecido hepático, causada pela infeção ou co-infeção pelos vírus da hepatite: Vírus da Hepatite A (VHA); Vírus da Hepatite B (VHB); Vírus da Hepatite C (VHC); Vírus da Hepatite D (VHD); e Vírus da Hepatite E (VHE). Embora o órgão alvo de cada um deles seja o fígado e os sintomas sejam semelhantes, os vírus da hepatite diferem na sua estrutura, modo de replicação e modo de transmissão. Neste capítulo irão ser discutidos os VHA, VHC e VHB, uma vez que são os que apresentam maior significado clínico e os que são determinados laboratorialmente no HAL.

5.6.1. Vírus da Hepatite A

O principal modo de transmissão do VHA é por via fecal-oral. As infeções pelo VHA são mais comuns em países cujo saneamento básico é deficiente, onde a higiene e o tratamento de esgotos não são os mais adequados. O VHA apresenta um período médio de incubação de 2 – 6 semanas, replica-se nos hepatócitos e é eliminado em grandes quantidades nas fezes. Durante a replicação viral, ocorrem lesões hepáticas, que podem ser evidenciadas pela avaliação da função hepática, nomeadamente pela determinação sérica das transaminases e das bilirrubinas [61].

Comparativamente aos adultos, hepatite por VHA em crianças é menos grave, sendo geralmente assintomática. Em 99% dos casos, ocorre recuperação completa em 2 a 4 semanas após o início. Nunca evolui para cronicidade nem CHC, contudo podem surgir complicações como hepatites fulminantes associadas a elevadas taxas de mortalidade [68, 69].

Atualmente existem métodos profiláticos contra a infeção por VHA: vacinação em indivíduos com elevado risco de infeção; e imunização passiva, pela administração de imunoglobulina, conferindo proteção até 3 meses [61, 62].

O diagnóstico de infecção por VHA é feito através do seguimento dos sintomas clínicos e dos resultados laboratoriais. Mais especificamente, através da avaliação da função hepática e dos testes serológicos que detetam a presença de Ac anti-VHA do tipo IgG e IgM. A presença ou ausência de Ac anti-VHA IgG e IgM nas amostras de soro é analisada pelo equipamento, que compara o valor de quimioluminescência da reação com um valor *cutoff*. As amostras com valores superiores a 1,20 S/CO são consideradas reativas para Ac anti-VHA; e as amostras com valores inferiores a 0,80 S/CO são consideradas não reativas.

5.6.2. Vírus da Hepatite C

A infecção por VHC é uma das principais causas de doença hepática crônica. O VHC é transmitido por relações sexuais desprotegidas, transfusões sanguíneas e por picadas e/ou cortes com materiais contaminados. Apenas 10 a 20% dos indivíduos infetados apresentam sintomas clínicos; a alta incidência de infecções crônicas assintomáticas facilita a transmissão do vírus pela população [62].

A doença hepática crônica por VHC é uma das principais causas de internamento hospitalar e de morte entre indivíduos co-infetados com VHC e VIH. Uma infecção aguda por VHC apresenta três quadros possíveis de progressão da doença: resolução da infecção com recuperação; infecção não resolvida, havendo possível progressão para hepatite crônica; e rápida progressão para cirrose hepática (figura 7).

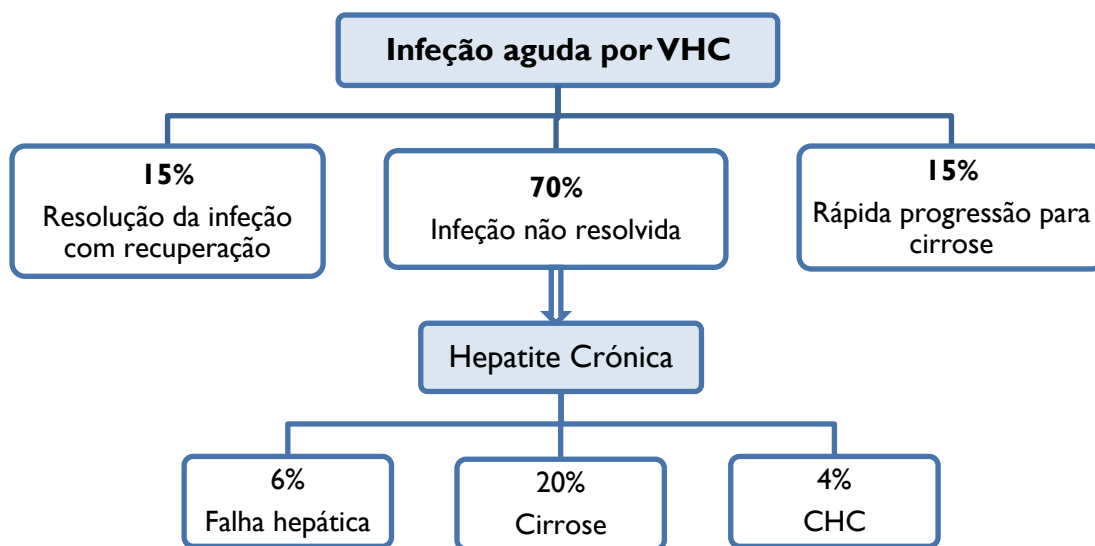


Figura 7. Esquema representativo da evolução de uma infecção aguda por VHC [62]

A progressão da hepatite C é acelerada por diversos fatores, como idade avançada, obesidade e consumo excessivo de álcool. Individualmente, a hepatite alcoólica e a hepatite C são causas frequentes de hepatite crónica, apresentando um quadro cirrótico bastante similar. A coexistência das duas situações num mesmo indivíduo, agrava substancialmente o prognóstico do paciente [60, 63].

No seguimento do diagnóstico da hepatite C, realiza-se, a nível laboratorial, a determinação qualitativa de Ac anti-VHC no soro. Amostras que apresentam valores S/CO < 1,00 são consideradas não reativas e as amostras com valores S/CO ≥ 1,00 são consideradas reativas. A presença de Ac anti-VHC indica que o indivíduo já teve contacto com o VHC, contudo não esclarece se a infeção é passada e resolvida ou uma infeção crónica pelo VHC.

5.6.3. Vírus da Hepatite B

A infeção pelo VHB representa um importante problema de saúde pública. Estima-se que, em todo o mundo, dois mil milhões de pessoas foram infetadas com o VHB e cerca de 350 milhões evoluíram para hepatite B crónica. 15 a 40% dos portadores crónicos do VHB desenvolvem quadros de cirrose, insuficiência hepática e CHC [64].

O vírus é transmitido através de sangue contaminado (transfusões, agulhas contaminadas) ou através de secreções genitais (relações sexuais, partos). Em todo o mundo, a transmissão vertical é o modo de transmissão mais predominante, contudo em áreas de baixa prevalência, como em Portugal, é mais frequente a transmissão por via intravenosa relacionada com o abuso de drogas e a transmissão por relações sexuais desprotegidas [62].

Hoje em dia, a prevenção da hepatite B passa, sobretudo, pela administração da vacina de VHB; pela triagem serológica de dadores de sangue; e pela sensibilização para a adoção de hábitos sexuais seguros. O rastreio da hepatite B é um dos exames laboratoriais que se deve realizar na vigilância de mulheres grávidas, devido ao elevado risco de cronicidade em infeções perinatais, por transmissão vertical (tabela 20) [62].

Tabela 20. Infeção por VHB: risco de cronicidade

	Recém-nascidos	Crianças	Adultos
Infeção crónica	90 %	30 %	1 %
Resolução da infeção	10 %	70 %	99 %

Na infecção por VHB, os danos hepáticos não são causados pelo vírus em si, mas por reações imunológicas mediadas por linfócitos T citotóxicos, que provocam a lise dos hepatócitos infetados. Devido à imaturidade do sistema imunitário, os recém-nascidos e as crianças jovens apresentam sintomas clínicos menos graves, mas a evolução para cronicidade acontece mais frequentemente. A maioria dos indivíduos resolve a infecção, permitindo a regeneração do parênquima hepático. A evolução da doença para cronicidade, hepatite fulminante e CHC, depende de fatores relacionados com o hospedeiro; co-infecção com outros vírus (VHC, VHD e VIH); e outras condições como abuso de álcool e obesidade [62].

Diagnóstico laboratorial de Hepatite B

A determinação sérica dos marcadores do VHB é essencial na triagem e no diagnóstico clínico da infecção por VHB. Os Ag do VHB são: Ag de superfície (AgHBs), o Ag da cápside (AgHBc) e o Ag “e” (AgHBe); estes induzem a produção dos Ac correspondentes e podem ser detetados no soro ao longo da infecção, à exceção de AgHBc que apenas é detetável no núcleo dos hepatócitos. A determinação e interpretação destes marcadores ajudam a interpretar o curso da doença e o estado de infecciosidade de um indivíduo (tabela 21) (figura 8) [62].

Tabela 21. Marcadores do VHB e seu significado	
Ag HBs	Ag de superfície do VHB; detetado no soro em níveis elevados durante a infecção aguda ou crónica por VHB. A presença de AgHBs indica replicação ativa e infecciosidade.
Ag HBe	É uma proteína solúvel do VHB; é o melhor marcador de replicação viral ativa e infecciosidade.
Ac Anti-HBs	A sua presença geralmente indica recuperação e imunidade contra a infecção por VHB; ou imunidade por vacinação.
Ac Anti-HBe	Indica infecciosidade baixa/nula. Útil na monitorização de pacientes submetidos a terapia antiviral e indica baixos níveis de VHB.
Ac Anti-HBc	Aparece no início dos sintomas da hepatite B aguda e persiste para a vida. Indica infecção passada ou em curso; Ac do tipo IgM é a melhor maneira para diagnosticar uma infecção aguda recente.

Relativamente aos valores de *cutoff*, do equipamento *Architect i2000sr*, para a determinação sérica dos marcadores do VHB:

- as amostras são consideradas reativas para a presença de AgHBs, Ac anti-HBc, Ac anti-HBc do tipo IgM e Ag HBe, sempre que cada uma das determinações apresentarem valores superiores 1,0 S/CO e não reativas quando os valores inferiores 1,0 S/CO;
- quanto à presença de Ac anti-HBs, as amostras são positivas sempre que os valores são superiores a 10mUI/mL e negativas para valores inferiores a 10 mUI/mL;
- relativamente ao Ac anti-HBe, pelo facto da sua determinação ser baseada num imunoensaio competitivo, existe uma relação inversa entre os valores determinados pelo equipamento e a quantidade de Ac anti-HBe presentes na amostra. Posto isto, as amostras são consideradas reativas para valores inferiores a 1,0 S/CO e não reativas para valores superiores a 1,0 S/CO.

Hepatite B aguda

A maioria das hepatites agudas apresentam sintomas pouco específicos e em 95% dos casos evoluem para resolução espontânea da infeção. Em geral, a mortalidade associada é muito baixa; contudo, pode ocorrer evolução para hepatite fulminante, muitas vezes associada à imunodeficiência [64].

O período de incubação do VHB varia geralmente entre 2 semanas e 4 meses, dependendo do modo de transmissão e do estado imunológico do hospedeiro. Após a exposição com VHB, o Ag HBs é o primeiro marcador a ser detetável no soro, mesmo antes do aparecimento de sintomatologia (figuras 8 e 9).

Inicialmente, os pacientes apresentam sintomatologia caracterizada por fadiga, mal-estar, anorexia, desconforto no quadrante superior direito, ou sintomas gripais. Geralmente, a icterícia torna-se aparente dentro de 10 dias, após o aparecimento dos sintomas clínicos [65].

Na fase aguda, os níveis séricos das enzimas hepáticas, especialmente da ALT, aumentam abruptamente para valores acima de 1000 U/L (figura 9). Os níveis de bilirrubina também aumentam, correspondendo à fase ictérica da hepatite B aguda. O Ac anti-HBc aparece no início dos sintomas de infeção aguda, persistindo durante a vida [65].

Nos casos em que a infeção é resolvida, AgHBs normalmente torna-se indetetável entre 4 a 6 meses (figuras 8 e 9) e os níveis séricos de ALT normalizam em 1 a 4 meses (figura 9). No decorrer da resolução da infeção, a presença de AgHBs e AgHBe é substituída, respetivamente, pelo aparecimento de Ac anti-HBs e Ac anti-HBe (seroconversão), e os Ac anti-HBc detetados são agora do tipo IgG, conferindo imunidade contra uma nova infeção por VHB (figuras 8 e 9).

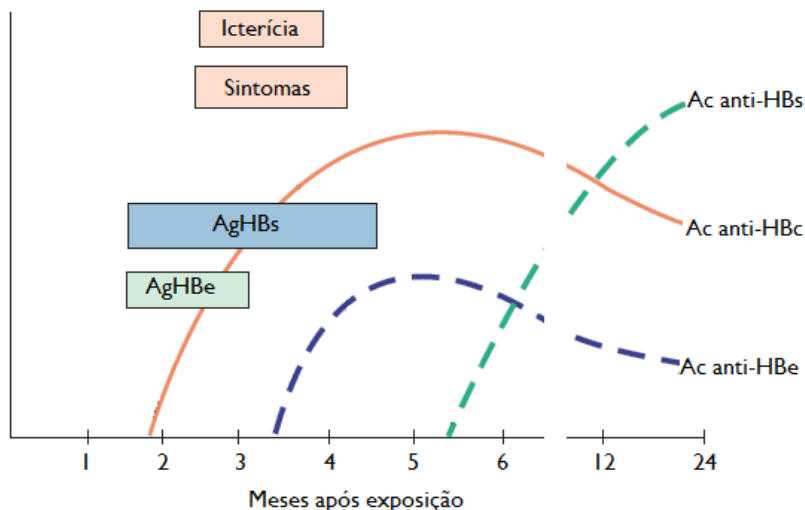


Figura 8. Curso serológico típico de uma infeção aguda resolvida, pelo VHB [62]

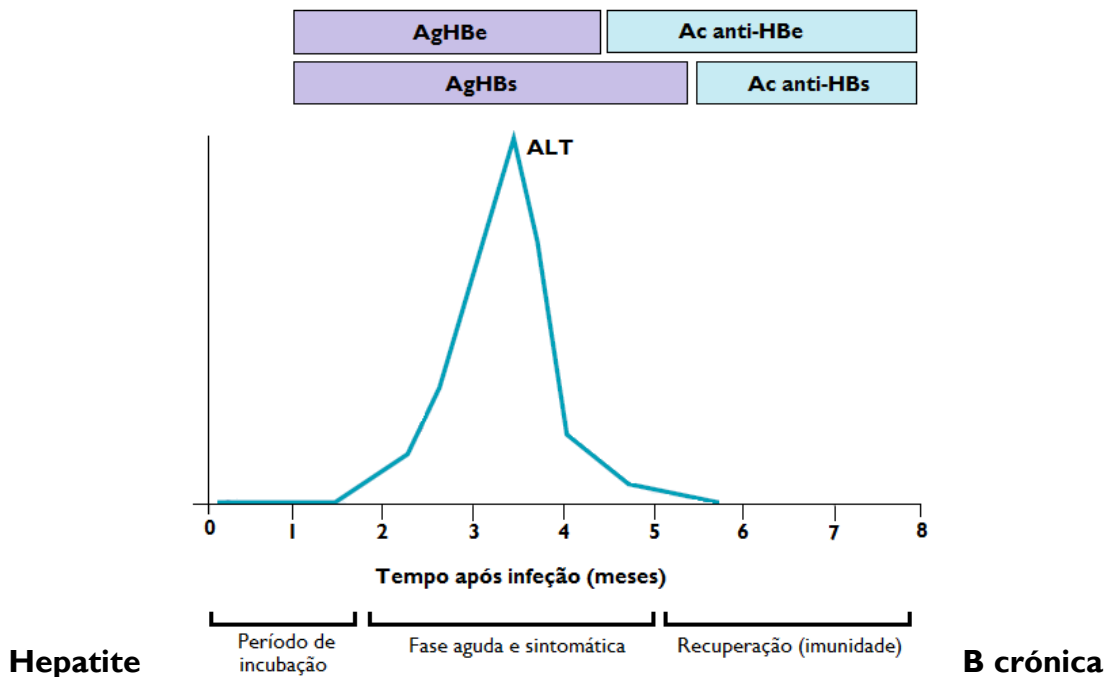


Figura 9. Curso químico e serológico de uma infeção aguda por VHB. Resposta a infeção pelo VHB, por transmissão horizontal, seguida de recuperação clínica. A fase aguda é caracterizada por valores elevados de ALT. Após resposta imunológica eficaz, ocorre seroconversão, conferindo imunidade para a vida [66]

O diagnóstico da hepatite B crônica (HBC) é definido pela persistência de AgHBs por mais de 6 meses. O processo evolutivo da HBC, num paciente, pode ser dividido em quatro fases, não obrigatoriamente sequenciais: Fase de tolerância imunológica; HBC AgHBe positivo; Portador inativo AgHBs; HBC AgHBe negativo (figura 10).

A fase de tolerância imunológica corresponde ao período da doença caracterizado por AgHBe positivos, concentrações séricas de ALT dentro dos valores normais [65, 66].

Na fase de HBC AgHBe positivo, também denominada por fase “clearance”, o sistema imunitário reconhece o VHB. Esta fase caracteriza-se pela presença de AgHBe e valores variáveis de ALT [64, 65].

A fase do portador inativo AgHBs é a fase que sucede à seroconversão do AgHBe para o respectivo Ac. É caracterizada por níveis normais de ALT, presença de Ac anti-HBe e ausência de AgHBe [64, 65].

A fase de HBC AgHBe negativo é a fase mais tardia da evolução natural da hepatite B e apresenta um mau prognóstico. Caracteriza-se por AgHBe negativo, Ac anti-HBe positivo e níveis variáveis de ALT [64, 65].

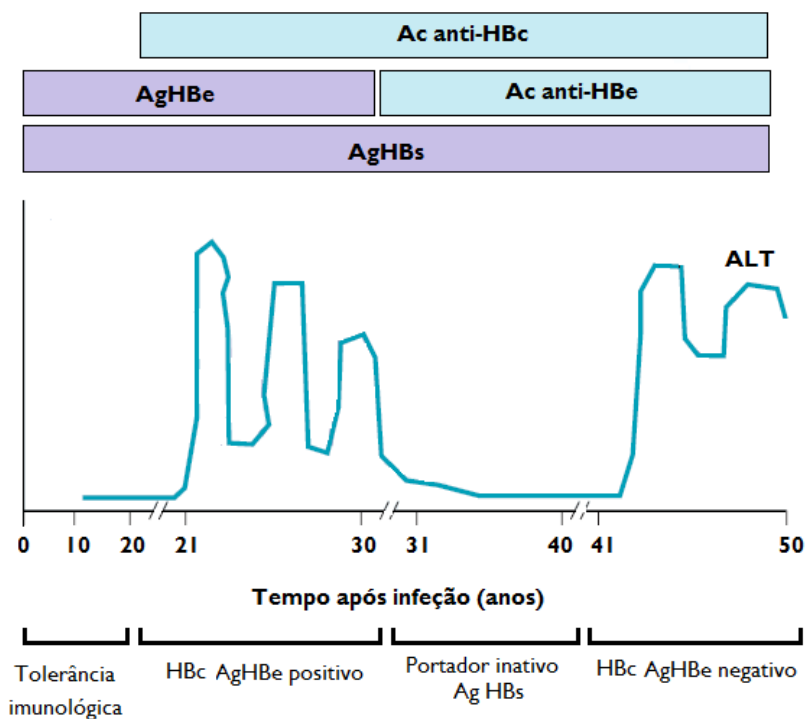


Figura 10. Curso químico e serológico de uma infecção crônica por VHB. A evolução da infecção crônica pelo VHB, por transmissão vertical, pode ser dividido em quatro fases, que diferem entre si nos níveis séricos de ALT, AgHBe e Ac anti-HBe [66]

6. Conclusão

Neste o último ano, o estágio no laboratório do HAL foi uma experiência muito importante, onde desenvolvi novas competências profissionais e até pessoais. Naturalmente teve os seus altos e baixos, mas tentei sempre superar as dificuldades e questionar todas as dúvidas que me iam surgindo.

Relativamente às colheitas, penso que foi uma experiência muito gratificante e muito enriquecedora, a partir da qual tive a oportunidade de ter contacto direto com os pacientes; perceber de perto a realidade de algumas situações e dificuldades que por vezes na teoria não são discutidas. Reforçou também a perceção de que as amostras biológicas não são apenas isso, mas sim pacientes cujo estado de saúde pode depender de um resultado de uma análise. Um facto que hoje em dia, devido à automatização, tende a ser esquecido.

Em Medicina e nos Laboratórios Clínicos a evolução não pára. Há a procura constante de novas técnicas mais precisas e exatas, apostando sempre em resultados de máxima qualidade. A meu ver, é crucial que os profissionais acompanhem essa evolução, e que haja uma preocupação em se apostar numa formação contínua; na aprendizagem de novas metodologias e técnicas, cada vez mais precisas.

Posso ainda afirmar que a área das Análises Clínicas é a área na qual quero realmente exercer uma profissão. Depois da vivência do último ano, cimentei o sabia, aprendi o que não sabia e aprendi, sobretudo, que tenho muito mais para aprender.

7. Referências bibliográficas

- [1] Bowen, Raffick A.R.; Remaley, Alan T. - Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochemia Medica*. (2014) 31-44.
- [2] Organization, World Health - Laboratory Quality Management System. Geneva : World Health Organization, 2011
- [3] Failace, Renato et al. - Hemograma. Puerto Alegre (Brasil) : ARTMED Editora, 2011.
- [4] D'Orazio, Paul; Meyerhoff, Mark - Electrochemistry and Chemical Sensors. In Burtis, Carl A et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 85-101.
- [5] Drees, Julia C.; Wu, Alan H. B. - Analytical Techniques. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, p. 130-165.
- [6] Terry J. The major electrolytes: sodium, potassium, and chloride. *J Intraven Nurs*. 1994 Sep-Oct;17(5):240-7. Review. PubMed PMID: 7965369.
- [7] Scott, Mitchell G.; LeGrys, Vicky A.; Klutts, J. Stacey - Electrolytes and Blood Gases. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 431-449.
- [8] Caquet, René - *Análises Clínicas Guia Prático para Medicina*. Lisboa : Climepsi Editores, 2004
- [9] Polancic, Joan E. - Electrolytes. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 356-383.
- [10] Endres, David B.; K.Rude, Robert - Disorders of Bone. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* . 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 711-734.
- [11] Delaney, Michael P.; Price, Christofer P.; Lamb, Edmund J. - Kidney Function and Disease. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 631-654.
- [12] Rosa, Nuno Guimarães et al. - RABDOMIÓLISE. *Acta Médica Portuguesa*. 18:(2005) 271-282.
- [13] Lamb, Edmund J.; Price, Christofer P. - Creatinine, Urea, and Uric Acid. In Burtis, Carl A et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 363-372.

- [14] Freeman, Vicki S. - Carbohydrates. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 309-327.
- [15] Chiasera, Janelle M.; Xu, Xin - Liver Function. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 516-540.
- [16] Higgins, Trefor; Beutler, Ernest; Doumas, Basil T. - Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 509-526.
- [17] Panteghini, Mauro; Bais, Renze - Enzymes. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 317-336.
- [18] Johnson-Davis, Kamisha; McMillin, Gwen A. - Enzymes. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 281-308.
- [19] Hill, Peter G. - Gastrointestinal Diseases. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 696-710.
- [20] Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus - *Diabetes Care*. 33:(2010) S62-S69.
- [21] Sacks, David B. - Carbohydrates. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 373-401.
- [22] Circular Normativa Direcção-Geral da Saúde, Diabetes e Gravidez, N°: 8/DGCG, 4/11/98.
- [23] Norma da Direcção-Geral da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N° 002/2011, 14/01/2011.
- [24] Sethi, Amar A.; Warnick, G. Russell; Remaley, Alan T. - Lipids and Lipoproteins. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 328-355.
- [25] Rifai, Nader; Warnick, G. Russell; Remaley, Alan T. - Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 402-430.
- [26] Norma da Direcção-Geral da Saúde, Abordagem terapêutica das dislipidemias, N° 019/2011, 28/09/2011.
- [27] Henriques, Sílvia et al. - Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. VOL.13:N° 2 (2006) 113-125.

- [28] Thymchak, Lynda L. - Amino Acids and Proteins. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 223-265.
- [29] Chiasera, Janelle M. - Cardiac Function. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 541-556.
- [30] Johnson, A. Myron - Amino Acids and Proteins. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 287-316.
- [31] O'connell, Theodore X.; Horita, Timothy J.; Kasravi, Barsam - Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *American Academy of Family Physicians*. VOL 71:N° 1 (2005) 105-112.
- [32] Sobiesiak, M. - Acute Phase Proteins in Transplant Patients – Review. *Transplantationsmedizin*. VOL. 15:(2003) 25-30.
- [33] Simon, L. et al. - Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. VOL. 39:N° 2 (2004) 206-217.
- [34] Schuetz, Philipp; Albrich, Werner; Mueller, Beat - Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Medicine*. VOL. 9:N° 1 (2011) 107-115.
- [35] Waldvogel-Abramowska, Sophie et al. - Physiology of Iron Metabolism. *Transfusion medicine and Hemotherapy*. VOL. 41:(2014).
- [36] Jameson, J. Larry; Weetman, Anthony P. - Disorders of the Thyroid Gland. In Longo, Dan L. et al. Trad. *Harrison's Endocrinology*. 3. ed. [S.l.] : McGraw-Hill Education, 2013, p. 62-99.
- [37] Mullur, R.; Liu, Y.-Y.; Brent, G. A. - Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*. VOL. 94:N° 2 (2014) 355-382.
- [38] Kleerekoper, Michael - Hormones. In Burtis, Carl A. et al. Trad. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 450-459.
- [39] Melo, Miguel - Tiroidites Autoimunes. *Acta Médica Portuguesa*. VOL. 19:(2006) 387-394.

[40] Gronowski, Ann M. - Reproductive Disorders. In Burtis, Carl A. et al. Trad. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 780-801.

[41] Seley, Rod R.; Stephens, Trent D.; Tate, Philip - Anatomy & Physiology. 6. ed. [S.l.] : McGraw-Hill Higher Education, 2003. p.1027-1072.

[42] Grotzke, Marissa - Gonadal Function. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 477-489.

[43] Bhasin, Shalender; Jameson, J. Larry - Disorders of the Testes and Male Reproductive System. In Longo, Dan L. et al. Trad. Harrison's Endocrinology. 3. ed. [S.l.] : McGraw-Hill Education, 2013, p. 148-171.

[44] McCudden, Christopher R.; Willis, Monte S. - Circulating Tumor Markers: Basic Concepts and Clinical Applications. In Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry Trad. Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations. 6. ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2009, p. 637-650.

[45] Arlt, Wiebke - Disorders Of The Adrenal Cortex. In Longo, Dan L. et al. Trad. Harrison's Endocrinology. 3. ed. [S.l.] : McGraw-Hill Education, 2013, p. 100-126.

[46] Endres, David B.; Rude, Robert K. - Disorders of Bone. In Burtis, Carl A. et al. Trad. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 712-734.

[47] Malati, T. - Tumour markers: An overview. Indian Journal of Clinical Biochem. VOL. 22:Nº 2 (2007) 17-31.

[48] Chan, Daniel W.; Booth, Ronald A.; Diamandis, Eleftherios P. - Tumor Markers. In Burtis, Carl A. et al. Trad. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 338-362.

[49] PERKINS, GREG L. et al. - Serum Tumor Markers. American Family Physician. VOL. 68:Nº 6 (2003) 1075-1082.

[50] Norma da Direcção-Geral da Saúde, Prescrição e Determinação do Antígeno Específico da Próstata - PSA, Nº 060/2011, 29/12/2011.

[51] Shenkin, Alan; Baines, Malcolm - Vitamins and Trace Elements. In Burtis, Carl A. et al. Trad. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2008, p. 476-508.

- [52] Snow, Christopher F. - Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency. Arch Intern Med. VOL. 159:(1999) 1289-1298.
- [53] Owen, Judith A. et al. - Effector Responses: Cell and Antibody-Mediated Immunity. In Trad. Kuby Immunology. 7. ed. New York : W. H. Freeman and Company, 2013, p. 415-450.
- [54] Collier, Leslie; Oxford, John - Resistance to virus infections. In Trad. Human Virology. 3. ed. New York : Oxford University Press, 2006, p. 39-50.
- [55] Collier, Leslie; Oxford, John - Retroviruses and AIDS. In Trad. Human Virology. 3. ed. New York : Oxford University Press, 2006, p. 179-188.
- [56] Murray, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, Michael A. - Blood and Tissue Protozoa. In Trad. Medical Microbiology. 7. ed. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2013, p. 759-777.
- [57] Saúde Reprodutiva: Doenças Infecciosas e Gravidez (Orientações Técnicas da DGS) - . Lisboa : Direcção Geral de Saúde, 2000.
- [58] Collier, Leslie; Oxford, John - The betaherpesviruses: cytomegalovirus and human herpesviruses 6 and 7. In Trad. Human Virology. 3. ed. New York : Oxford University Press, 2006, 149-152.
- [59] Murray, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, Michael A. - Human Herpesviruses. In Trad. Medical Microbiology. 7. ed. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2013, p. 461-483.
- [60] Lieber, Charles S. - Alcohol and Hepatitis C. Alcohol Research & Health. VOL. 25:Nº 4 (2001) 245-254.
- [61] Collier, Leslie; Oxford, John - The enteric hepatitis viruses A and E. In Trad. Human Virology. 3. ed. New York : Oxford University Press, 2006, p. 171-174.
- [62] Murray, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, Michael A. - Hepatitis Viruses. In Trad. Medical Microbiology. 7. ed. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2013, p. 583-597.
- [63] Schiff, Eugene R.; Ozden, Nuri - Hepatitis C and Alcohol. Alcohol Research & Health. VOL. 27:Nº 3 (2003) 232-239.
- [64] Carneiro de Moura, Miguel; Marinho, Rui - Historia Natural y Manifestaciones Clínicas de la Hepatitis B Crónica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26 Supl 7:(2008) 11-8.

[65] ELGOUHARI, H. M.; ABU-RAJAB TAMIMI, T. I.; CAREY, W. D. - Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. Cleveland Clinic Journal of Medicine. VOL. 75:N° 12 (2008) 881-889.

[66] Adaptado de Rehermann, Barbara; Nascimbeni, Michelina - Immunology Of Hepatitis B Virus And Hepatitis C Virus Infection. Nature Reviews. VOL.5:2005) 215-229..

Anexos

Anexo I

Resumo dos procedimentos no tratamento de diferentes amostras			
Exame cultural	Meio de Cultura	Incubação	Lâmina
Urocultura c/ ou s/ (pesquisa do Bacilo de Koch (BK ¹))	<i>Uriselect4</i> <i>Candiselect 4</i> (sempre que se observam leveduras no exame a fresco)	24 h, 37° C	Exame a fresco do sedimento urinário Gram (Ziehl-Neelsen)
Cultura de expectorções/secreções brônquicas c/ ou s/ (cultura de BK)	<i>Gelose Sangue, Gelose Chocolate</i> <i>Chapman, MacConkey</i> <i>Candiselect 4</i> (<i>Lowenstein-Jensen</i>)	24 h, 37° C <i>Lowenstein-Jensen</i> (3-4 semanas)	Gram e (Ziehl-Neelsen)
Coprocultura	<i>Hektoen, Yersinia</i> <i>Chapman</i> Caldo Tetrionato Repicagens em caldo de tetrionato e <i>Hektoen</i>	24 h, 37° C <i>Yersinia</i> (24°C)	_____
Hemocultura	<i>Gelose Sangue</i> <i>Gelose Chapman</i>	24 h, 37° C	Gram
Cultura de pus e exsudados	<i>Gelose Sangue</i> <i>Chapman, MacConkey</i>	24 h, 37° C	Gram e Ziehl-Neelsen
Cultura de exsudados uretral, vaginal e esperma	<i>Gelose Sangue, Gelose Chocolate</i> <i>Candiselect 4</i>	24 h, 37° C (<i>Gelose chocolate</i> em microaerofilia)	Gram
Cultura exsudado rectal	<i>Granada</i>	24 h, 37° C	_____
Cultura de líquidos e catéteres	<i>Gelose Sangue</i>	24 h, 37° C	Gram

I-O Bacilo de Koch é uma outra designação que se pode atribuir ao *Mycobacterium tuberculosis*

Anexo 2 – Resumo dos testes bioquímicos

Testes Potenciométricos (Química seca)

Sódio

O *microslide* é constituído por dois eléctrodos seletivos de ião, cada um dos quais contendo metil-monensina (um ionóforo de sódio).

Potássio

O *microslide* é constituído por dois eléctrodos seletivos de ião, cada um dos quais contendo valinomicina (um ionóforo de potássio).

Cloreto

O *microslide* é constituído por dois eléctrodos seletivos de ião, cada um dos quais contendo uma camada de proteção, que inibe as interferências dos níveis normais de brometo e ácido úrico.

Testes Colorimétricos (Química seca)

Cálcio

Reagentes do slide: Corante Arsenazo III

Reação: O cálcio forma um complexo com o corante Arsenazo III, induzindo um desvio do máximo de absorção.

Magnésio

Reagentes do slide: Corante Formazan

Reação: O magnésio da amostra reage com o corante formazan; o complexo resultante de magnésio – corante origina um desvio do máximo de absorção.

Fósforo

Reagentes do slide: Molibdato de amónia; Sulfato de *p*-metilaminofenol

Reação: O fósforo da amostra forma um complexo com o molibdato de amónia; o complexo é reduzido pelo sulfato de *p*-metilaminofenol para dar origem a um composto azul de heteropolimolibdénio.

Ureia

Reagentes do slide: Urease; Indicador de amónia

Reação: A ureia da amostra reage com a urease, que produz amónia. A amónia reage com o indicador de amónia para dar origem a um corante.

Acido Úrico

Reagentes do slide: Uricacase; Peroxidase; Corante leuco

Reação: O ácido úrico da amostra é oxidado na presença da uricacase, para formar alantoína e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio, pela ação da peroxidase oxida o corante leuco.

TBIL

Reagentes do slide: Sal de diazónio (4-(N-carboximetilsulfonyl) hexafluorofosfato de benzenodiazónio)

Reação: A bilirrubina não conjugada, bilirrubina conjugada e bilirrubina ligada à albumina reagem com o sal de diazónio para originar cromóforos de azobilirrubina.

Testes Colorimétricos - continuação

BuBc

Reação: A Bu e a Bc ligam-se a um mordente catiónico. Os picos de absorvância de Bu e Bc são desviados. A um comprimento de onda de 400 a 420 nm, a Bu e a Bc têm absorvâncias semelhantes; e a 460 nm, a Bu tem uma absorvância superior à da Bc. Devido a estas características, as densidades de reflexo aos dois comprimentos de onda são usadas para determinar as suas concentrações.

Amónia

Reagentes do slide: Azul de bromofenol (indicador de amónia)

Reação: Os iões da amónia são convertidos em amónia gasosa, que, posteriormente, reage com o azul de bromofenol, originando um corante azul.

Glicose

Reagentes do slide: Glicose oxidase; Peroxidase; Percursosores de corante.

Reação: A oxidação da glicose é catalisada pela glicose oxidase, formando peróxido de hidrogénio e gluconato. A oxidação dos precursosores do corante e do peróxido de hidrogénio.

Colesterol Total

Reagentes do slide: Triton X-100; Hidrolase de ésteres de colesterol; Colesterol oxidase; Peroxidase; Corante leuco.

Reação: O surfactante Triton X-100 auxilia a dissociação do colesterol e dos ésteres de colesterol associados às lipoproteínas. A hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol é catalisada pela hidrolase dos ésteres de colesterol. O colesterol livre é oxidado, originando colesteno e peróxido de hidrogénio. O corante leuco é oxidado na presença da peroxidase.

Colesterol HDL

Reagentes do slide: Ácido fosfotúngstico; Cloreto de magnésio; Hidrolase de ésteres de colesterol; Colesterol oxidase; Peroxidase; Corante leuco.

Reação: As HDL são separadas pela precipitação das lipoproteínas, que não HDL, pelo ácido fosfotúngstico e o cloreto de magnésio. O restante é semelhante à reação do colesterol total.

Triglicéridos

Reagentes do slide: Triton X-100; lipase; glicerol cinase; L- α -glicerofosfato oxidase; peroxidase; corante leuco

Reação: O Triton X-100 auxilia na dissociação dos triglicéridos das lipoproteínas. Os triglicéridos são hidrolisados pela lipase, originando glicerol e ácidos gordos. O glicerol é fosforilado, originando L- α -glicerofosfato, que é oxidado em fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio.

Proteínas Totais

Reagentes do slide: Sulfato de cobre; Ácido tartárico

Reação: Baseia-se numa reação em que, quando a proteína reage com o tartarato de cobre em meio alcalino, produz um complexo violeta.

Albumina

Reagentes do slide: Corante verde de bromocresol

Reação: O corante verde de bromocresol liga-se à albumina. Esta ligação resulta num desvio do comprimento de onda da refletância máxima do corante livre.

Testes cinéticos (Química seca)

Creatinina

Reagentes do slide: creatinina amidohidrolase; creatina amidinohidrolase; sacrosina oxidase; peroxidase; corante leuco

Reação: A creatinina é hidrolisada em creatina, que é convertida em sarcosina e ureia pela creatina amidinohidrolase. A sarcosina é oxidada dando origem a glicina, formaldeído e peróxido de hidrogénio. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio.

AST

Reagentes do slide: aspartato de sódio; α -quetoglutarato de sódio; piruvato oxidase; oxaloacetato descarboxilase; corante leuco; peroxidase

Reação: O aspartato de sódio e o α -quetoglutarato de sódio produzem glutamato e oxaloacetato, reação catalisada pela enzima aspartato Aminotransferase. O oxaloacetato é convertido em piruvato e dióxido de carbono através da oxaloacetato descarboxilase. O piruvato é oxidado a acetilfosfato e peróxido de hidrogénio. Finalmente, o corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio, sob efeito catalítico da peroxidase.

ALT

Reagentes do slide: L-alanina; α -quetoglutarato; lactato desidrogenase; NADH

Reação: A Alanina Aminotransferase da amostra catalisa a transferência dos grupos amina da L-alanina para o α -quetoglutarato, para produzir piruvato e glutamato. Em seguida, o lactato desidrogenase catalisa a conversão do piruvato e de NADH em lactato e NAD⁺.

γ -GT

Reagentes do slide: L- γ -glitamil-*p*-nitroanilida; glicilglicina

Reação: A Gama-Glutamiltransferase catalisa a transferência da porção de γ -glutamil da L- γ -glutamil-*p*-nitroanilida para a glicilglicina, produzindo γ -glutamil glicilglicina e *p*-nitroanilina.

ALP

Reagentes do slide: *p*-nitrofenilfosfato

Reação: A Fosfatase alcalina da amostra catalisa a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato para *p*-nitrofenol num pH alcalino.

LDH

Reagentes do slide: Piruvato de sódio; NADH

Reação: A enzima lactato desidrogenase, presente na amostra, catalisa a conversão do piruvato e NADH em lactato e NAD⁺.

Amilase

Reagentes do slide: amilopectina corada

Reação: A amilase na amostra catalisa a hidrólise de um amido corado em sacarídeos corados mais pequenos.

Lipase

Reagentes do slide: Diacetinase; 2,3-diacetilglicerol; Glicerol cinase; L- α -glicerofosfato oxidase; Peroxidase; Corante leuco

Reação: A lipase catalisa a hidrólise de ésteres de triacilglicerol insolúveis na água. A enzima diacetinase converte o substrato 2,3-diacetilglicerol em glicerol. O glicerol é convertido em L- α -glicerofosfato, que após oxidação, gera peróxido de hidrogénio, que reage com o corante leuco.

Testes cinéticos - continuação

CK

Reagentes do slide: fosfato de creatina; Adenosina Difosfato (ADP); glicerol; glicerol cinase; glicerofosfato oxidase; corante leuco; peroxidase

Reação: A creatina cinase catalisa a conversão de fosfato de creatina e ADP em creatina e Adenosina Trifosfato (ATP). O glicerol é fosforilado em L- α -glicerofosfato pelo ATP. A oxidação do L- α -glicerofosfato em fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogénio ocorre na presença de glicerofosfato oxidase. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio na presença da peroxidase para formar um corante.

CK-MB

Reagentes do slide: N-acetilcisteína; anticorpo anti-CK-M humana; fosfato de creatina; ADP; glicerol; glicerol cinase; L- α -glicerofosfato oxidase; peroxidase; corante leuco

Reação: O surfactante N-acetilcisteína ativa a CK e os anticorpos anti-CK-M humana (inibem a atividade da CK-MM e ~50% da CK-MB). A restante actividade da CK representa 50% da concentração total da CK-MB. A CK existente na amostra catalisa a conversão de fosfato de creatina e ADP em creatina e ATP. O glicerol é fosforilado em L- α -glicerofosfato, que é depois oxidado em fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio na presença da peroxidase para formar um corante.

Ferro

Reagentes do slide: Ácido ascórbico; Corante

Reação: O ião férrico é extraído da transferrina a um pH ácido. O ácido ascórbico reduz o ferro para a sua forma ferrosa. O ião ferroso liga-se ao corante e forma um complexo colorido.

TIBC

Reação: Adiciona-se à amostra citrato de ferro para saturar todos os locais disponíveis de apotransferrina. Depois de um período de incubação de cinco minutos, a amostra é aplicada a uma coluna de alumina onde o ferro que não está ligado à transferrina é adsorvido. O ferro ligado à transferrina contido no eluato representa a capacidade total de ligação do ferro da amostra.

Testes por turbidimetria (Química líquida)

Microalbuminúria

A adição de Ac específicos para a albumina produz uma reacção imunoquímica, a partir da qual se formam complexos Ag/Ac. As propriedades de difusão de luz dos complexos Ag/Ac aumentam a turbidez da solução proporcionalmente à concentração de albumina na amostra de urina.

Pré-albumina

A adição de Ac específicos para a pré-albumina humana produz uma reacção imunoquímica, a partir da qual se formam complexos Ag/Ac. As propriedades de difusão de luz dos complexos Ag/Ac aumentam a turbidez da solução proporcionalmente à concentração de pré-albumina na amostra.