

Andressa da Silva Batista Riker

# **Relatório de Estágio em Análises Clínicas**

Estágio curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

**Orientador:**  
Dr. Mário João Roque

Orientador interno da Faculdade de Farmácia:  
Prof<sup>a</sup>. Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos

*Setembro, 2015*

Universidade de Coimbra



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Deus Eterno e Soberano, autor da minha vida. A Jesus Cristo, O maior dos mestres, a fonte de toda sabedoria, a razão de tudo o que sou e faço. Aquele que é digno de receber a honra, a glória, e louvor para sempre. Ao Espírito Santo meu melhor amigo e meu consolador. Não tenho palavras suficientes para expressar a proporção da minha gratidão, pois reconheço que nada seria possível realizar sem a tua presença, Senhor.

Ao longo dessa caminhada, foi impressionante observar a manifestação do teu amor e cuidado, quantos desafios e quanta provisão, quantas bênçãos recebidas, quantos milagres, enfim, realmente a tua fidelidade rompeu todos os anseios do meu coração e levou minha vida muito além do que poderia imaginar. Obrigada, Senhor.

Ao meu esposo André Figueira Riker, pela presença, apoio, incentivo, compreensão, carinho, cumplicidade e paciência em todos os momentos desta e de outras caminhadas nas quais compartilhou comigo os momentos de tristezas e alegrias.

A minha família (pais e irmãos) pelo apoio em todos os momentos, sempre me incentivando com dedicação e pela contribuição em minha formação.

Aos meus pastores, obrigada pelas orações, ensinamentos, incentivo e por serem usados por Deus para me abençoar.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e Dr. Mário João Roque, obrigada pela dedicação e confiabilidade, cuja orientação foi de grande importância para a realização deste Relatório.

A coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, Professora Doutora Leonor Almeida, muito obrigada pelo acompanhamento, apoio e disponibilidade ao longo destes anos.

A todos, enfim, que de maneira directa e indirecta contribuíram com orações, apoio, carinho, durante esta caminhada.

*“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo os seus propósitos.” Rm. 8:28*



# ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i> .....	vii
<i>Lista de Figuras</i> .....	xi
<i>Lista de Tabelas</i> .....	xiii
<i>Resumo</i> .....	xv
<i>Abstract</i> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO</b> .....	2
<b>3. SECTOR DE BIOQUÍMICA CLÍNICA E TOXICOLOGIA</b> .....	5
<b>4. SECTOR DE MICROBIOLOGIA</b> .....	10
<b>5. SECTOR DE HEMATOLOGIA</b> .....	11
5.1 Metodologia e equipamentos usados no Sector de Hematologia.....	13
5.1.1 Determinação de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e reticulócitos.....	13
5.1.2 Determinação da Hemoglobina.....	13
5.1.3 Avaliação da Hemostase e Coagulação.....	14
5.1.4 Determinação da Velocidade de Sedimentação.....	14
5.1.5 Determinação de grupos sanguíneos ABO e Rh.....	14
5.2 Fundamento dos ensaios Hematológicos.....	15
5.2.1 Hemograma.....	16
5.2.2 Estudo morfológico do Sangue Periférico.....	24
5.2.3 Velocidade de Sedimentação.....	25
5.2.4 Hemostase e Coagulação.....	26
5.2.5 Imunohematologia.....	30
<b>6. SECTOR DE IMUNOLOGIA E ENDCRINOLOGIA</b> .....	31
6.1 Metodologia e equipamentos usados no Sector de Imunologia e Endocrinologia.....	33
6.1.1 Determinação dos parâmetros analíticos por Quimiolumines- cência.....	33
6.1.2 Determinação dos parâmetros analíticos por <i>Enzyme Linked Flourescent Assay</i> (ELFA).....	34
6.1.3 Determinação dos parâmetros analíticos por Imunocromatografia.....	36

6.2 Fundamento dos ensaios Imunológicos e Endócrinos.....	36
6.2.1 Serologia de infecções virais.....	36
6.2.2 Serologia de infecção bacteriana.....	40
6.2.3 Marcadores de anemia.....	41
6.2.4 Marcadores tumorais.....	42
6.2.5 Avaliação da Tiróide.....	44
6.2.6 Hormonas da função gonadal.....	47
6.2.7 Hormona produzida pela glândula supra-renal.....	48
<b>7. AUTOIMUNIDADE DA TIROIDE.....</b>	<b>49</b>
<b>8. INTERPRETAÇÃO LABORATORIAL DE UM CASO CLÍNICO.....</b>	<b>50</b>
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<i>Bibliografia.....</i>	<i>54</i>
<i>Anexos.....</i>	<i>59</i>

## ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ACTH	Hormona Adenocorticotrófica
Ag	Antigénio
AgHBc	Antigénio específico do núcleo central <i>core</i> do HBV
AgHBe	Antigénio “e” do núcleo do HBV
AgHBs	Antigénio de superfície do HBV
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HAV	Anticorpo anti-HAV
Anti-HBc	Anticorpos anti- <i>core</i> do HBV
Anti-HBe	Anticorpo contra o antigénio “e” do núcleo do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o antigénio de superfície do HBV
Anti-HCV	Anticorpo anti-HCV
Anti-HIV	Anticorpo anti-HIV
Anti-Tg	Anticorpo anti-tiroglobulina
Anti-TPO	Anticorpo anti-peroxidase da tiróide
APTT	Tempo Parcial de Tromboplastina Activada
AST	Aspartato Aminotransferase
CA 19.9	Antigénio Carbohidrato 19.9
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
Col-HDL	Colesterol – Lipoproteínas de alta densidade
Col-LDL	Colesterol – Lipoproteínas de baixa densidade
CSMC	Centro de Saúde Militar de Coimbra
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAC	Especialista em Análises Clínicas

EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EDTA-K3	Ácido Etilenodiaminotetracético tripotássico
ELFA	Imunoensaio enzimático fluorescente ( <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i> )
ELISA	Imunoensaio enzimático ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FSH	Hormona estimulante do Folículo
FT	Factor Tecidual
FVW	Factor de Von Willebrand
GHRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
G-6-PDH	Glucose 6 fosfato desidrogenase
HAV	Vírus da Hepatite A
HBV	Vírus da Hepatite B
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C
HGB	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INR	Razão Normalizada Internacional
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional
LH	Hormona Luteinizante
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PT	Tempo de Protrombina
PTGO	Prova de Tolerância à Glucose Oral

SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
RBC	Eritrócito ( <i>Red Blood Cell</i> )
RDW	Variação do tamanho dos eritrócitos ( <i>Red Cell Distribution Width</i> )
Rh	<i>Rhesus Factor</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RIQAS	Randox International Quality Assessment Scheme
SISLAB	Sistema Informático Laboratorial
Tg	Tireoglobulina
TIBC	Capacidade total de fixação do ferro ( <i>Total Iron Binding Capacity</i> )
TPA	Ativador do plasminogénio
TRAbs	Anticorpo estimulante da tiróide
TSH	Hormona estimulante da tiróide
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UIBC	Capacidade latente de fixação de ferro ( <i>Unsaturated Iron Binding Capacity</i> )
VCM	Volume Corpuscular Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
β-HCG	Subunidade Beta da Gonadotrofina Coriónica Humana



## LISTA DE FIGURAS

1. Funcionamento do Laboratório do CSMC.....	3
2. Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics.....	9
3. Arkray, Adams AIC – HA-8160.....	9
4. Uritest (Urit- Uritest – 300).....	11
5. Microscópio.....	11
6. Cell-Dyn Ruby da Abbott Diagnostics.....	12
7. Option 4 plus BioMérieux.....	12
8. Becton Dickinson Sedi – 15.....	12
9. Hematopoiese em humanos.....	16
10. Sangue periférico com dois neutrófilos (bastão e segmentado), um eosinófilo, um basófilo, um monócito, um linfócito, plaqueta e eritrócitos.....	16
11. Cascata da Coagulação.....	27
12. Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics.....	33
13. Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux.....	33
14. Imunoensaio competitivo simultâneo.....	35
15. Imunoensaio não competitivo e Imunoensaio indirecto.....	36
16. Perfil serológico da Hepatite B aguda.....	38



## LISTA DE TABELAS

I. Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos realizados no sector de Bioquímica e Toxicologia.....	5
II. Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos realizados no sector de Microbiologia (Bacteriológico, Micológico, Parasitológico).....	10
III. Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos realizados no sector de Hematologia.....	11
IV. Alterações morfológicas dos eritrócitos.....	19
V. Procedimentos efectuados diante do Estudo morfológico do Sangue Periférico.....	25
VI. Alterações dos parâmetros de Hemostase e Coagulação.....	29
VII. Fenotipagem do Sistema ABO.....	31
VIII. Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos realizados no sector de Imunologia e Endocrinologia.....	32
IX. Reactividade dos marcadores serológicos e estado da infecção provocada pelo HBV.....	38
X. Análises dos parâmetros da tiróide.....	50
XI. Análises dos parâmetros da tiróide após um ano.....	51



## RESUMO

O presente relatório apresenta uma descrição geral das actividades desenvolvidas ao longo do estágio, realizado no laboratório do Hospital Militar Regional 2 de Coimbra ou Centro de Saúde Militar de Coimbra, no âmbito do estágio curricular do curso de Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio correspondeu a uma carga horária de 600 horas, que possibilitou trabalhar em diferentes sectores nomeadamente Bioquímica Clínica, Toxicologia, Microbiologia que serão abordados neste relatório de maneira breve e concisa. Por outro lado, os sectores de Hematologia, Imunologia e Endocrinologia são apresentados de forma mais aprofundada, evidenciando as metodologias e fundamento dos equipamentos e ensaios efectuados nestes serviços, bem como a importância clínica dos parâmetros determinados e a interpretação laboratorial de um caso clínico.

Para além da abordagem técnica realizada nestes sectores, será também descrita a rotina laboratorial, que inclui as fases Pré-Analítica, Analítica, e Pós-Analítica, o sistema de gestão de qualidade (Controlo de Qualidade Interno e Externo).



## **ABSTRACT**

This report presents an overview of the activities developed during the internship, that took place at the laboratory of the Regional Military Hospital 2 of Coimbra or Health Center Military Coimbra, within the scope of the Master degree in Clinical Analysis, from the School of Pharmacy of the University of Coimbra.

The internship comprised 600 hours, in which was possible to work in different sectors including Clinical Chemistry, Toxicology and Microbiology that are covered briefly and concisely in this document. The sectors of Hematology, Immunology and Endocrinology are described in greater detail, highlighting the methodologies and fundamentals of the analysis and of the equipment as well as the clinical importance of the parameters under analysis and the laboratorial interpretation of a clinical case.

Besides the technical approach held in these sectors, this document also describes the laboratorial routine, which includes the Pre-Analytics, Analytics, and Post-Analytics phases, the quality management system (Internal and External Quality Control).



# I. INTRODUÇÃO

A realização do estágio curricular foi uma oportunidade essencial para colocar em prática os conhecimentos científicos obtidos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e a sua finalidade foi a minha inserção na rotina laboratorial do Hospital Militar Regional 2 de Coimbra (HMR2) ou Centro de Saúde Militar de Coimbra (CSMC).

O Laboratório apresenta diferentes sectores designados por: Bioquímica Clínica, Toxicologia, Microbiologia, Hematologia, Imunologia e Endocrinologia. Tive a possibilidade de trabalhar em todos estes sectores, e de aprofundar a minha experiência laboratorial nos sectores de Hematologia, Imunologia e Endocrinologia, permanecendo mais de um mês em cada um, o que correspondeu a uma carga horária total de 600 horas, distribuída ao longo de 5 meses.

A rotina do Laboratório proporcionou a compreensão das responsabilidades desempenhadas pelo Especialista em Análises Clínicas, que estão descritas principalmente durante as fases Pré - Analítica, Analítica, Pós - Analítica, bem como na monitorização do Controlo de qualidade interno e externo do Laboratório.

De forma a exemplificar a integração do conhecimento adquirido no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, é feita uma análise e interpretação dos parâmetros laboratoriais de um indivíduo que apresentava Tireoidite Autoimune acompanhada de valores hormonais normais, observando uma possível correlação das alterações dos resultados com seu significado clínico.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO**

As secções seguintes apresentam o desempenho, funcionamento (fases Pré-Analítica, Analítica, e Pós-Analítica) e as particularidades do Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra, assim como a gestão de qualidade fornecida pelo mesmo.

### **2.1 IDENTIFICAÇÃO E PARTICULARIDADES**

Em 2007 foi apresentada a nova missão do Centro de Saúde Militar de Coimbra, cujo objectivo primordial é o apoio à actividade operacional, através de acções de prevenção e monitorização do estado de saúde dos militares, ou seja, a protecção da força.

Da mesma forma, é disponibilizado à chamada família militar serviços de saúde de qualidade a familiares, a militares em situação de reserva ou reforma, a deficientes das forças armadas e outros beneficiários, contribuindo assim de forma determinante para o aumento do bem-estar e resiliência dos militares e das suas famílias (1).

### **2.2 ESPECIALISTA RESPONSÁVEL**

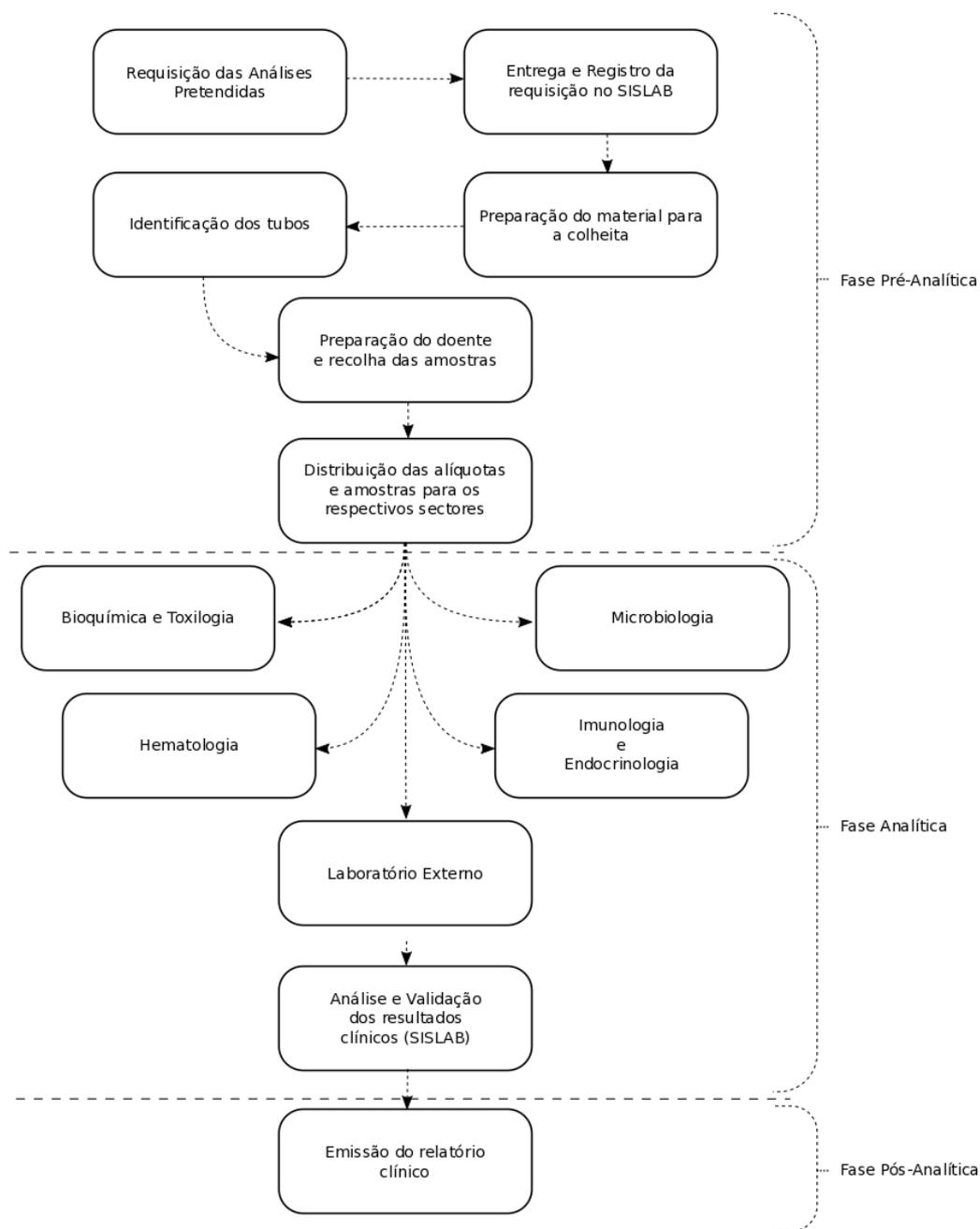
O Especialista em Análises Clínicas responsável pelo laboratório é o Doutor Mário João Roque, Tenente-Coronel, Farmacêutico, Director do Laboratório de Análises Clínicas, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos e Mestre em Saúde Pública pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

### **2.3 DESCRIÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO LABORATÓRIO**

Para um bom funcionamento do Laboratório e garantia da qualidade as fases Pré-Analítica, Analítica, e Pós-Analítica, são de suma importância para que os processos analíticos gerem resultados fidedignos aos utentes. Como pode ser observado na Figura 1, a fase Pré-Analítica inclui serviços como a análise da requisição, a preparação do utente, a colheita das amostras (esclarecer ao utente o procedimento adequado), a manipulação das amostras, o transporte e a conservação das mesmas, sendo esta considerada a fase onde é encontrada a maior percentagem de erros laboratoriais (2).

A fase Analítica corresponde aos procedimentos analíticos aplicados aos ensaios, de forma que as amostras sejam devidamente processadas pelos equipamentos, além disso, é feito uma análise e validação técnica dos resultados.

A fase Pós-Analítica compreende um relatório com os resultados analíticos, a interpretação e validação biopatológica, com ou sem informação adicional, e a entrega deste ao utente. Há algumas análises que não são realizadas no laboratório por serem requisitadas raramente, e nesse caso alíquotas das amostras são enviadas para Laboratório Externo (2).



**Figura 1:** Funcionamento do Laboratório do CSMC.

## 2.4 CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade realizado no Laboratório abrange processos como as calibrações, os controlos internos e externos, e a manutenção dos equipamentos, tendo em

vista a monitorização e a garantia da qualidade dos procedimentos efectuados durante as fases Pré-Analítica, Analítica e Pós-Analítica, com intuito de assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos.

As calibrações dos equipamentos normalmente são feitas quando há um novo Kit ou lote de reagente que será utilizado, ou de acordo com a periodicidade adequada a cada equipamento. O controlo interno é executado antes de processar as amostras, alguns sendo executados diariamente, de forma semanal ou de 15 em 15 dias. O controlo externo geralmente é realizado depois das amostras serem processadas de 15 em 15 dias ou mensalmente. As manutenções dos equipamentos, para além destes períodos referidos, também podem ser trimestrais e anuais.

Para analisar o controlo interno, são utilizados materiais líquidos ou liofilizados obtidos a partir de um laboratório de referência, apresentando uma estabilidade de longa duração. As análises são feitas utilizando de dois a três níveis de controlo diferentes correspondendo ao nível alto, ao nível médio e ao nível baixo, sendo os resultados registados, analisados e comparados com os valores de referência do controlo usado, e também segundo as Regras de Westgard e Levey-Jennings. Portanto, este procedimento possibilita validar as amostras com segurança, pois o controlo interno avalia a precisão dos resultados e permite detectar problemas no desempenho dos métodos aplicados na rotina do Laboratório (2).

No entanto, o controlo externo tem como objectivo avaliar a exactidão dos resultados, e é efectuado com amostras fornecidas pelo laboratório de referência nacional, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge ou pelo Laboratório de Referência Internacional, RIQAS. Estas amostras apresentam valores que são desconhecidos do laboratório que está a ser controlado, as quais são processadas da mesma forma que uma amostra de um utente. Os resultados alcançados são remetidos de volta para o respectivo laboratório de referência, analisados e reenviados ao laboratório, possibilitando avaliar o desempenho do laboratório (performance dos métodos aplicados) frente aos resultados fornecidos pelo grupo de Laboratórios.

## **2.5 FLUXO DE UTENTES E AMOSTRAS**

No Laboratório de Análises Clínicas do CSMC é feita a entrega e colheita das amostras de acordo com as requisições pretendidas. Todavia, há situações em que as colheitas não são realizadas no laboratório, por exemplo, quando uma determinada unidade

militar não pode se deslocar até o laboratório. Então, estas amostras são colhidas nessa unidade e transportadas ao laboratório.

Normalmente, o fluxo diário de amostras é de 20 a 40 amostras, porém existem alguns períodos particulares em que o número de amostras aumenta consideravelmente. Em geral, isto ocorre quando há realização das Provas de Aptidão Física, quando os militares vão ou retornam de uma missão, ou quando são realizadas análises a uma determinada unidade militar.

### 3. SECTOR DE BIOQUÍMICA CLÍNICA E TOXICOLOGIA

No sector de Bioquímica Clínica e Toxicologia são realizadas diversas análises bioquímicas (Tabela I), pelo que o fluxo de amostras é mais intenso do que nos outros sectores. De forma resumida, os parâmetros determinados nestes sectores estão abordados na Tabela I.

No que diz respeito ao sector de Toxicologia, determina-se essencialmente a presença de drogas de abuso nas amostras de urina dos utentes (Tabela I). As amostras são oriundas de determinadas unidades militares, e essas amostras de urina devem sempre ser colhidas em duplicado, pois qualquer amostra com resultado positivo é enviada para o Laboratório de Toxicologia da Direcção de Saúde do Exército em Lisboa, para confirmação do resultado. Estes processos têm por objectivo monitorizar o consumo de drogas de abuso no serviço militar.

**Tabela I:** Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos determinados no sector de Bioquímica e Toxicologia.

Produto biológico	Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos
Sangue (Soro) sem anticoagulante 0-2h	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics Figura 2	Hexoquinase/G-6-PDH Espectofotometria	Glucose Prova de Tolerância a Glucose 75g
Sangue total com EDTA	Arkray, Adams AIC – HA-8160 Figura 3	HPLC	Hemoglobina glicosilada AIC
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott	Enzimática, colesterol esterase	Colesterol

	Diagnostics	Espectofotometria	
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Detergente selectivo como acelerador da reacção colesterol oxidase Espectofotometria	Colesterol-HDL
Sangue (Soro) sem anticoagulante	SISLAB > 400 TG vai para LADMED.	Equação de Friedwald Colesterol LDL = Colesterol Total – [Colesterol-HDL] – [Triglicerídeos/5]	Colesterol-LDL
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Glicerol fosfato oxidase Espectofotometria	Triglicéridos
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Creatinina - picrato alcalino Espectofotometria	Creatinina
Sangue (Soro) sem anticoagulante e urina 24h	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics SISLAB	[creatinina urina]/[creatinina soro] x Vol.	Depuração da Creatinina Vol. de Urina/min.
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Urease Espectofotometria	Uréia
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Uricase Espectofotometria	Ácido Úrico
Urina 24h	Architec Ci 8200 Abbott	Imunoturbidimetria	Microalbuminúria

	Diagnostics		
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Reacção de Diazo Espectofotometria	Bilirrubina direta
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Reacção de Diazo Espectofotometria	Bilirrubina Total
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	p-nitrofenil fosfato Espectofotometria	Fosfatase alcalina
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	NADH -> NAD <sup>+</sup> NADH (sem P-5'-P) Espectofotometria	ALT/TGP AST/TGO
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida Espectofotometria	γ- glutamiltransferase
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Reação Lactato a Piruvato (NADH) Espectofotometria	Lactato desidrogenase
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Verde de Bromocresol Espectofotometria	Albumina
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Biureto Espectofotometria	Proteínas totais
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Ferene S Espectofotometria	Ferro, UIBC (a partir destes resultados calcula-se TIBC)

Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Imunoturbidimetria	Ferritina, Transferrina
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	% Saturação Transferrina = (Ferro x 100) / TIBC	Saturação da Transferrina
Sangue (Soro) sem anticoagulante e urina 24h	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Potenciometria	Sódio, Potássio e Cloro
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Arsenazo III Espectofotometria	Cálcio total
Sangue (Soro) sem anticoagulante e urina	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Arsenazo Espectofotometria	Magnésio
Sangue (Soro) sem anticoagulante e urina	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Fosfomolibdato Espectofotometria	Fósforo
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Sistema Informático (Excel)	$1.86 \times \text{Na}^+ + ((\text{Ureia} \times 28/60) / 2.8) + (\text{Glu}/18) + 9)$	Osmolalidade
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	NAC (N-acetil-cisteína) Espectofotometria	Creatina cinase
Sangue (Soro) sem anticoagulante.	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Imunoinibição	Creatina cinase - MB
Sangue (Soro) sem anticoagulante, Sangue total em caso de urgência	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Imunoensaio de Micropartícula por Quimioluminescência	Troponina I

Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Imunoturbidimetria	Proteína C reativa
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Turbidimetria	A.S.O RF
Sangue (Soro) sem anticoagulante.	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	$\alpha$ -naftil-fosfato Espectofotometria Act. Fração Prostática = Act. Total – Act. Fração Não prostática	Fosfatase ácida total (Prostática e não Prostática)
Sangue (Soro) sem anticoagulante e urina 24h.	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Hidrólise (2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriose) Espectofotometria	Amilase
Urina (em duplicada) da manhã	Architec Ci 8200 Abbott Diagnostics	Imunoensaio enzimático	Anfetaminas, Canabinóides, Cocaína, Opiáceos



**Figura 2:** Architect ci8200 da Abbott Diagnostics.



**Figura 3:** Arkray, Adams AIC – HA-8160.

#### 4. SECTOR DE MICROBIOLOGIA

O sector de Microbiologia engloba as áreas de Bacteriologia, Micologia e Parasitologia, no qual as análises como Urocultura, Coprocultura, Antibiograma, entre outras, são efectuadas de acordo com a Tabela II, sendo as áreas de Bacteriologia (Análise Sumária da urina e Urocultura) e Parasitologia as mais requisitadas. Além disso, para a identificação dos microorganismos são realizadas provas de identificação usando meios de cultura específicos e testes de susceptibilidade aos antibióticos no caso de bactérias.

No sector de Micologia os fungos apresentam um crescimento lento, por isso são feitas várias repicagens em meios específicos para identificação, sendo a *Candida sp* a mais comumente encontrada no laboratório. No sector Parasitologia as requisições mais frequentes são para sangue oculto nas fezes cujo teste é realizado por método imunocromatográfico, abordado no Sector de Imunologia.

**Tabela II:** Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos determinados no sector de Microbiologia (Bacteriológico, Micológico, Parasitológico).

Produto biológico	Equipamento	Metodologia	Parâmetro analítico
Exsudado nasofaríngeo e Vaginal, Expectoração, Urina, Fezes	1. Labcaire BH class II Cabinet 2. Estufa 3. Microscópio	Urocultura, Coprocultura, Provas de Identificação Antibiograma	Identificação dos microorganismos patogénicos. Teste de Sensibilidade aos antibióticos
Urina	Uritest (Urit-Uritest – 300) Figura 4	Refletofotometria	Análise sumária da Urina*
Fezes	Microscópio Figura 5	Observação Microscópico Método de Sedimentação	Pesquisa de ovos, quistos e parasitas

\*Análise sumária determina o pH e a presença de leucócitos, corpos cetónicos, urobilinogênio, bilirrubina, densidade, hemoglobina, proteínas, glucose, nitritos.



Figura 4: Uritest (Uritest - 300).



Figura 5: Microscópio

## 5. SECTOR DE HEMATOLOGIA

No Sector de Hematologia são realizados diversos procedimentos e análises, tais como o hemograma, o Estudo morfológico do sangue periférico, a determinação da Velocidade de Sedimentação e da Hemostase e Coagulação, entre outros (Tabela III), descritos de maneira detalhada no decorrer desta secção. Os intervalos de referência para os diversos parâmetros analíticos estão no Anexo I e II do relatório.

**Tabela III:** Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos determinados no sector de Hematologia.

Produto biológico	Equipamento	Metodologia	Parâmetro analítico
Sangue total com EDTA	Cell-Dyn Ruby da Abbott Diagnostics Figura 6	Citometria de fluxo Espectrofotometria Observação Microscópica	Hemograma (Eritrograma, Leucograma, Contagem de Plaquetas), Contagem de Reticulócitos  Estudo morfológico do Sangue Periférico (Eritrócitos, Leucócitos e Plaquetas)
Sangue total com Citrato de sódio	Becton Dickinson Sedi - 15	Método Westergren	Velocidade de Sedimentação

	Figura 8		
Sangue (plasma) com Citrato de sódio	Option 4 plus BioMérieux Figura 7	Método óptico e cronométrico de Clauss	Tempo de protrombina, Tempo parcial de tromboplastina, fibrinogênio
Sangue total com EDTA	Manualmente	Método de Aglutinação	Grupo Sanguíneo ABO, Fator Rh



Figura 6: Cell-Dyn Ruby da Abbott Diagnostics.



Figura 7: Option 4 plus BioMérieux.



Figura 8: Becton Dickinson Sedi-15.

## 5.1 METODOLOGIA E EQUIPAMENTOS USADOS NO SECTOR DE HEMATOLOGIA

### 5.1.1 Determinação de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e reticulócitos

O Cell-Dyn Ruby (Figura 6) utiliza como metodologia a **Citometria de fluxo** para medir as populações de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, além disso faz a contagem de reticulócitos. A citometria de fluxo é um processo que permite a avaliação rápida de grandes quantidades de células e proporciona uma análise quantitativa das células a nível individual.

Há dois canais de medição independentes utilizados pelo equipamento, que são: canal óptico para a determinação da população de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, reticulócitos e o canal de hemoglobina para a determinação da mesma.

A suspensão de células (presente no tubo onde se coloca a amostra) é transferida para uma câmara de fluxo em que as células são alinhadas numa única fila em frente a um feixe luminoso. Os diferentes tipos de células dispersam a luz laser em ângulos diferentes, gerando informação sobre o tamanho (volume), a estrutura interna (complexidade citoplasmática), a granularidade (granulação) e morfologia da superfície da célula. A interacção das células ou partículas com o feixe luminoso produz sinais ópticos que são detectados e convertidos em impulsos eléctricos, os quais serão armazenados e analisados pelo computador.

Os citómetros de fluxo geralmente medem dois ângulos de dispersão. A dispersão de luz em ângulo frontal (*forward scatter*), que mede o tamanho das células. A dispersão de luz em ângulo lateral (*side scatter*) que mede a superfície e a estrutura interna da célula, mas principalmente mede a granularidade interna, que corresponde à complexidade da célula. A combinação da informação das duas medidas de dispersão permite uma diferenciação entre populações de células (3).

### 5.1.2 Determinação da Hemoglobina

A determinação da Hemoglobina utiliza uma metodologia diferente denominada **Espectrofotometria**. Para este teste é efectuada uma diluição da amostra de sangue, colhida para tubos com EDTA com um reagente lisante, que vai provocar a lise dos eritrócitos favorecendo a libertação de hemoglobina, cuja absorvância é lida a um comprimento de onda de 555nm. A absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina na amostra (3).

### 5.1.3 Avaliação da Hemostase e Coagulação

O equipamento Option Plus (Figura 7) utiliza o **método óptico e cronométrico de Clauss** através da detecção óptica do coágulo, na presença de agitação magnética contínua do meio da reacção. Este método determina o Tempo de Protrombina - Razão Normalizada Internacional (PT-INR), o Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) e o doseamento de fibrinogénio (detalhados na secção dos fundamentos dos ensaios hematológicos).

Para a realização deste ensaio é necessário: a adição de activadores da coagulação, a manutenção de uma temperatura estável (37°C) durante a coagulação e o processo de medição; uma agitação mecânica e um sistema de detecção de coágulos (4).

### 5.1.4 Determinação da Velocidade de Sedimentação

A metodologia para a determinação da velocidade de sedimentação do eritrócito é baseado no **método de Westergren**, o qual utiliza amostra de sangue recolhido em tubos a vácuo contendo citrato de sódio, que dilui-se automaticamente no sistema fechado e automatizado. Dentro do equipamento Becton Dickinson Sedi – 15 (Figura 8) há um misturador integrado e câmara digital.

A sedimentação é avaliada após ocorrer a agregação dos eritrócitos e antes das células se começarem a unir, geralmente tem a duração de 18-24min. Este período corresponde a sedimentação que teria ocorrido em 60min, que é medido e convertido por um algoritmo sendo equivalente a velocidade de sedimentação do eritrócito realizado pelo método convencional. Este procedimento é influenciado por diversos factores como: patologias (Artrite reumatóide, Tuberculose, Policitemia Vera), proteínas como o fibrinogénio que estimula a agregação, alterações morfológicas dos eritrócitos nomeadamente a poiquilocitose, esferocitose e as células em foice. Na secção dos fundamentos dos ensaios hematológicos é descrito a importância clínica da análise deste parâmetro (5).

### 5.1.5 Determinação de grupos sanguíneos ABO e Rh

A determinação de grupos sanguíneos ABO e Rh é baseado no **método de Aglutinação**, a partir da adição de anti-soros comerciais anti-A, anti-B e anti-D às células do utente. A reacção ocorre à temperatura ambiente, observando se há aglutinação ou não, ou

seja, se há presença de aglutininas, isto permite classificar a que grupo sanguíneo o utente pertence.

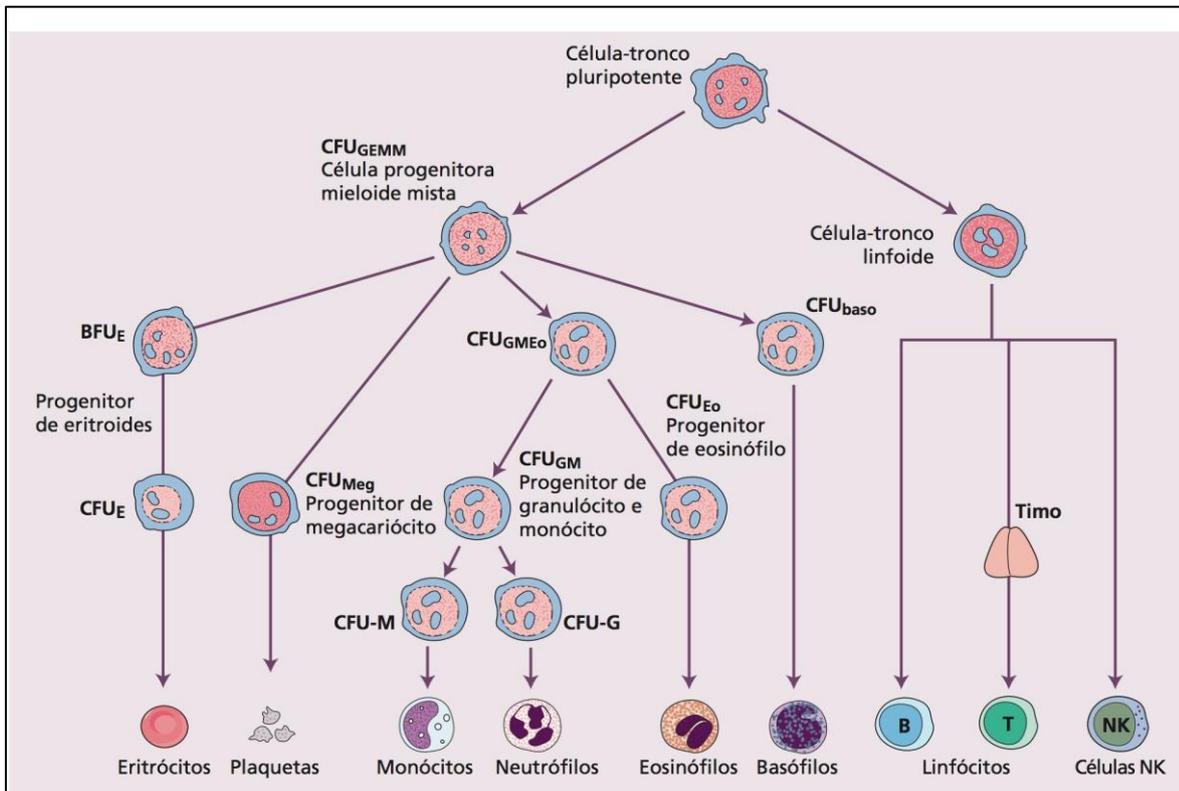
A aglutinação é a formação de agregados de células (neste caso eritrócitos) que expressam determinados antígenos na presença de anticorpos específicos, também conhecidos como aglutininas. A formação destes agregados de células visíveis indica a reacção entre antígeno e anticorpo. Os anticorpos IgM apresentam maior probabilidade de produzir aglutinação completa do que os anticorpos IgG por causa do tamanho e da valência da molécula IgM (6).

## 5.2 FUNDAMENTO DOS ENSAIOS HEMATOLÓGICOS

Antes de iniciar os fundamentos dos ensaios hematológicos, é importante fazer uma abordagem quanto a origem das células que são analisadas, bem como as suas funções e a importância clínica destas determinações. Os ensaios hematológicos permitem observar uma grande diversidade de alterações não só na quantidade, mas também na morfologia e tamanho das células, que podem ser visualizadas (microscópio) na rotina laboratorial do Centro de Saúde Militar de Coimbra.

A hematopoiese é o mecanismo fisiológico responsável pela formação das células sanguíneas. Isto ocorre a partir de células estaminais pluripotentes que dão origem a células progenitoras que, ao sofrer divisão, proliferação e diferenciação (maturação) formam os eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, linfócitos B e T e plaquetas. De maneira representativa a hematopoiese pode ser visualizada na Figura 9.

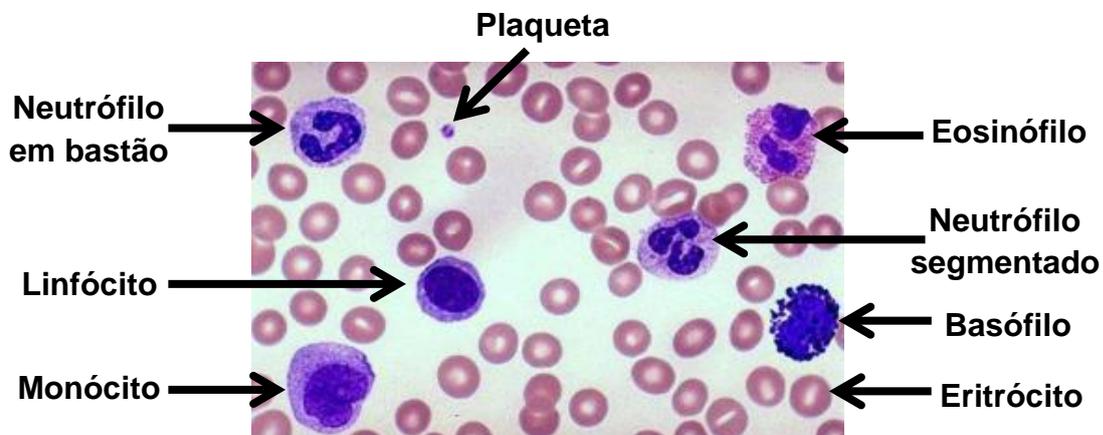
No adulto a hematopoiese normal decorre na medula óssea, por esta apresentar um microambiente adequado para o desenvolvimento e diferenciação das células maduras. Este microambiente engloba um conjunto de substâncias químicas, tais como citocinas, factores de crescimento e hormonas, entre outros, e diversos tipos celulares (células endoteliais, linfócitos, macrófagos, células reticulares e adipócitos) (7, 8).



**Figura 9:** Hematopoiese em humanos. O diagrama apresenta a célula-tronco multipotente da medula óssea e as linhagens celulares que dela se originam. Baso, basófilo; BFU, unidade formadora dos basófilos; CFU, unidade formadora de colônia; E, eritróide; Eo, eosinófila; GEMM, granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica; GM, granulócito, monócito; Meg, megacariócito; NK, *natural Killer* (9).

### 5.2.1 HEMOGRAMA

O Hemograma é uma análise que permite avaliar as células sanguíneas, sendo composto pelo Eritrograma, Leucograma e contagem de Plaquetas. A contagem de reticulócitos é determinada quando solicitado. Este exame laboratorial permite fazer uma análise quantitativa e percentual dos vários elementos celulares representados na Figura 10 e detalhados a seguir.



**Figura 10:** Sangue periférico a partir de uma coloração Wright com dois neutrófilos (bastão e segmentado), um eosinófilo, um basófilo, um monócito, um linfócito, plaqueta e eritrócitos (10).

a) **Eritrograma: definições dos constituintes**

O Eritrograma corresponde a análises dos eritrócitos, o qual possibilita fazer um estudo quanto a sua forma, tamanho, conteúdo (hemoglobina). Os principais constituintes do Eritrograma são:

– **Eritrócitos:** é uma célula sem núcleo, com citoplasma acidófilo, e em forma de disco bicôncavo, apresentando área/volume constante. A duração média de vida é de  $\pm 120$  na circulação sanguínea. A sua principal função é transportar  $O_2$  aos tecidos e efectuar o transporte do  $CO_2$  dos tecidos para os pulmões. Para executar essa troca gasosa, os eritrócitos contêm uma proteína especializada, a hemoglobina.

Na medula óssea ocorre o processo maturação dos eritrócitos que passam pelas diferentes fases, desde o proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulócito e eritrócito. A produção de eritrócitos (eritropoiese) é estimulada pela eritropoietina que é secretada pelos rins (11). A contagem total dos eritrócitos (RBC) expressa  $10^6$  células/ul e os valores normais variam de  $4,0 - 5,5 \times 10^6$ /ul.

– **Hemoglobina (HGB):** é a proteína transportadora de oxigénio dos eritrócitos, a qual é formada no eritrócito em desenvolvimento na medula óssea. É constituída pelo grupo heme que contém ferro e pela porção proteica denominada de globina. A globina consiste em 4 cadeias polipeptídicas, cada uma das quais ligada a um grupo heme. Nos adultos as cadeias  $2\alpha$  e  $2\beta$  (HGBA) estão em maior quantidade, mas ainda contém HGBA2 e HGBF. A HGB é expressa em grama por decilitro (g/dL) e os valores de referência variam com o sexo e a idade, sendo mais elevados no sexo masculino. A concentração de hemoglobina é um importante marcador de anemia (11, 12).

– **Hematócrito (HCT):** consiste no volume sanguíneo ocupado pela massa dos eritrócitos, em percentagem do volume total de sangue. O valor normal varia de acordo com o sexo. Este é calculado através da contagem de eritrócitos e do volume corpuscular médio que se segue:

$$HCT (\%) = (RBC \times VCM) / 10 \quad (12)$$

– **Índices hematimétricos ou eritrocitários:** são determinados a partir da contagem global dos eritrócitos, quantidade de hemoglobina e determinação do hematócrito. Permitem classificar as anemias em Microcíticas, Normocíticas, Macrocíticas, Normocrómica e Hipocrómica, e os resultados são expressos em percentagem (11).

*Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):* representa a quantidade média de hemoglobina contida em cada eritrócito, expressa em picogramas (pg). É calculado através dos valores de RBC e da HGB segundo a seguinte fórmula:  $HCM (pg) = (HGB/RBC) \times 10$ . Valores diminuídos de HCM podem ser encontrados em anemias microcíticas, e valores aumentados em anemias macrocíticas ou em casos de esferocitose (13).

*Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):* representa a concentração média de hemoglobina no eritrócito. Este índice depende da relação entre a quantidade de HGB e o volume do eritrócito, expressa em g/dL. Por norma a hemoglobina ocupa um terço do volume do eritócito. Sua determinação é útil para avaliar a cromia dos eritrócitos (normocromia ou hipocromia). Sendo calculada pela seguinte fórmula:  $MCHC (g/dL) = (HGB/HCT) \times 100$  (13).

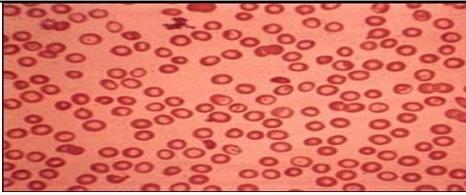
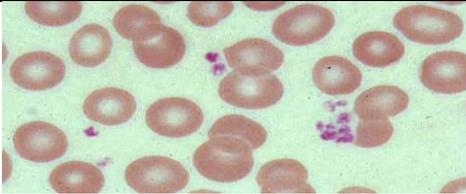
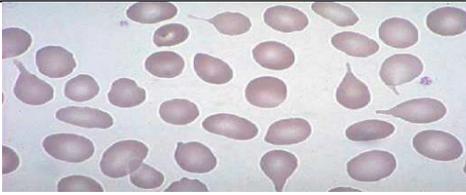
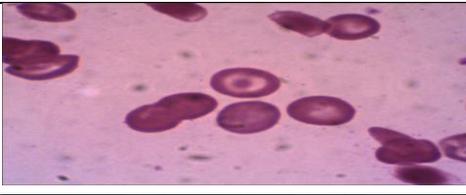
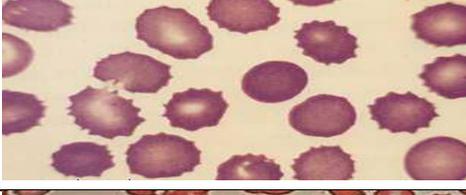
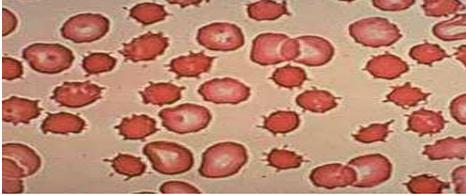
*Volume Corpuscular Médio (VCM):* corresponde ao volume médio dos eritrócitos, e é expresso em fentolitros (fl). Os mesmos podem apresentar tamanho superior ou inferior aos valores de referência, denominados macrocíticos ou microcíticos, respectivamente. É calculado pela fórmula abaixo:  $VCM (fl) = (HCT/RBC) \times 10$  (13).

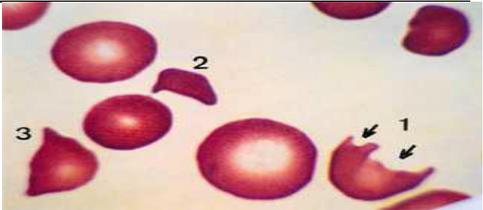
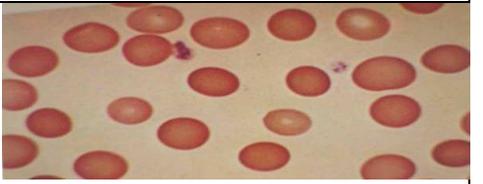
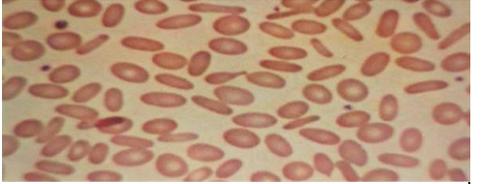
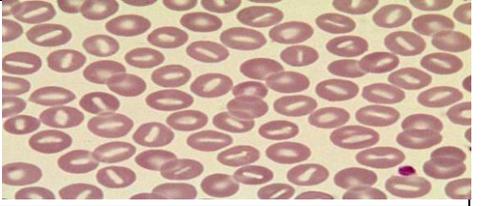
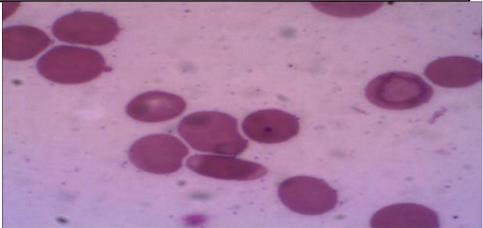
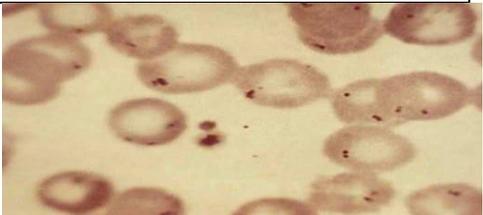
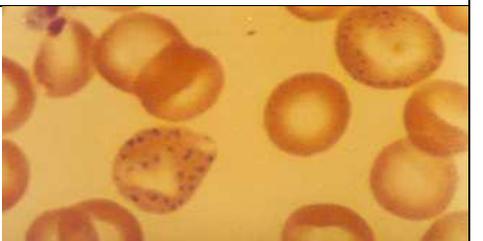
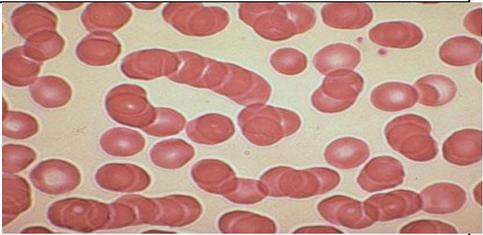
*Varição do tamanho dos eritrócitos (RDW):* é uma medida de heterogeneidade da população eritrocitária, sendo expressa em percentagem, onde a variação normal pode chegar aos 15%. A RDW é directamente proporcional ao grau de anisocitose. Este parâmetro contribui para a diferenciação de anemias microcíticas e hipocrómicas, estando elevado em casos de anemia ferropriva enquanto nas talassemias minor está normal e, contribuindo também para a diferenciação entre anemia megaloblástica, na qual este parâmetro geralmente está aumentado e anemia macrocítica, na qual está frequentemente normal (13).

#### **b) Eritrograma: alterações morfológicas**

As alterações morfológicas dos eritrócitos são causadas por alguns factores indicados na Tabela IV. A morfologia dos eritrócitos é estudada num esfregaço sanguíneo que é visualizado pela Microscopia óptica. (11, 14).

**Tabela IV:** Alterações morfológicas dos eritrócitos (11, 14).

Designação	Alteração	Principais causas	Imagem
Eritrócito	-	-	
<b>Tamanho</b>			
Microcitose	Diminuição do tamanho	Anemias por deficiência de ferro e Talassemias	
Macrocitose	Aumento do tamanho	Anemias megaloblásticas por defeito de vitamina B12 e/ou ácido fólico	
<b>Formas</b>			
Dacriócito	Em forma de lágrima ou pêra	Mielofibrose, anemia megaloblástica e talassemia menor	
Codócito ou Target cells	Células em alvo, com coloração aumentada e palidez central	Icterícia obstrutiva, hepatopatia, hemoglobinopatias e talassemias	
Drepanócito	Em forma de foice	Anemias falciformes	
Equinócito	Cobertos de pequenas espículas	Hepatopatias, síndrome hemolítica Urémica e déficit de piruvatocinase	
Acantócito	Cobertos de espículas de diferentes comprimentos	Hipotiroidismo Abetalipoproteinemia; hepatopatias e após esplenectomia	

Esquizócito	Fragmentos de eritrócitos	Anemias hemolíticas, lesão mecânica (hemólise ou pacientes que sofrem queimaduras graves)	
Esferócitos	Células em forma de esfera	Esferocitose hereditária e adquirida	
Eliptócito	Células alargadas com elevada concentração de hemoglobina	Eliptocitose congênita Leucemias e Talassemias	
Estomatócito	Apresentam uma fenda central ou estoma	Hepatopatia alcoólica	
<b>Inclusões eritrocitárias</b>			
Corpúsculo de Howell-Jolly	Uma pequena inclusão azul escura, de DNA, por eritrócito	Anemias hemolíticas graves e após esplenectomia	
Corpúsculos de Pappenheimer	Pequenas inclusões granulares escuras de hemossiderina	Após esplenectomia, anemia hemolítica grave e anemias sideroblásticas	
Pontilhado Basófilo	Pequenas estruturas azuis escuras por toda a área hemoglobinizada do eritrócito	Intoxicação por chumbo, $\beta$ -talassemia menor e anemias megaloblásticas	
<b>Outra alteração</b>			
Rouleaux	Eritrócitos empilhados	Gravidez, mieloma múltiplo e processos inflamatórios	

### c) Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos não nucleados que apresentam restos de RNA, ribossomas e mitocôndrias no seu citoplasma. Estão presentes em grandes quantidades no citoplasma de precursores eritróides nucleados de onde derivam. A maturação dos reticulócitos ocorre ao fim de 2-3 dias. A percentagem normal no sangue periférico é de 0,5 a 2,5% e a contagem absoluta é 25 a 125 x 10<sup>9</sup>/L. Alteração no número de reticulócitos no sangue periférico reflecte uma falha na actividade eritropoiética ou na função medular. Existem casos patológicos (anemias), em que os reticulócitos entram na circulação sanguínea em maior número que o normal, e isto permite avaliar a eficácia do processo de eritropoiese (11).

### d) Leucograma (Granulócitos, Monócitos e Linfócitos)

O processo de maturação das linhagens granulocíticas ocorre na medula óssea em fases distintas: Mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo em bastão e neutrófilo segmentado. A maturação monocítica passa pelas seguintes fases: Monoblasto, promonócito e monócito. Estes leucócitos são responsáveis principalmente pela fagocitose (15).

Na medula óssea originam-se os linfócitos (T e B). Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea, enquanto os linfócitos T sofrem maturação no Timo, esses órgãos são nomeados como órgãos linfoides primários. Esse processo de maturação passa pelas seguintes fases: Linfoblasto, pró-linfócito e linfócito (T ou B), sendo que o linfócito B ainda pode originar os plasmócitos. Nos órgãos linfóides secundários (baço, gânglios linfáticos e tecido linfóide associado as mucosas) os linfócitos maduros são activados e respondem aos agentes estranhos ao organismo.

Os linfócitos apresentam capacidade de resposta imunológica altamente específica incluindo a produção de anticorpos, e interagem com os granulócitos e com as células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) no processo de fagocitose, com a finalidade de proteger o organismo contra infecções e outras invasões (16).

O Leucograma consiste em avaliar os leucócitos. No sangue periférico é possível encontrar e visualizar através de microscopia óptica os leucócitos indicados em baixo, todavia diferenciar os linfócitos T dos B é difícil por esta metodologia, o que pode ser diferenciado na visualização é a forma normal e activada dos linfócitos.

– **Neutrófilo segmentado:** é também denominado polimorfonuclear, tem um núcleo denso com 2 a 5 lóbulos separados por uma fina banda de cromatina, e um citoplasma abundante com granulações neutrófilas. A sobrevivência no sangue é de 6 a 10 horas. Sua principal função é a eliminação de microorganismos invasores através da fagocitose.

Em alguns casos a administração de fármacos (cotrimoxazol, furosemida, fenitoína), o Síndrome de Kostmann, e as infecções virais (hepatite) podem causar uma diminuição de neutrófilos (neutropenia). Já o aumento de neutrófilos (neutrofilia) pode ser causado por infecções bacterianas (principalmente piogénicas), inflamações (miosite), doenças metabólicas (gota), fármacos (corticosteróides), leucemia mielóide crônica e outros (15).

– **Eosinófilo:** apresenta núcleo com 2 a 3 lóbulos, citoplasma abundante com granulações eosinófilas (vermelho-alaranjado). A sobrevivência deste é maior do que a dos neutrófilos. Eles penetram em exsudados inflamatórios e têm papel especial nas respostas alérgicas, na defesa contra os parasitas e remoção de fibrina formada durante a inflamação.

O aumento de eosinófilos (eosinofilia) é geralmente devido a uma resposta alérgica, a infecções por parasitas, doenças de pele, síndrome hipereosinofílica entre outras causas (15).

– **Basófilo:** possui núcleo com 3 lóbulos, citoplasma abundante com granulações basófilas que contêm heparina e histamina. Existe no sangue periférico em número muito mais baixo do que os demais leucócitos. Nos tecidos transformam-se em mastócitos. Têm sítios de ligação de imunoglobulina E e sua desgranulação liberta histamina. As causas mais comuns do aumento do número de basófilos (basofilia) na corrente sanguínea são a leucemia mielóide crônica, a policitemia vera, e algumas vezes pode ser observado de forma reaccional em casos como mixedema, varicela e colite ulcerativa (15).

– **Monócito:** é a maior das células sanguíneas, com núcleo grande, oval ou reniforme, citoplasma cinzento-azulado com granulações finas azurófilas e vacúolos finos. Circulam no sangue periférico por 20 a 40 horas, depois deixam o sangue para entrar nos tecidos onde se designam por macrófagos. O aumento de monócitos (monocitose) pode ocorrer devido a infecções bacterianas crônicas (tuberculose, brucelose, febre tifóide), lúpus eritematoso, artrite reumatóide, leucemia mielóide aguda (15).

– **Linfócito:** é uma célula pequena, com cromatina densa, membrana nuclear, núcleo redondo ou oval e citoplasma azul claro. Estes tipos de leucócitos estão envolvidos na produção de imunoglobulinas e nas defesas do organismo contra infecções virais ou na resposta a outros agentes estranhos ao hospedeiro.

Os linfócitos B combatem os agentes patogénicos extracelulares e seus produtos através da produção de anticorpos, e os linfócitos T interagem com as células fagocíticas, actuam no

controle dos linfócitos B e destroem as células infectadas. É possível observar aumento no número de linfócitos (linfocitose) em casos de infecções virais, mononucleose infecciosa, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica e outras infecções agudas (herpes, coqueluche) e crônicas (tuberculose, sífilis). Já a diminuição no número de linfócitos (linfopenia) pode ser causada por uma insuficiência grave da medula, fármacos (corticosteróides, imunossupressores), pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana).

Os plasmócitos são formados partir dos linfócitos B. Após o processo de maturação, os linfócitos B vão para a circulação sanguínea até adquirirem a capacidade de reconhecer um antígeno, através do seu receptor que é uma imunoglobulina. Ao ser reconhecido um antígeno estas células B maturam e dão origem as células B de memória e plasmócitos. Eles apresentam núcleo redondo, excêntrico, com cromatina agregada e citoplasma intensamente basófilo. Têm a capacidade de produzir grandes quantidades de moléculas de anticorpos solúveis (16).

As Células *Natural Killer* são células grandes, com grânulos no citoplasma, citotóxicas e constituem uma pequena percentagem dos linfócitos no sangue periférico. Estas células são orientadas para destruir as células que tenham baixa expressão de moléculas HLA (antígenos leucocitários humanos) classe I, o que pode ocorrer durante uma infecção viral ou células tumorais. Actuam através de mecanismos semelhantes aos usados pelas células T CD8<sup>+</sup> (T citotóxicas) (16).

É possível ocorrer um aumento do número total de leucócitos (leucocitose) ou uma diminuição (leucopenia) em situações patológicas como leucemias, linfomas, neoplasias, síndromes mieloproliferativas entre outras. Os valores normais variam  $4,0 - 11,0 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , contudo, pode haver alterações nas percentagens de cada tipo de leucócito (neutrófilo, basófilo...) descrito acima. Os valores de referência para cada leucócito estão no Anexo I do relatório.

A contagem leucocitária total é bastante significativa para o leucócito que apresenta variabilidade na contagem, pois auxilia na diferenciação de certas patologias (Linfomas, Leucemias). No entanto, quando há desconfiças relevantes em relação a contagem feito pelo equipamento, ou em casos de valores discrepantes é realizado um esfregaço sanguíneo, para observar a morfologia leucocitária e ver se o resultado obtido condiz com a realidade presente no esfregaço. Se necessário, recorre-se a um contador manual, para fazer a contagem, obtendo valores em percentagem.

## e) Plaquetas

As plaquetas formam-se pela fragmentação das extremidades das extensões do citoplasma do megacariócito, e cada megacariócito origina 1000 a 5000 plaquetas. Estas são responsáveis pelos mecanismos de hemostasia e coagulação e o seu principal regulador é a trombopoietina, produzida pelo fígado e pelos rins. A série megacariocítica está formada por um conjunto de células de origem medular que corresponde ao megacarioblastos, megacariócitos e plaquetas. Apresentam grânulos azurófilos que contêm factores de coagulação essenciais ao processo de hemostase e atua como tampão plaquetário (8, 17).

A contagem das plaquetas é importante para a identificação de algumas patologias, as quais podem provocar a sua diminuição ou seu aumento no sangue periférico. A diminuição das plaquetas (trombocitopenia) pode ser observada na depressão selectiva dos megacariócitos, em síndromes mielodisplásicas, no mieloma múltiplo, na púrpura trombocitopénica trombótica, na indução por fármacos (heparina), esplenomegalia. Já o aumento de plaquetas (trombocitose) está relacionado com inflamações crónicas, hemorragia, neoplasias e trombocitemia essencial (18, 19).

Por vezes, é possível encontrar resultados falsos na contagem de plaquetas (pseudotrombocitopenia), em virtude de poderem ocorrer agregados plaquetários (quando há activação plaquetária e libertação dos grânulos para a agregação), a formação de plaquetas gigantes e o satelitismo plaquetário (acontece devido a alterações nas imunoglobulinas de superfície dos neutrófilos provocadas pela exposição ao anticoagulante EDTA-K3, sendo induzido por um factor plasmático que leva à adesão plaquetar à superfície dos neutrófilos).

Estes fenómenos favorecem a diminuição na contagem das plaquetas, sendo assim, é imprescindível a colheita em citrato e observação microscópica para evitar a emissão de resultados incorretos (20, 21).

### 5.2.2 ESTUDO MORFOLÓGICO DO SANGUE PERIFÉRICO

Antes de ser feito o Estudo morfológico do sangue periférico, o hemograma é analisado de acordo com os seguintes perfis descrito na Tabela V, e as validações são efectuadas pelo Especialista em Análises Clínicas (EAC).

**Tabela V:** Procedimentos efectuados anteriormente ao Estudo Morfológico do Sangue periférico.

Perfis	Procedimento	Condições	Emissão dos resultados
Parâmetros Normais	-	-	Validação direta EAC
Parâmetros Normais mas com desvios, ou alterações nos critérios estabelecidos abaixo	Observar o esfregaço sanguíneo	Confirmada a alteração, esta é inserida nos resultados	Validação direta EAC
Parâmetros com uma ou mais alterações ou fora dos limites	Comparar com os resultados anteriores (histórico do utente)	Confirmada a alteração	Validação direta EAC
Parâmetros com uma ou mais alterações ou fora dos limites	Comparar com os resultados anteriores (histórico do utente)	Diferente ou sem histórico Repete-se a amostra Confirmada a alteração grave	Validação EAC e contacto com o médico especialista

O Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra utiliza a coloração May-Grunwald-Giemsa para fazer o esfregaço sanguíneo e aplica os seguintes critérios para o Estudo morfológico do esfregaço do sangue periférico:

- RDW superior a 15;
- RDW superior a 14, se os índices hematimétricos estiverem alterados;
- Inversão de fórmula igual ou superior a 10%;
- Qualquer inversão de fórmula se o número de leucócitos  $> 8 \times 10^3/\text{ul}$
- Monócitos superiores a 14%;
- Basófilos superiores a 2%;
- Plaquetas inferiores a  $150 \times 10^3/\text{uL}$  (sem histórico compatível)
- Em outras situações indicadas pelo próprio equipamento ou Leucocitoses com valores discrepantes.

### 5.2.3 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO (VS)

É um parâmetro que mede a velocidade de sedimentação dos eritrócitos no plasma correspondente a um período de uma hora. É considerado inespecífico, pois existem factores que influenciam directamente a VS, nomeadamente a concentração plasmática de moléculas proteicas grandes, como fibrinogénio e imunoglobulinas, e ainda o tamanho ou

conteúdo dos glóbulos vermelhos. No entanto, é útil para o diagnóstico e para monitorização na resposta ao tratamento de algumas patologias como polimialgia reumática, linfoma de Hodgkin, policitemia vera e anemia severa.

Os valores de referência são, em homens, 1 a 5mm na 1ª hora e, em mulheres, 5 a 15mm na 1ª hora. Há aumento progressivo de VS com a idade. A VS aumenta de forma exacerbada nas doenças inflamatórias sistémicas, em neoplasias e na gravidez, e consideravelmente no mieloma múltiplo devido a formação de rouleaux (eritrócitos empilhados). A diminuição da VS na policitemia vera é devida a alta concentração de eritrócitos (22).

#### 5.2.4 HEMOSTASE E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A **homeostase** é um processo de equilíbrio entre os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, aliados a um processo de fibrinólise. Os principais componentes envolvidos são as plaquetas, os factores de coagulação, os inibidores da coagulação, o mecanismo fibrinolítico e os vasos sanguíneos.

É essencial para sobrevivência parar uma hemorragia em locais de lesão vascular. No entanto, esta resposta necessita de ser estritamente controlada para evitar desenvolvimento de coágulos extensos (trombose) e para os desfazer após a reparação do dano.

Este processo é dividido por fases: a primeira fase corresponde a Hemostase primária que ocorre logo após a lesão de um vaso sanguíneo. Em resposta à lesão há uma vasoconstrição que levará à activação das plaquetas, estas por sua vez, vão formar um tampão homeostático através da adesão e agregação plaquetária. Diversas substâncias nomeadamente o fator VIII, o colagénio, a adenosina-di-fosfato, as fosfolipases, o ácido araquidónico, o tromboxano A<sub>2</sub>, a serotonina, a adrenalina, o fibrinogénio e as prostaciclina, entre outros, estão envolvidas na formação deste tampão. Isto acontece dentro de alguns minutos, sendo suficiente para o controlo temporário do sangramento.

A segunda fase denominada de **Coagulação** ou Hemostase secundária (Figura 11) envolve um sistema biológico de amplificação, no qual se desencadeia a formação de uma rede de fibrina, a partir da activação de um sistema pró-coagulante, que consiste numa série de reacções em cascata. Ainda nesta fase, depois da formação de fibrina sucede a activação do sistema inibidor (anticoagulante).

A cascata da coagulação divide-se em duas vias, de acordo com o método clássico, denominado de via Intrínseca, que acontece quando há uma lesão endotelial seguida de exposição do colagénio, onde os elementos necessários para a coagulação encontram-se no

sangue, sendo iniciado a partir da activação do factor XII. A via extrínseca acontece a partir de uma lesão tecidual, havendo exposição do factor tecidual (TF) fundamental para desencadear o processo de coagulação. As duas vias convergem a partir da activação do factor X, até à formação de fibrina, sendo que ambas atuam simultaneamente e sequencialmente no organismo (17).

Os factores de coagulação, proteínas e iões envolvidos na via Intrínseca são: XII, XI, IX, VII, VIII, X, pré-caliceína, caliceína, ciminogénio, fosfolípidos e cálcio. Na via Extrínseca são: factor tecidual ou tromboplastina tissular, VII, X, III, fosfolípidos e cálcio. E na via comum começa pela activação do factor X e envolve os factores VIIa (VII activado), Va, protrombina, cálcio, fosfolípidos e fibrinogénio. O factor XIII activado pela trombina é capaz de ligar covalentemente aos monómeros de fibrina. Todo este processo de activação para coagulação está esquematizado na Figura 11.

O sistema inibidor (anticoagulante) ocorre a partir da formação do coágulo de fibrina sobre a área lesada, o processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão para se evitar a oclusão trombótica do vaso. Para controlar a disseminação da activação da coagulação, intervêm quatro anticoagulantes naturais, o inibidor da via do factor tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT) (23).

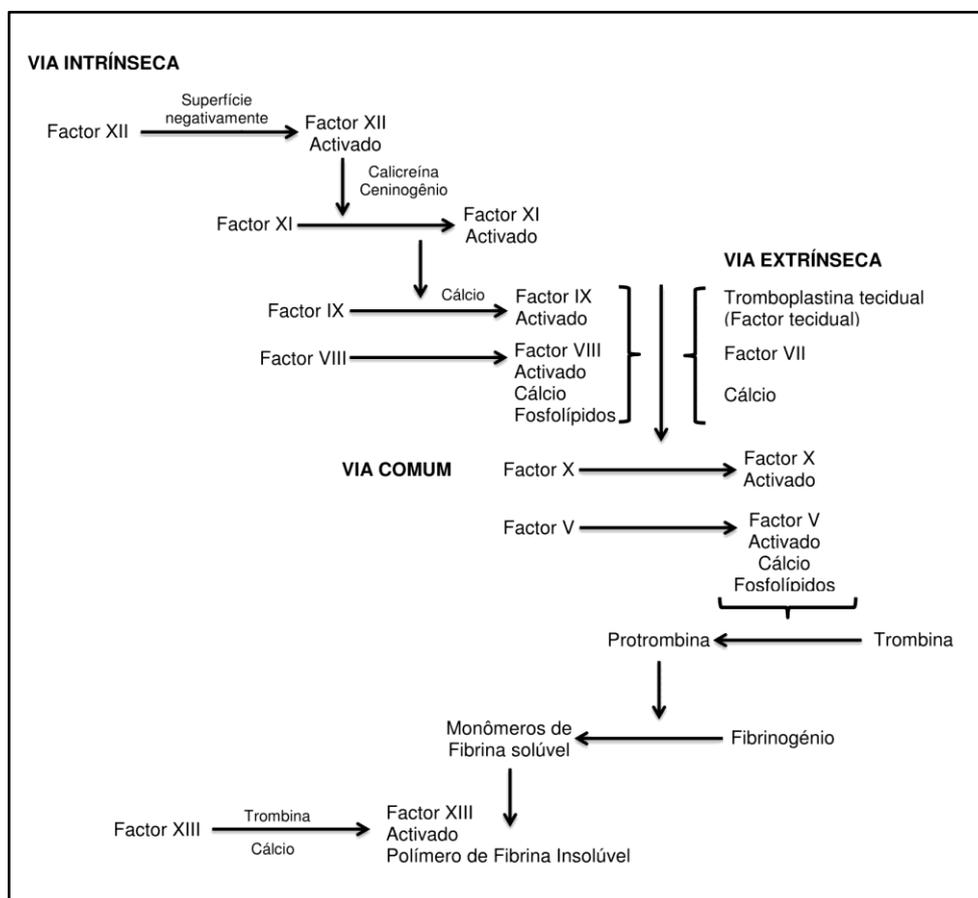


Figura 11: Cascata da Coagulação (24).

A terceira fase é denominada de **Fibrinólise** que consiste na remoção do excesso do coágulo de fibrina, é uma resposta normal a lesão vascular, para evitar o comprometimento do normal fluxo sanguíneo. Este processo é caracterizado pela conversão do plasminogênio em plasmina, a partir de activadores da parede vascular (via Intrínseca) ou dos tecidos (via Extrínseca). O activador do plasminogênio (TPA) é uma serina-protease que se liga à fibrina aumentando a capacidade de converter o plasminogênio ligado ao trombo (coágulo) em plasmina. A plasmina é capaz de degradar fibrinogénio, fibrina, factores V e VIII e outras proteínas, e é inibida pela  $\alpha_2$ -antiplasmina e  $\alpha_2$ -macroglobina.

A proteína C quando activada estimula a fibrinólise através da destruição dos inibidores plasmáticos do TPA. Os produtos de degradação oriundos da fibrinólise também são inibidores da trombina e da polimerização da fibrina. Todavia, a trombina inibe a fibrinólise por activar o inibidor de fibrinólise por trombina (TAFI), que impede a ligação do plasminogênio ao coágulo de fibrina (17).

Os principais parâmetros de avaliação da Hemostase e Coagulação são:

– **Tempo de Protrombina (TP):** mede o tempo de coagulação do plasma com citrato de sódio (amostra), na presença de uma concentração óptima de extracto de tecido (Tromboplastina) ou factor tecidual (sintético), lipídios e cálcio. Este parâmetro permite avaliar a eficiência global do sistema de coagulação Extrínseco, nomeadamente os factores VII, X, V, protrombina II e fibrinogénio. Além disso, é utilizado para avaliar o funcionamento da síntese hepática, sendo um marcador importante para doença hepática aguda, e para monitorizar terapias anticoagulantes à base de varfarina. O tempo normal para a coagulação é de 10 a 16 segundos, e além deste tempo é calculado o tempo em segundos ou em percentagem de actividade em comparação com um controlo. E pode ser expresso como Razão Normalizada Internacional (INR) (17).

– **Razão Normalizada Internacional (INR):** é uma razão entre o TP do doente e o TP do controlo elevado ao Índice de Sensibilidade Internacional (ISI). O ISI é determinado ao comparar cada reagente com Tromboplastina padrão, e foi instituído pela Organização Mundial de Saúde (OMS) com o objectivo de padronizar o controlo do tratamento com anticoagulantes. É um parâmetro importante para avaliar a eficácia da terapêutica com anticoagulante. O valor normal está entre 0,9 a 1 sem a terapêutica, e 2 a 3 com a terapêutica (17, 25, 26).

$$\text{INR} = \left( \frac{\text{TP (doente)}}{\text{TP (controlo)}} \right)^{\text{ISI}}$$

– **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT):** avalia os factores VIII, IX, XI e XII (via Intrínseca), além dos factores X, V, protrombina e fibrinogénio, e é utilizada principalmente para monitorizar terapias com coagulantes à base de heparina. Nesta determinação são adicionadas ao plasma citratado três substâncias nomeadamente o fosfolípido substituto de plaquetas, um activador de superfície e o cloreto de cálcio. O tempo normal para a coagulação é de 26 a 40 segundos (17). O teste mede o tempo de coagulação do plasma depois da activação dos factores de contacto e da adição do fosfolípido e CaCl<sub>2</sub>, mas sem adição de tromboplastina tecidual.

– **Fibrinogénio:** é uma globulina sintetizada no fígado cuja função é formar um coágulo de fibrina quando activada por trombina, por conseguinte, o fibrinogénio é praticamente todo removido no processo de coagulação e não é visto no soro.

O fibrinogénio é determinado pelo ensaio cronométrico de Clauss onde o fibrinogénio do plasma sanguíneo com citrato (amostra) é convertido em fibrina pela acção da trombina. A concentração de fibrinogénio é inversamente proporcional ao tempo necessário para formar um coágulo após a adição de trombina, sendo o intervalo de referência é entre 150 a 400mg/dl.

O fibrinogénio é uma glicoproteína de fase aguda que está significativamente aumentado no plasma durante um processo inflamatório. Os níveis de fibrinogénio também aumentam com a gravidez e o uso de contraceptivos orais (estrogénios). Valores diminuídos em geral reflectem extensa coagulação, durante o qual o fibrinogénio é consumido, como em casos de afibrinogenemia e na terapêutica com fibrinolíticos. A disfibrinogenemia geralmente é clinicamente silenciosa e causa excesso de hemorragia (27, 28).

As principais alterações dos parâmetros de avaliação da Hemostase e Coagulação, com maior relevância clínica, estão relacionados pelos seus prolongamentos, e podem ser observadas em algumas patologias ou com a utilização de alguns medicamentos, estão sumariadas na Tabela VI. Os intervalos de referência para estes parâmetros analíticos estão no Anexo II do relatório.

**Tabela VI:** Alterações dos parâmetros de Hemostase e Coagulação (17, 29).

Parâmetros	Anomalias indicadas pelo prolongamento	Causas mais comum
TP	Défice ou inibição de um ou mais factores de coagulação: VII, X, V, II, fibrinogénio	- Doença hepática (icterícia obstrutiva) - Tratamento com varfarina - Coagulação intravascular disseminada (CID) - Deficiência de vitamina K

APTT	Défice ou inibição de um ou mais factores de coagulação: XII, XI, IX, VIII, X, V, II, fibrinogénio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coagulação intravascular disseminada</li> <li>- Doença hepática</li> <li>- Tratamento com heparina</li> <li>- Hemofilia A (VIII) e B (IX)</li> <li>- Doença de Willebrand (FVW)</li> </ul>
Doseamento do Fibrinogénio	Deficiência de fibrinogénio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doença hepática aguda</li> <li>- Coagulação intravascular disseminada</li> </ul>

### 5.2.5 IMUNOHEMATOLOGIA

A imunohematologia realizada no Laboratório do CSMC é relativa a determinação dos Sistemas ABO e Rh, os quais são úteis na identificação da tipagem sanguínea, e também para prevenir possíveis incompatibilidades sanguíneas durante uma transfusão, ou uma gravidez se a mãe for Rh negativo. A seguir estão descritas a definição e importância clínica destes sistemas.

#### a) Sistema ABO

O sistema ABO consiste em um conjunto de antígenos A,B que estão presentes na maioria das células do organismo, incluindo eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Estes antígenos são glicoproteínas expressas principalmente nas células vermelhas do sangue. A distinção entre os grupos A e B ocorre pela diferença que existe nos resíduos terminais de açúcar (polissacarídeo) presentes nos antígenos A e B (30).

Um indivíduo desprovido de um ou ambos destes antígenos irá desenvolver anticorpos séricos para o antígeno ausente (s). Indivíduos tipo O apresentam anticorpos anti-A e Anti-B, pois não possuem antígenos A nem B nas suas células, no entanto, os que são do tipo A tem anticorpos anti- B, e os que são do tipo B tem anticorpos anti-A, e os que são do tipo AB não apresentam anticorpos, pois possuem antígenos A e B (31).

Anticorpos naturais contra antígenos A ou B, geralmente da classe IgM, são encontrados no plasma de indivíduos cujos eritrócitos não possuem o(s) antígeno correspondente(s) e que nunca tiveram contacto com ele, por meio de transfusão ou gestações prévias. No entanto, em resposta à introdução (por transfusão ou passagem por meio da placenta durante a gravidez) de eritrócitos que possuem antígeno que falta no indivíduo formam-se anticorpos contra estes antígenos, que são designados por anticorpos imunes. Estes anticorpos imunes geralmente são IgG, embora IgM pode ser formado, normalmente na fase inicial da resposta imunológica. Apenas anticorpos IgG atravessam a

placenta da mãe para o feto, dos quais o anticorpo anti-antígeno Rh (anti-D) é o mais importante (30).

A determinação destes grupos sanguíneos é essencial na transfusão sanguínea, no transplante de órgãos, e para evitar a reacção transfusional ou prevenir incompatibilidade sanguínea que pode levar a morte. Na Tabela VII apresentam-se os principais fenótipos ABO (30, 31).

**Tabela VII:** Fenotipagem do Sistema ABO (31).

<b>Tipo de sangue</b>	<b>Antígenos eritrocitários</b>	<b>Anticorpos</b>
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	-
O	-	Anti-A e Anti- B

#### **b) Sistema Rhesus (Rh)**

É denominado de sistema Rhesus (Rh) ou grupo Rh, composto por dois genes estruturais relacionados, RhD e RhCE, que codificam glicoproteínas membranares que constituem antígenos D, Cc e Ee. O gene RhD pode estar presente ou ausente, resultando em fenótipos RhD+ e RhD- nos eritrócitos. Anticorpos Rh raramente ocorrem de forma natural, isto é, resultam de transfusão ou gestação anterior. Sua importância clínica é para indivíduos D negativos que são estimulados para ter anticorpos anti-D, quando entram em contacto com o sangue de indivíduos D positivos. Por exemplo, no caso de mulheres grávidas, se houver exposição a células sanguíneas fetais D positivas, pode-se desencadear um processo de incompatibilidade sanguínea. Os antígenos D são responsáveis pela maior parte dos problemas clínicos associados ao sistema Rh, e uma subdivisão simples dos indivíduos em Rh D+ e Rh D-, e a utilização de soro anti-D, é suficiente para os fins clínicos e a prevenção de doenças hemolíticas do recém-nascido (30).

## **6. SECTOR IMUNOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA**

No Laboratório do CSMC os sectores de Imunologia e Endocrinologia estão interligados, e os mesmos equipamentos medem tanto parâmetros imunológicos como parâmetros endócrinos, os quais estão indicados na Tabela VIII. No decorrer desta secção serão aprofundados os fundamentos dos equipamentos e dos ensaios e os intervalos de referência são apresentados no Anexo III do relatório.

**Tabela VIII:** Produtos biológicos, equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos determinados no sector de Imunologia e Endocrinologia.

Produto biológico	Equipamento	Metodologia	Parâmetro Analítico
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 da Abbott Diagnostics  Figura 12	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA)  Não competitivo ou sandwich	Ac. Anti Tg, Ac. Anti TPO, TSH, Ac. Anti HAV (IgG e IgM), AgHBs, AgHBe, Ac. Anti HBc IgM, Ac. Anti HBc total, Ac. Anti HBe, Ac. Anti HBs, Ac. Anti HCV, Ac. Anti HIV1/2, Sífilis TP PSA (total e livre)
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Architec Ci 8200 da Abbott Diagnostics	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA)  Competitivo	T3 livre e total, T4 livre e total, Vitamina B12, Ácido Fólico
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux year 2000  Figura 13	Método Imunoenzimático sandwich em 2 etapas com detecção final por fluorescência	CEA, CA 19.9
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux year 2000	Método Imunoenzimático sandwich com detecção final por fluorescência	FSH, $\beta$ HCG
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux year 2000	Método Imunoenzimático por competição com detecção final por fluorescência	Progesterona, Testosterona
Sangue (Soro) sem anticoagulante	Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux year 2000	Método Imunoenzimático por competição com detecção final por fluorescência	Cortisol
Urina	Manualmente	Método	Teste imunológico de

		Imunocromatográfico	Gravidez
Fezes	Manualmente	Método Imunocromatográfico	Pesquisa de sangue oculto nas fezes



Figura 12: Architect ci8200 da Abbott Diagnostics.



Figura 13: Vitek Systems mini VIDAS bio-Mérieux.

## 6.1 METODOLOGIA E EQUIPAMENTOS USADOS NO SECTOR DE IMUNOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA

### 6.1.1 Determinação dos parâmetros analíticos por Quimioluminescência

O equipamento Architect ci8200 da Abbott Diagnostics efectua imunoensaios de micropartículas por **Quimioluminescência**. Os imunoensaios têm por base a reacção de um antigénio com um anticorpo específico para esse antigénio. A detecção e quantificação dos complexos antigénio-anticorpo que se formam no decorrer da reacção são neste caso efectuadas por detecção de quimioluminescência.

A Quimioluminescência é a emissão de luz quando um electrão retorna de um nível excitado ou superior de energia a um nível energético mais baixo. O evento excitatório é causado por uma reacção química e envolve a oxidação de um composto orgânico, como luminol, isoluminol e vários outros. A luz é emitida a partir de um produto excitado, formado pela reacção de oxidação (32). Estas reacções ocorrem na presença de catalisadores, tais como enzimas (fosfatase alcalina, microperoxidase), iões metálicos e hemina. Estes ensaios são ultra-sensíveis (limites de detecção de attomole ( $10^{-18}$ ) a zeptomole ( $10^{-21}$ )), apresentando uma faixa dinâmica ampla (33, 34).

As micropartículas são revestidas com anticorpos anti-analito e utilizadas como fase sólida. A amostra é incubada com a fosfatase alcalina (ligada ao anticorpo secundário) e as micropartículas ligada à fase sólida, para ocorrer a reacção antigénio-anticorpo, e a seguir o substrato é adicionado e o produto é medido pela emissão da luz. A emissão de luz ocorre

quando o substrato quimioluminescente reage com a fosfatase alcalina ligada à micropartícula. Esta metodologia é análoga ao método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), onde os ensaios para pesquisar antígenos podem ser do tipo competitivo ou não competitivo, referidos abaixo (34).

### **6.1.2 Determinação dos parâmetros analíticos por *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA)**

A metodologia *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) é aplicável a diversas análises e consiste na combinação do método ELISA com uma leitura final de fluorescência. O método ELISA é uma análise qualitativa e/ou quantitativa que se baseia na reacção entre um anticorpo e antígeno específico desse anticorpo, na qual um dos componentes da reacção se encontra adsorvido à superfície de uma fase sólida, formando imunocomplexos possíveis de detectar graças à utilização de um anticorpo secundário conjugado com uma enzima. Após a adição de um substrato adequado é detectado o produto de reacção o qual é proporcional aos imunocomplexos formados no decorrer do ensaio.

A enzima utilizada pelo equipamento Vitek Systems mini VIDAS bio Mérieux no ensaio ELFA é a fosfatase alcalina. A reacção ocorre da mesma forma que no método ELISA (imunoensaio competitivo ou não competitivo), todavia, a enzima do conjugado catalisa a reacção de hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferilfosfato (4-MUP) em 4-metil-umbeliferona (4-MU), o qual apresenta propriedade de emitir a luz a 450nm após excitação a 370nm. O produto desta reacção é quantificado através da determinação da fluorescência, e é proporcional à concentração dos determinantes antígenos (34).

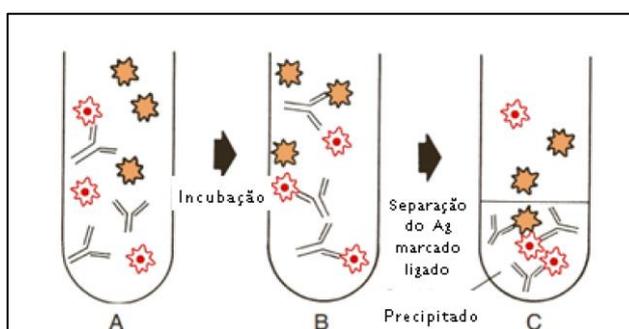
O equipamento mini Vidas apresenta cones que servem tanto de superfície sólida como de apoio para a pipetagem e, além disso, nas barretes encontram-se os reagentes impregnados, o que evita contaminações e facilita o bom funcionamento da reacção. Os imunoensaios aplicados podem ser:

#### **– Imunoensaio Competitivo**

Este método é usado para detectar um determinado antígeno numa amostra. Baseia-se numa competição entre o antígeno marcado e o antígeno não marcado (presente na amostra) pela ligação com o anticorpo durante um período de incubação. Isto pode ocorrer de forma simultânea e sequencialmente quando todos os reagentes são adicionados. No ensaio competitivo simultâneo (ver Figura 14) o antígeno marcado e o antígeno não

marcado competem pela ligação com o anticorpo durante um período de incubação. Neste ensaio o anticorpo deve ter a mesma avidéz pelos antígenos (marcado e não marcado), além disso, a probabilidade do anticorpo se ligar ao antígeno marcado é inversamente proporcional a concentração de antígeno não marcado.

No ensaio competitivo sequencial, primeiramente, o antígeno não marcado é incubado com o anticorpo em excesso, permitindo sua ligação até que se alcance o equilíbrio. O antígeno marcado é então adicionado sequencialmente. Passado o período de incubação, o antígeno marcado ligado ao anticorpo é medido e utilizado para calcular a concentração de antígeno não marcado (6).



**Figura 14:** Imunoensaio competitivo simultâneo (competição entre Ag marcado e o Ag não marcado pela ligação com o anticorpo) (34).

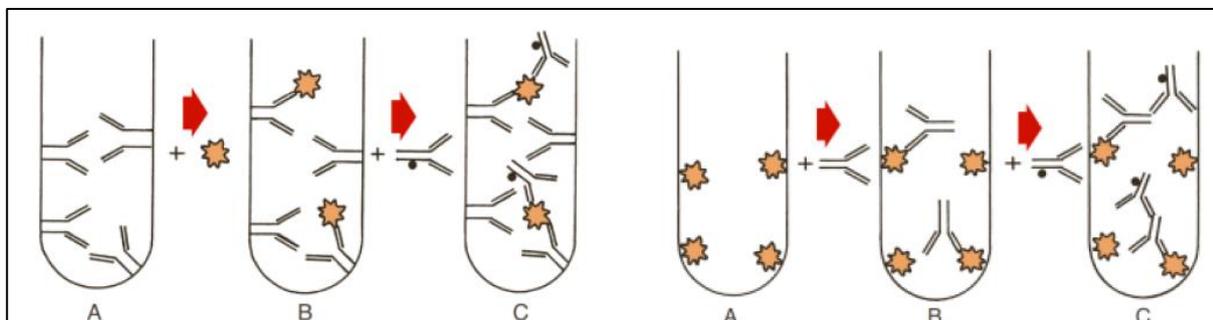
#### – Imunoensaio não Competitivo ou sandwich

Neste ensaio para detectar um antígeno (presente na amostra), um anticorpo específico para o antígeno é imobilizado sobre uma superfície sólida (ver Figura 15). A amostra é incubada com o anticorpo imobilizado. Após a lavagem desta superfície, é adicionado um segundo anticorpo específico para um outro epítipo do antígeno. Este segundo anticorpo está conjugado com uma enzima. Depois é realizada outra lavagem para que o segundo anticorpo conjugado não ligado (livre) seja removido, e em seguida é adicionado um substrato da enzima e é determinado o produto da reacção enzimática cuja concentração é directamente proporcional à concentração de Ag específico da amostra (34).

#### – Imunoensaio indirecto

Para a detecção de um anticorpo (presente na amostra), o antígeno é imobilizado sobre uma superfície sólida (ver Figura 15). A amostra é adicionada para reagir com o antígeno imobilizado. A seguir, é feita uma lavagem e adicionado o anticorpo secundário marcado com uma enzima (anticorpo conjugado) que vai reagir com o anticorpo primário

que está ligado ao antígeno. Neste caso, a quantidade de Ac conjugado ligado é directamente proporcional à quantidade de Ac específico da amostra. Neste ensaio é necessário utilizar excesso de anticorpo conjugado para assegurar que a reacção não seja limitada (6, 34).



**Figura 15:** Imunoensaio não competitivo: Detecção do Ag (A,B,C) e Imunoensaio indirecto: Detecção do anticorpo (A,B,C), respectivamente (34).

### 6.1.3 Determinação dos parâmetros analíticos por Imunocromatografia

A pesquisa de sangue oculto nas fezes e o teste de gravidez são determinados pelo **método Imunocromatográfico** que consiste numa reacção antígeno-anticorpo, onde o antígeno está presente na amostra e o anticorpo está integrado à superfície de uma matriz porosa. Quando a amostra do paciente é adicionada à matriz, o analito de interesse se liga ao anticorpo e movem-se ao longo da matriz por capilaridade, migrando até ao local onde está adsorvido um segundo anticorpo conjugado, e o mesmo liga-se ao primeiro anticorpo ligado ao antígeno presente na amostra formando um complexo “sandwich”. Se o teste for positivo observa-se a presença de uma coloração na região teste e na região controlo, se for negativo não há coloração na região teste e apenas a linha na região controlo fica corada (35, 36).

## 6.2 FUNDAMENTO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS E ENDÓCRINOS

No que diz respeito aos ensaios imunológicos e endócrinos, considera-se que são de suma importância, pois auxiliam o prognóstico, o diagnóstico e a monitorização da terapêutica. A seguir, o fundamento destes ensaios é descrito de forma detalhada.

### 6.2.1 SEROLOGIA DE INFECÇÕES VIRAIS

A serologia de infecções virais realizada no Laboratório do CSMC é abordada abaixo.

## – Hepatite A

A hepatite A, é causada pelo vírus da hepatite A. A transmissão é pela via fecal-oral através da ingestão de água e alimentos (mariscos crus, saladas, frutas) contaminados. Esta doença nunca evolui para fase crônica, e raramente causa mortalidade. Os sintomas ocorrem bruscamente de 15 a 50 dias após a exposição e intensificam-se 4 a 6 dias antes da fase icterícia (icterícia). Os sintomas iniciais incluem febre, fadiga, náusea, perda de apetite, e dor abdominal. A urina fica escura (bilirrubinúria) e as fezes claras, e, em seguida, a icterícia pode ser acompanhada de dor abdominal e prurido. A icterícia é observada em 70% a 80% de adultos, mas em apenas 10% das crianças (<6 anos de idade). Os sintomas associados são mais comuns em adultos do que em crianças, e geralmente diminuem durante o período de icterícia. (37).

O diagnóstico de infecção por HAV é geralmente feito com a base nos sintomas clínicos, na identificação de uma fonte infectada conhecida, e mais precisamente, pelos resultados gerados pelos testes serológicos específicos. Na infecção aguda por HAV são encontrados anticorpos de imunoglobulina M (IgM) HAV (anti-HAV IgM), ou seja, aparecem no início da doença clínica e depois tornam-se indetectáveis por volta de 3-6 meses. Os anticorpos IgG (IgG anti-HAV) são detectados logo após o aparecimento dos anticorpos (anti-HAV IgM), e persistem por alguns anos após a infecção, conferindo imunidade ao longo da vida.

A vacinação como forma de prevenção proporcionou a longo prazo imunidade contra a infecção por HAV, reduzindo significativamente a incidência da doença a nível mundial (38).

## – Hepatite B

A hepatite B é uma infecção causada pelo vírus da hepatite B (HBV), pertencente a família Hepadnaviridae. O HBV é transmitido por três vias principais que são a parenteral, a perinatal e o contacto sexual, e apresenta no seu genoma viral o gene que codifica para o antígeno da superfície ou envelope viral (AgHBs), o antígeno que constitui a cápside sendo específico do núcleo central *core* (AgHBc) e o antígeno “e” também ligado ao núcleo (AgHBe). Contudo, os anticorpos dirigidos contra estes antígenos são: anti-HBs, o anti-HBc (IgM e IgG) e o anti-HBe.

Os marcadores clínicos de infecção por HBV são AgHBs, anti-HBc e anti-HBs, e normalmente são utilizados para diferenciar os estádios da doença (aguda, crônica e

resolvida). Os AgHBe e anti-HBe são utilizados como triagem para a monitorização de pacientes com infecção crônica. No entanto, o AgHBc não pode ser detectado no plasma dos doentes com hepatite ou doadores de sangue, porque este antigénio está presente nos núcleos de hepatócitos durante a infecção aguda com HBV. O perfil serológico da doença aguda e a interpretação clínica podem ser observados na Figura 16 e na Tabela IX (37, 38).

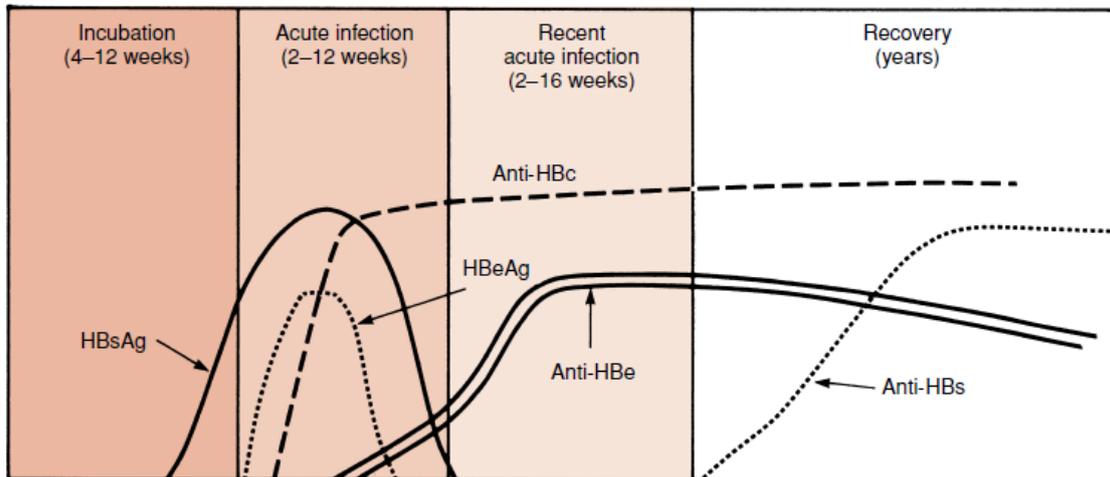


Figura 16: Perfil serológico da Hepatite B aguda (38).

**Tabela IX:** Reactividade dos marcadores serológicos e o estado da infecção provocada pelo HBV (37).

Marcadores Serológicos	Estado da infecção					Estado Saudável	
	Estadio precoce	Aguda precoce	Aguda	Crônica	Aguda tardia	Resolvida	Vacinação
Vírus HBV	+	+	+	+	+	-	-
AgHBs	+	+	+	+	+	-	-
AgHBe	-	+	+	+	-	-	-
Anti-HBs	-	-	-	-	-	+	+
Anti-HBe	-	-	-	-	+/-	+/-	-
Anti-HBc Total	+/-	+	+	+	+	+	-
Anti-HBc IgM	+/-	+	+	-	+	-	-

## – Hepatite C

Hepatite C é causada pelo vírus HCV pertencente a família Flaviviridae. O vírus da hepatite C (HCV) é transmitido principalmente de forma parenteral (transfusões sanguíneas, uso de agulhas contaminadas), embora também possa ser transmitido por contacto sexual e vertical (mãe para filho). Cerca de 3% da população mundial está infectada pelo vírus, normalmente é assintomático ou apresenta sintomas ligeiros não específicos como fadiga, náuseas, fraqueza. Além disso, é considerada como a principal causa de doença hepática crônica, cirrose, carcinoma hepatocelular, transplante de fígado e morte.

O HCV pode apresentar os seguintes perfis clínicos: hepatite aguda com resolução da infecção e da hepatite; infecção crónica persistente com possível progressão para hepatite crónica; e rápida progressão para a cirrose. A progressão para a cirrose é acelerada pelo abuso da ingestão de álcool, por co-infecção com HIV e outros factores.

Os ensaios laboratoriais utilizados na prática clínica detectam anticorpos anti-HCV ou métodos de detecção do RNA genómico (indicativo de infecção ativa). Estes anticorpos geralmente não aparecem nos primeiros meses de infecção, porém está quase sempre presente nas fases posteriores. O anticorpo não confere imunidade contra a reinfecção e, por vezes desaparece depois de vários anos após a resolução da infecção (37).

## – Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2)

O HIV pertencente a família Retroviridae, é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O HIV-1 apresenta uma distribuição mundial, o HIV-2 é encontrado predominantemente na África Ocidental.

A transmissão do HIV-1 ocorre pelo contacto directo com fluidos biológicos infectados, principalmente através do contacto sexual, exposição a sangue ou produtos sanguíneos infectados (via parenteral) e vertical de mãe para filho (gravidez, parto ou amamentação). Este vírus apresenta tropismo para as células T CD4. Ao infectar as células do sistema imunitário, destroem ou prejudicam a sua função. A progressão da infecção, torna o sistema imunitário mais fraco, e a pessoa torna-se mais susceptível a outras infecções oportunistas (vírus e parasitas). Os sintomas iniciais seguintes a infecção por HIV (fase aguda, 2 a 4 semanas após a infecção) assemelham-se aos da gripe ou mononucleose infecciosa, com meningite "asséptica" ou uma erupção cutânea que ocorre até 3 meses após a infecção. Estes sintomas desaparecem espontaneamente após 2 a 3 semanas, e são

seguidos por um período de infecção assintomática ou uma linfadenopatia generalizada persistente que pode durar vários anos. Durante este período, o vírus está a replicar nos gânglios linfáticos.

O estágio mais avançado da infecção pelo HIV é nomeado SIDA o qual é evidenciado por uma imunodeficiência profunda, sendo manifestada de várias formas diferentes, incluindo linfadenopatia e febre, infecções oportunistas, doenças malignas e demência relacionada com a SIDA. O serodiagnóstico é feito pela detecção de anticorpos anti-HIV. A terapêutica com medicamentos anti-retrovirais retarda o processo da evolução da doença (39).

## 6.2.2 SEROLOGIA DE INFECÇÃO BACTERIANA

A seguir é referido o curso clínico e a forma de detecção para a identificação do agente causador da Sífilis.

### – Sífilis

A sífilis é encontrada em todo o mundo, sendo o Homem o único hospedeiro. Globalmente, a incidência da doença tem diminuído com a antibioterapia. O agente causador desta doença é a espiroqueta *Treponema pallidum*. O curso clínico da sífilis evolui em três fases: a fase inicial ou primária é caracterizada por uma ou mais lesões cutâneas (cancro duro) no local onde a espiroqueta foi inoculada, e ocorre a multiplicação da bactéria. Considerado um período contagioso, a lesão desenvolve-se entre 10 a 90 dias após a infecção inicial e começa com uma pápula, mas em seguida, tornar-se uma úlcera indolor com bordas elevadas. Na fase secundária, os sinais e sintomas clínicos (linfadenopatia, mialgias, febre) aparecem de forma disseminada, com lesões cutâneas proeminentes dispersas ao longo de toda a superfície do corpo e noutros tecidos. Caracteriza-se por ser uma fase muito contagiosa. A remissão espontânea pode ocorrer após as fases primária ou secundária, ou a doença pode progredir para a fase final, em que praticamente todos os tecidos podem estar envolvidos. A fase final geralmente ocorre durante anos após a infecção, onde as lesões podem ser graves consoante o órgão atingido pela fase anterior. Além disso, é possível causar uma destruição devastadora em qualquer órgão ou tecido (por exemplo, artrite, demência, cegueira), lesões granulomatosas encontradas no osso, pele e outros tecidos.

A forma mais comum de propagação é por contacto sexual. A doença também pode ser adquirida ou congénita por contacto com sangue contaminado. O contágio é influenciado

pelas fases infecciosas da doença em que a pessoa se encontra. Assim, o *T. pallidum* é transferido principalmente durante as fases iniciais da doença, quando muitos organismos estão presentes nas lesões cutâneas ou das mucosas.

O teste utilizado no Centro de Saúde Militar é o *Syphilis TP (Treponema pallidum)* que identifica a presença de anticorpos anti-TP no soro do doente. Estes anticorpos são produzidos contra lípidos da superfície celular de *Treponema pallidum* e lípidos das células infectadas do hospedeiro durante a fase precoce da doença. É considerado um teste serológico não treponêmico (qualitativo) aplicado quando há suspeita de Sífilis e para monitorização da eficácia da terapêutica, portanto, quando há reactividade positiva é feita uma confirmação com um teste treponêmico (específico) (40).

### **6.2.3 MARCADORES DE ANEMIA**

Os marcadores de anemia determinados neste sector são:

#### **– Ácido fólico**

O principal sintoma clínico da deficiência de folato ou Ácido fólico é anemia megaloblástica. Índices químicos de deficiência são, em ordem de ocorrência, folato sérico baixo, hipersegmentação de neutrófilos, folato dos eritrócitos baixos, macro-ovalócitos, medula megaloblástica e anemia. Além disso, a deficiência de folato pode estar associada ao alcoolismo, à síndrome de má-absorção, à doença hepática, à hemodiálise crónica e à anemia megaloblástica.

A exigência de folato é aumentada durante a gravidez e especialmente durante a lactação, porque a suplementação dietética de ácido fólico em mulheres grávidas reduz a incidência de defeitos neurológicos fetais. Outros exemplos de exigência aumentada de folato incluem a anemia hemolítica, a deficiência de ferro, a prematuridade e o mieloma múltiplo. Certos fármacos (anticonvulsivantes, sulfassalazina) interferem com o metabolismo do folato levando a baixos níveis de folato sérico. Os valores de referência no soro são 7-46 nmol/mL e no eritrócito são 130-630 ng/mL (41).

#### **– Vitamina B12**

A vitamina B12 (cobalamina) faz parte de um grande grupo de compostos contendo cobalto. A absorção intestinal da vitamina B12 ocorre no íleo e é mediada por uma única proteína de ligação chamada de factor intrínseco, que é segregada pelo estômago. Esta

vitamina participa como coenzima nas reacções enzimáticas necessárias para a hematopoiese e o metabolismo dos ácidos gordos.

As fontes alimentares primárias de vitamina B12 são os produtos de origem animal (carne, ovos, e leite). Portanto, dadas as dietas vegetarianas são susceptíveis de ser deficientes ou pobres em vitamina B12. A média diária da dieta contém 3-30g de vitamina B12, dos quais 1-5g é absorvida. A sua carência tende a aumentar com a idade, ocorrendo em mais de 0,5% dos idosos de 60 anos de idade, embora os sintomas resultantes da deficiência dietética sejam raros. A deficiência desta vitamina está associada a patologias como anemia megaloblástica, anemia perniciosa e a distúrbios neurológicos.

A anemia perniciosa é aplicada a deficiência de vitamina B12 resultante do déficit do factor intrínseco, geralmente isto ocorre devido a presença de anticorpos contra o factor intrínseco e as células parietais. Por sua vez, os pacientes não podem absorver a vitamina B12 apresentando baixos níveis no sangue e na urina (41).

#### **6.2.4 MARCADORES TUMORAIS**

A definição e importância clínica dos marcadores tumorais são referidas a seguir.

##### **– Antigénio carcinoembrionário (CEA)**

O CEA é uma glicoproteína, e a sua utilização clínica é um marcador tumoral de cancro colorrectal, e também frequentemente apresenta níveis séricos elevados em tumores do pulmão, da mama e gastrointestinais. Este marcador pode ser usado para ajudar no diagnóstico, no prognóstico, e na vigilância pós-cirúrgica e também para monitorizar a terapia e resposta à quimioterapia do cancro colorrectal.

Embora os níveis elevados da CEA (10ng/mL) sejam geralmente associados com a malignidade, eles são inespecíficos para o cancro colorrectal, logo não é útil para o rastreio. Semelhante a outros marcadores tumorais serológicos, o CEA pode estar elevado de forma não específica, devido a uma deficiente eliminação ou aumento da sua produção, como em casos de pacientes com danos no fígado que apresentam uma clearance prolongada.

Concentrações aumentadas deste parâmetro também foram observadas em fumadores e, em alguns pacientes após o tratamento de radiação e quimioterapia. O intervalo de referência para os valores de CEA séricos depende do ensaio aplicado (42).

## – CA 19-9

O CA 19-9 é um glicolípido marcador de carcinoma pancreático e colorretal. Esse marcador é sintetizado pelas células dos ductos pancreático e biliares humanos normais e pelos epitélios gástrico, do cólon, do endométrio e salivar.

A determinação de CA19-9 no soro auxilia na monitorização de pacientes diagnosticados com cancro pancreático que apresentam este marcador em concentração elevada. Além disso, também é útil para estabelecer o prognóstico no diagnóstico inicial. As concentrações séricas elevadas ou crescentes podem indicar recidiva 1 a 7 meses antes da detecção por radiografias ou achados clínicos (43).

## – Antígeno específico da próstata (PSA)

O PSA é uma glicoproteína (serina-protease) da família calicreína, que é produzida exclusivamente pelas células epiteliais dos ácinos e ductos da glândula da próstata e secretado no lúmen do ducto prostático e no fluido seminal. Em homens saudáveis, baixos níveis circulantes de PSA pode ser detectado no soro. Existem duas formas principais de PSA que se encontram na circulação sanguínea: PSA livre e PSA total. A maior parte do PSA circulante está ligado à  $\alpha$ 1-antiquimotripsina ou à  $\alpha$ 2-macroglobulina (43).

O PSA é determinado por quimoluminescência, com ensaio que detecta PSA livre e PSA ligado à  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, mas não à  $\alpha$ 2-macroglobulina. Os valores geralmente considerados normais para PSA total são até 4ng/mL, contudo, quando há pacientes que ultrapassam este limite são logo feitos doseamentos de PSA livre. Estes parâmetros corroboram para auxiliar quando há uma suspeita clínica de cancro, porém a biópsia e o exame rectal é mais contundente para a confirmação. Outros pacientes com níveis elevados são seguidos de perto ao longo da vida.

As aplicações clínicas do doseamento de PSA incluem a monitorização da progressão do cancro da próstata, a detecção precoce das recidivas e a avaliação da eficácia do tratamento. Este tratamento inclui prostatectomia radical, radioterapia e terapia com antiandrogenio. Diante de uma prostatectomia radical o PSA no soro deve tornar-se indetectável, se o cancro estiver localizado (42).

#### – **Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**

A hCG é uma hormona secretada normalmente pelos trofoblastos na placenta para manter o corpo lúteo durante a gravidez. Esta hormona não é detectável no soro de indivíduos saudáveis. A subunidade Beta da Gonadotrofina Coriônica Humana ( $\beta$ hCG) possui diversas aplicações clínicas, em especial como um marcador tumoral. O tempo de meia vida é de 12 a 20hs (43).

É um indicador de prognóstico para o câncer do ovário, um marcador de diagnóstico para a classificação do cancro testicular, e é o mais útil para a detecção de gravidez, de doenças trofoblásticas, de coriocarcinoma e de tumores trofoblásticos no local da placenta, que são classificados pela história clínica, os resultados de exames de imagiologia, histologia, e os níveis de  $\beta$ hCG. Encontra-se elevado em tumores trofoblásticos, coriocarcinoma, e tumores de células germinativas dos ovários e testículos (42).

### **6.2.5 AVALIAÇÃO DA TIRÓIDE**

As hormonas da tiróide são conhecidas por desempenhar diversas funções no organismo, tais como: estimular o desenvolvimento neuronal, o crescimento corporal, promover a maturação sexual, estimular a actividade adrenérgica com aumento da frequência cardíaca e contratibilidade do miocárdio, estimular a síntese proteica e o metabolismo dos carboidratos, aumentar a síntese e degradação do colesterol e triglicéridos, aumentar a necessidade de vitaminas, elevar o metabolismo do cálcio e fósforo e acentuar a sensibilidade dos receptores adrenérgicos a catecolaminas. Esses efeitos estão tipicamente exacerbados nos pacientes com a tiróide hiperactiva, como no hipertiroidismo, ou estão reduzidos nos pacientes com uma tiróide pouco activa, como no hipotiroidismo.

A principal função destas hormonas consiste no controlo da taxa metabólica basal e na termogénese por meio do aumento de consumo de oxigénio nos tecidos. Além disso, actuam sobre o transporte da membrana (através da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, provocando o aumento da síntese e do consumo de adenosina trifosfato) e acentuam o metabolismo mitocondrial (estimulando a função mitocondrial e fosforilação oxidativa) (44). As hormonas doseadas são:

#### – **Hormona estimulante da Tiróide (TSH)**

O ensaio mais útil para avaliar a função da tiróide é o doseamento da TSH. Todos os ensaios são capazes de diagnosticar hipotiroidismo primário (doença da glândula tiróide ou a

baixa produção das hormonas da tiróide) com níveis elevados de TSH. Ensaios quimioluminescentes, com limites de detecção de 0,01 mU/L, são menos propensos a dar resultados falso-negativos e podem distinguir com precisão entre eutiroidismo e hipertiroidismo.

A determinação de TSH é geralmente utilizada para monitorizar e ajustar a hormona da tiróide como terapia de reposição, tanto para hipertiroidismo como para hipotiroidismo. A sensibilidade dos ensaios de TSH possibilitou a capacidade para detectar a fase subclínica da doença ou de um grau leve de disfunção da tiróide, devido a grande mudança nos níveis de TSH (valor elevado), mesmo com pequenas mudanças na T4 livre em casos como hipotiroidismo (hormonas T3 livre e T4 livre diminuídas). Da mesma forma, no hipertiroidismo, a TSH é minimamente aumentada, enquanto T3 livre e T4 livre estão aumentadas, ou seja, a TSH é suprimida, e as hormonas (T3 e T4) elevadas (45).

#### – Triiodotironina (T3) livre e Tiroxina (T4) livre

Uma vez secretada pela glândula tiróide, as hormonas da tiróide circulam na corrente sanguínea, onde T3 e T4 livre atravessam através da membrana celular. No citoplasma, T4 é desiodinado em T3, a forma hormonal activa da tiróide. A hormona T3 liga-se ao seu receptor nuclear localizado em genes sensíveis a hormonas da tiróide, levando a produção de RNA mensageiro que, por sua vez, leva à produção de proteínas que influenciam o metabolismo e desenvolvimento.

Clinicamente, os indivíduos que têm excesso hormonal da tiróide (tirotóxicose) terão sintomas de aumento do metabolismo como taquicardia e tremor, enquanto nos indivíduos com sintomas de hipotiroidismo é reduzido o metabolismo causando edema e constipação (45).

#### – T3 e T4 total

A determinação dos níveis de T3 e T4 totais no soro é feito por imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência do tipo competitivo. Mais de 99,9% das hormonas da tiróide estão ligadas às proteínas, e a alteração nas proteínas de ligação, independente destas hormonas, não está relacionada com doenças da tiróide. Esta alteração nas proteínas frequentemente origina níveis de T3 e T4 fora do intervalo normal. Devido a isto, os ensaios foram desenvolvidos para medir T3 e T4 livre, formas de hormona da tiróide biologicamente

activa, logo testes de T4 livre substituíram determinações T4 total a nível clínico, para facilitar a interpretação (45).

– **Anticorpos Anti-tireoglobulina (anti-Tg)**

O aumento das concentrações circulantes dos anticorpos antitiroideos é observado em várias doenças da tiróide, em outras doenças auto-imunes e em certas doenças malignas. Esses anticorpos são dirigidos contra vários antigénios da tiróide e da hormona da tiróide, incluindo a Tireoglobulina (Tg), a peroxidase tiroidiana, o receptor TSH (TRAbs) e, raramente, TSH, T3 e T4. Desses anticorpos, a antiperoxidase tiroidiana é a mais comumente utilizada na avaliação das doenças auto-imunes tiroidianas.

O Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência do tipo não competitivo (sandwich) é um dos métodos sensíveis e específicos para detectar anti-Tg, geralmente expressos em unidades por mililitros. São utilizados para acompanhar os pacientes com doenças tiroidianas auto-imunes.

A quantificação do anticorpo anti-Tg acrescenta pouca informação além da obtida por medição dos anticorpos anti-TPO para o diagnóstico de uma doença auto-imune tiroidiana. Entretanto, a determinação de anti-Tg no soro é necessária para identificar auto-anticorpos que podem interferir na quantificação de Tg sérica em pacientes encaminhados para o tratamento de carcinoma tiroideo. As determinações consecutivas de anti-Tg podem ser monitorizadas em utentes com câncer de tiróide, e os anticorpos anti-Tg detectáveis são considerados como um marcador de tumor substituto (44).

– **Anticorpos anti-peroxidase (anti-TPO)**

A anti-TPO é actualmente reconhecida como o principal e possivelmente único componente auto-antigénico dos microsomas tiróideos

. Os ensaios baseados na TPO são preferidos em uso clínico da rotina na triagem de utentes com suspeita de doenças auto-imunes tiroidianas. Estudos realizados ao longo do tempo sugerem que a presença de anti-TPO é um fator de risco para disfunção tiroidiana auto-imune. O intervalo de referência para os valores de anti-TPO sérico é <12UI/ml, em um Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência do tipo não competitivo (sandwich). Concentrações detectáveis de anti-TPO são observadas em quase todos os pacientes com tireoidite de Hashimoto e na maioria dos pacientes com doença de Graves (44).

## 6.2.6 HORMONAS DA FUNÇÃO GONODAL

Para a avaliação do funcionamento das gónadas são determinadas no CSMC as seguintes hormonas:

### – **Hormona estimulante do folículo (FSH)**

A hormona libertadora de gonadotrofina (GHRH) é a responsável pelo controlo da secreção de FSH e da Hormona Luteinizante (LH). A FSH atua principalmente em células estaminais germinais. A fase folicular começa com o início da menstruação e termina no dia do pico de LH. No início da fase folicular, o ovário segrega muito pouco estrogénio ou progesterona. Um aumento da FSH, no entanto, estimula a produção de estrogénio. O estrogénio segregado pelos folículos em desenvolvimento dentro do ovário estimula as células epiteliais uterinas, o crescimento dos vasos sanguíneos, e o desenvolvimento da glândula endometrial para aumentar a espessura do endométrio. A intensa capacidade secretória das glândulas uterinas fornece uma secreção que auxilia na implantação do embrião (46).

Causas como insuficiência hipofisária (tumor, drogas), hiperprolactinemia, anorexia em mulheres e a Síndrome de Kallman nos homens estão relacionadas ao hipogonadismo hipogonadotrófico, onde os valores de FSH e LH estão diminuídos. Entretanto, valores elevados de FSH e LH (hipogonadismo hipergonadotrófico) podem ser observados em mulheres com Síndrome de Turner, irregularidades menstruais (amenorreia), anovulação e menopausa e nos homens podem ser observados a disfunção erétil, a diminuição do libido, a hiperprolactinemia (tumor, drogas) (47).

### – **Progesterona**

A progesterona é um composto esteróide, produzida pelo corpo lúteo. Induz a actividade secretória preparando o endométrio para a implantação do embrião. Além disso, provoca efeitos como espessamento do muco cervical, redução das contracções uterinas, e termogénese, na qual a temperatura corporal basal aumenta depois ovulação. Este efeito tem uma utilidade clínica na marcação da ocorrência de ovulação. A progesterona é a hormona responsável pela fase luteal, e sua deficiência resulta na falha de implantação do embrião, e em alterações do ciclo menstrual. Sua determinação é importante para o diagnóstico e tratamento de patologias do ovário (46).

### – Testosterona total

A testosterona é uma hormona segregada predominantemente pelos testículos, e é controlada principalmente por duas hormonas hipofisárias: a hormona estimulante do folículo (FSH) e a hormona luteinizante (LH). É considerada a principal hormona androgénica no sangue. Cerca de 50% da testosterona está ligada à albumina, 45% está ligada à globulina de ligação da hormona sexual (SHBG), e 2% -3% se encontra livre.

A produção desta hormona promove o desenvolvimento dos órgãos genitais internos e externos e caracteres sexuais secundários. Além disso, também está associada ao crescimento esquelético linear, ao aumento da musculatura, ao desenvolvimento de laringe e cordas vocais, e alterações no humor.

A determinação da testosterona é realizada quando há suspeita de hipogonadismo (relacionado a diminuição da testosterona) nos homens e nas mulheres o aumento do nível sérico pode estar relacionado com tumores no ovário ou hiperplasia das glândulas adrenais (46).

## 6.2.7 HORMONA PRODUZIDA PELA GLÂNDULA SUPRA-RENAL

Um dos principais parâmetros que avaliam a eficiência da glândula supra-renal é descrito a seguir.

### – Cortisol

A produção de cortisol é regulada pela Hormona Adrenocorticotrófica (ACTH). Ele actua em muitos tecidos periféricos e em muitas reacções bioquímicas, incluindo regulação de hidratos de carbono, proteínas, e do metabolismo de lípidos. Esta hormona também tem propriedades antiinflamatórias e diminui a resposta imunológica.

Como em todos os sistemas endócrinos, as doenças podem resultar de uma hiperfunção ou hipofunção do referido precursor (neste caso a ACTH). As doenças podem ser consideradas primárias, conseqüentes da disfunção orgânica final, ou secundárias, que resultam da disfunção hipotalâmica ou pituitária. O distúrbio gera uma secreção desadequada ou insuficiente de aldosterona e cortisol. A falha na síntese de cortisol induz hipoglicemia como acontece na doença de Addison, onde o cortisol está diminuído e a ACTH elevada.

Em caso de stress agudo (físico e psicológico) a secreção de ACTH é estimulada directamente, fazendo com que os níveis de cortisol aumentem. O hipercortisolismo está

presente em patologias como na Síndrome de Cushing, em que a ACTH está diminuída e Doença de Cushing em que a ACTH está elevada, entre outras (48).

A presença de cortisol livre (e/ou metabolitos) na urina é um indicador sensível de hipercortisolémia. Quando cortisol sérico exceder a capacidade de ligação às proteínas, os níveis de cortisol livre tendem a subir rapidamente, aumentando o cortisol livre filtrado para a urina. Este valor pode ser falso quando há quantidade elevada de urina (3L), pois os pacientes que bebem mais de 5L/dia terão um aumento de 64% no cortisol urinário. Além disso, deve-se ter em conta durante a colheita das amostras que o cortisol e a ACTH apresentam um ritmo circadiano de secreções (49).

## 7. AUTOIMUNIDADE DA TIRÓIDE

Algumas doenças da glândula tiróide estão relacionadas com processos auto-ímenes. Na doença auto-imune da tiróide, os anticorpos são dirigidos a tecido tiroideo com respostas variáveis. A causa mais comum de hipertiroidismo é uma desordem auto-imune chamada doença de Graves. O anticorpo nesta condição é dirigido para o receptor de TSH e estimula o receptor, conduzindo ao crescimento da glândula da tiróide e a produção de quantidades excessivas de hormona da tiróide. Esta condição pode ser diagnosticada com ensaios que podem detectar anticorpos dirigidos ao receptor de TSH (TRAbs), que levam a estimulação deste receptor. Cerca de 70% - 100% dos pacientes com a doença de Graves apresentam positividade para estes anticorpos.

Na outra extremidade da doença auto-imune tem-se tireoidite linfocítica crónica vulgarmente conhecida como doença (tireoidite) de Hashimoto. Esta é a causa mais comum de hipotiroidismo desenvolvido no mundo. Nesta condição, os anticorpos são dirigidos a glândula tiróide levam à diminuição da produção da hormona da tiróide. A melhor determinação para essa condição é a quantificação do anticorpo contra a peroxidase da tiróide (TPO), que está presente em 10% - 15% da população em geral e 80% - 99% dos pacientes com hipotiroidismo auto-imune (45). A Tireoidite de Hashimoto é considerada uma desordem imunológica em que os linfócitos tornam-se sensibilizados pelos antigénios da tiróide, e os anticorpos formados reagem a esses antígenos. A patologia envolve uma infiltração de linfócitos sensibilizados que vão destruindo totalmente a arquitetura normal da tiróide. A destruição da glândula resulta em uma redução das hormonas T3 e T4 no soro e no aumento de TSH. Inicialmente, a TSH pode manter a síntese hormonal adequada pelo desenvolvimento do aumento da tiróide ou bócio, mas muitas vezes a glândula falha, e segue

o hipotiroidismo com ou sem bócio, ou seja, os doentes com ou sem bócio podem apresentar inicialmente uma função normal da tiróide (eutiroidismo) ou ter hipotiroidismo (50).

## 8. INTERPRETAÇÃO LABORATORIAL DE UM CASO CLÍNICO

Uma mulher de 26 anos com sensação de frio. O médico recomendou as seguintes análises reportadas na Tabela X.

**Tabela X:** Análises dos parâmetros da tiróide.

Análises	Resultados/Unidades	Valores de Referências
TSH	3,39 mUI/L	0,27 - 4,20
T3 Livre	130 ng/dL	60 - 151
T4 Livre	1,04 ng/dL	0,93 - 1,70
Anticorpos anti-Tg	2869,0 UI/ml	< 115
Anticorpos anti-TPO	320,1 UI/ml	< 34
Método: Electroquimioluminescência		

Depois da interpretação das análises o médico solicitou que fizesse uma ecografia da tiróide, e depois de ver a ecografia foi solicitado uma cintigrafia. A doente não refere nenhuma intervenção cirúrgica, nem terapêuticas radioactivas e nem história familiar de doenças auto-imune.

### Resultado da Ecografia:

O estudo ecográfico efectuado mostrou que a glândula da tiróide tem dimensões normais (lobo direito e esquerdo), contornos regulares e textura difusamente hipocogénica e heterogénea, com septos e múltiplos nódulos sólidos e hipocogénicos. Os nódulos com maiores dimensões medem no lobo direito 8mm e no lobo esquerdo 10mm. Alterações descritas são compatíveis com tiroidite auto-imune.

### Resultado da Cintigrafia:

No estudo efectuado a tiróide apresenta projecção cintigráfica dentro dos parâmetros da normalidade com uma intensidade de captação próxima dos limites

superiores da normalidade, ou mesmo ligeiramente aumentada, a valorizar com doseamentos da TSH.

A distribuição da actividade é, relativamente, homogénea, sem individualização de nódulos quentes ou frios de dimensões significativas. Os nódulos descritos na ecografia são funcionalmente incaracterizáveis devido às suas reduzidas dimensões.

Diante de todos os resultados, o médico recomendou que a doente fizesse a medicação com Levotiroxina sódica 0,05mg, e depois de 1 ano medicada voltou a fazer análises (ver Tabela XI) e a ecografia que permaneceu igual ao resultado anterior.

**Tabela XI:** Análises dos parâmetros da tiróide após um ano.

Análises	Resultados/Unidades	Valores de Referências
TSH	2,66 mUI/L	0,25 - 5
T3 Livre	4,61 pmol/l	4 – 8,3
T4 Livre	13,54 pmol/l	10,6 – 19,4
Anticorpos anti-Tg	26,5 UI/ml	< 18,0
Anticorpos anti-TPO	430,7 UI/ml	< 8,0
Método: ELFA		

### Interpretação dos Resultados

Diante dos resultados das análises a presença elevada de anticorpos anti-TPO e anti-Tg permite o diagnóstico de uma tiroidite auto-imune, ou seja, estes anticorpos são dirigidos contra a glândula da tiróide, podendo levar a diminuição das hormonas tiroideias (T3 e T4 livre). No entanto, esta doente apresenta os valores normais das hormonas tiroideias e TSH, mostrando o bom funcionamento da glândula da tiróide em resposta ao estímulo do eixo hipotalâmico-hipofisário, apesar da existência da tiroidite auto-imune, que posteriormente poderá evoluir para hipotiroidismo.

Após um ano, os valores permanecem dentro dos intervalos de referência, menos os anticorpos que continuam elevados apontando para a tiroidite de Hashimoto.

A ecografia e a cintigrafia corroboram para o diagnóstico, sendo essencial na identificação dos nódulos, que neste caso são vários, pequenos, incaracterizáveis e com contornos regulares que apontam para a benignidade, embora só a citologia tiroideia

pudesse dar uma indicação segura. A ecografia idêntica a anterior indica que não houve evolução ou crescimento dos nódulos, talvez por conta da terapêutica.

Portanto, a realização de todos estes procedimentos desde a suspeita clínica até os resultados obtidos são indispensáveis para o parecer de um diagnóstico precoce e fiável, pois podem esclarecer quadro clínico em que a doente se encontra, e actuar de maneira eficaz para o possível tratamento. No caso clínico em questão a doente deverá fazer análises anuais para acompanhar a progressão da doença, e ter atenção quando aparecer algum sinal ou sintoma clínico.

## 9. CONCLUSÃO

Finalmente, a concretização do estágio no laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra ofereceu-me um suporte imprescindível nos diversos sectores, que contribuiu para fomentar os estudos leccionados durante o Mestrado, adquirir experiência ao analisar os parâmetros analíticos com uma perspectiva clínica, e assim poder de facto actuar com mais responsabilidade e competência quando estiver inserida no mercado de trabalho.

É importante ressaltar que, o estágio também contribuiu para elucidar a importância do Especialista em Análises Clínicas na área da saúde. Considerando esta actuação indispensável, em virtude de contribuir com ferramentas necessárias e seguras para apoio ou esclarecimento ao prognóstico, diagnóstico, planeamento da terapêutica, bem como na monitorização da progressão de algumas doenças.

Concluo proferindo que não existe melhor satisfação do que poder cooperar com a vida, em especial o bem-estar das pessoas, isto é sem dúvida fascinante como profissional.

## BIBLIOGRAFIA

1. Marques R. *Hospital Militar de Coimbra 100 anos ao Serviço da Saúde Militar*, Bookpaperdesing. (2011), pp 7-8.
2. Klee G.G., Westgard J.O., *Quality Management*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 255-257.
3. Arosa, F.A., Cardoso, E.M., *Técnicas de Imunologia*. In Arosa, F.A., Cardoso, E.M., Pacheco, F.C. (Eds.) *Fundamentos de Imunologia*, Lidel, 2th Ed. (2012), pp 589-595.
4. Porter, E.E., *Point-of-Care Testing*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L.E., (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 219.
5. Lewis, S.M., *Miscellaneous tests*. In Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (Eds.) *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 9th Ed. (2001), pp 527-532.
6. Kricka L.J. et al., *Principles of immunochemical Techniques*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 155-170.
7. *Hematopoyesis: Mielopoyesis y Linfopoyesis*. Casas, S.W., Brichs, L.F. *La Citología Óptica en El Diagnóstico Hematológico*, Fundación Española de Hematología y Hemoterapia, 5th Ed. (2006), pp 1-4.
8. *Hematopoyesis: Mielopoyesis y Linfopoyesis*. In Casas, S.W., Brichs, L.F. *La Citología Óptica en El Diagnóstico Hematológico*, Fundación Española de Hematología y Hemoterapia, 5th Ed. (2006), pp 27-50.
9. *Hematopoiesis*. In Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 3.
10. Figura 10 acedido em: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HEMEHTML/HEME100.html>
11. *Erythropoiesis and general aspects of anaemia*. In Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 16-29.

12. Briggs, C., Bain, B.J., *Basic haematological techniques. In* Bain B.J., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. (Eds.) *Dacie And Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 11th Ed. (2012), pp 24-30.
13. Briggs, C., Bain, B.J., *Basic haematological techniques. In* Bain B.J., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. (Eds.) *Dacie And Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 11th Ed. (2012), pp 41-42.
14. Bain, B.J., *Blood cell morphology in health and disease. In* Bain B.J., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. (Eds.) *Dacie And Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 11th Ed. (2012), pp 71-87.
15. *The white cells 1: granulocytes, monocytes and their benign disorders. In* Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 109-125.
16. *The white cell 2: lymphocytes and their benign disorders. In* Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 127-141.
17. *Platelets, blood coagulation and haemostasis. In* Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 315-328.
18. *Bleeding disorders caused by vascular and platelet abnormalities. Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 334.
19. *Thrombosis and antithrombotic therapy. In* Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 368-369.
20. Dusse, L.M.S., Vieira, L.M., Carvalho, M.G., Pseudotrombocitopenia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40 (2004) 321-324.
21. Comar, S.R., Danchura, H.S.M., Silva, P.H., Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31 (2009) 431-436.
22. *Haematological changes in systemic disease. In* Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 394- 396.
23. Ferreira, C.N., Sousa, M.O., Dusse, L.M.S., Carvalho, M.G., O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 32 (2010) 416-421.

24. Figura 11 adaptado de: <http://medifoco.com.br/coagulacao-e-hemostasia-sanguinea-o-controle-do-sangramento/>
25. *Thrombosis and antithrombotic therapy.* In Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 375.
26. Laffan, M.A., Manning, R., *Laboratory control of anticoagulant thrombolytic and antiplatelet therapy.* In Bain B.J., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. (Eds.) *Dacie And Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 11<sup>th</sup> Ed. (2012), pp 470.
27. Tymchak, L.L., *Amino Acids and Proteins.* In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> edition (2010), pp 243-260.
28. Laffan, M.A., Manning, R., *Investigation of haemostasis.* In Bain B.J., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. (Eds.) *Dacie And Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 11<sup>th</sup> Ed. (2012), pp 412-413.
29. Laffan, M.A., Manning, R., *Investigation of haemostasis* In Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (Eds.) *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 9<sup>th</sup> Ed. (2001), pp 353-362.
30. *Blood transfusion.* In Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. *Essential Haematology*, Artmed, 6<sup>th</sup> Ed. (2013), pp 398-402.
31. *Antigen-Antibody Interactions.* In Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. *Kuby immunology*, W. H. Freeman and Company, 4<sup>th</sup> Ed. (2000), pp 153-161.
32. Drees, J.C., Wu, A.H.B., *Analytical Techniques.* In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> Ed. (2010), pp 140.
33. Kricka L.J. et al., *Optical Techniques.* In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6<sup>th</sup> Ed. (2008), pp 79-80.
34. Orton, S., *Immunoassays.* In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>th</sup> Ed. (2010), pp 185-200.

35. Drees, J.C., Wu, A.H.B., *Analytical Techniques*. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 164.
36. Price, C.P., et al., *Point-of-Care Testing*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 191-192.
37. *Hepatitis Viruses*. In Murray P.R., Rosenthal K. S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7th Edition (2013), pp 583-594.
38. Chiasera J.M., Xu, X., *Liver Function*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 525-535.
39. *Retroviruses*. In Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7th Edition (2013), pp 567-580.
40. *Treponema, Borrelia and Leptospira*. In Murray P.R., Rosenthal K. S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 7th Edition (2013), pp 350-355.
41. Gorman, L. S., Boosalis, M.G., *Nutritional Assessment*. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 661-664.
42. McCudden, C.R., Willis M. S., Boosalis, M.G., *Circulating Tumor Markers: Basic Concepts and Clinical Applications*. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 646-649.
43. Chan, D.W., et al., Tumor Markers. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 343-355.
44. Demers, L.M., et al., *Thyroid Disorders*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 766-774.

45. Grotzke, M., *The Thyroid Gland*. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 492-494.
46. Grotzke, M., *Gonadal Function*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 477-484.
47. Gronowski, A.M., *Reproductive Disorders*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 780-801.
48. Carlow, C., Bennett, M.J., *Clinical Chemistry and the Pediatric Patient*. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L.E., (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 695.
49. Hungerford, R., Meikle A.W., *Adrenal Function*. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E., (Eds.) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th Ed. (2010), pp 463-466.
50. Cooper, D.S., Ladenson, P.W., *The Thyroid Gland*. In Gardner, D.G., Shoback, D. (Eds.) *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, McGraw-Hill Companies, 9<sup>th</sup> Ed. (2011) pp 212-217.

## ANEXOS

**Anexo I:** Intervalos de referências do Hemograma no laboratório do CSMC.

Parâmetro	Intervalos de Referência	Unidades
Leucócitos (WBC)	4,0 – 11,0	10 <sup>3</sup> /ul
Neutrófilos (NEU)	2,5 – 7,5	10 <sup>3</sup> /ul
	45 – 70	%
Linfócitos (LYM)	1,5 – 3,5	10 <sup>3</sup> /ul
	20 – 40	%
Monócitos (MONO)	0,2 – 0,8	10 <sup>3</sup> /ul
	3 – 10	%
Eosinófilos (EOS)	0,04 – 0,4	10 <sup>3</sup> /ul
	1 – 5 %	%
Basófilos (BASO)	0,01 – 0,1	10 <sup>3</sup> /ul
	0 - 2	%
Eritrócitos (RBC)	4,0 – 5,5	10 <sup>6</sup> /ul
Hemoglobina (HGB)	12 – 16(mulheres)	g/dl
	13 – 18 (homens)	
Hematócrito (HCT)	35 – 47(mulheres)	%
	40 – 54 (homens)	
Volume médio (MCV)	85 - 95	fl
Hemoglobina corpuscular média (MCH)	27 - 32	pg
Concentração da Hemoglobina corpuscular média (MCHC)	32 - 36	%
Varição do tamanho dos eritrócitos (RDW)	-	%
Plaquetas (PLT)	150 - 450	10 <sup>3</sup> /ul
Volume médio (MPV)	-	fl
Varição do tamanho das plaquetas (PDW)	-	%

**Anexo II:** Intervalos de referências dos parâmetros da Hemostase e Coagulação no laboratório do CSMC.

Parâmetro	Intervalos de Referência	Unidades
Tempo de Protrombina (TP)	10 - 16	segundos
Razão Normalizada Internacional (INR)	0,9 – 1,1	-
Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT)	26 - 40	segundos
Fibrinogênio	150 – 400	mg/dl

**Anexo III:** Intervalos de referências das análises imunológicas efectuadas no laboratório do CSMC.

Parâmetro	Intervalos de Referência	Unidades
Ac. Anti Tg	<34	UI/mL
Ac. Anti TPO	<12	UI/mL
TSH	0,35 - 4,95	uIU/mL
T3 livre	2,2 – 5,4	pmol/L
T3 total	0,95 – 2,50	nmol/L
T4 livre	9 - 24	pmol/L
T4 total	58 - 154	nmol/L
Vitamina B12	154 - 713	pmol/L
Ácido Fólico	7 – 46,4	nmol/L
CEA	Não fumador < 5 Fumador < 10	ng/mL
CA 19.9	<37	U/mL
βHCG	< 5	UI/L
FSH	Homens 1,7 -12,0 Pico ovulatório 6.3 - 24 Fase folicular 1ª metade 3,9 – 12,0 Fase folicular 2ª metade 2,9 – 9,0 Fase luteínica 1,5 – 7,0 Menopausa 17 – 95	mUI/mL
Progesterona	Fase Folicular 0,25 – 0,54 Fase Luteal 1,5 - 20	ng/mL

	Ovulação 0,25 – 6,22	
	Pós menopausa < 0,41	
Testosterona	Homem 3,0 – 10,6	ng/mL
	Mulher 0,1 – 0,9	
Cortisol	54,94 – 287,56	ng/mL