

1 – Introdução

A actividade clínica decorreu na Unidade de Patologia Clínica (UPC) do Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa (CHPL).

A UPC é constituída, por uma equipa técnica altamente qualificada, para executar todas as determinações analíticas, a que se propõe, nomeadamente, análises Hematológicas Bioquímicas, Imunológicas e Microbiológicas, sendo constituída por;

- Director Técnico - Assistente Graduado Hospitalar, Médico Especialista em Análises Clínicas;
- Director Técnico – Adjunto - Assistente Graduado Hospitalar, Médico Especialista em Análises Clínicas;
- 5 Técnicos Superiores de Análises Clínicas – Licenciados em Análises Clínicas;
- 1 Assistente operacional;
- 2 Administrativas.

A UPC viu-se reforçada, com a fusão das duas UPC, existentes na altura no Hospital Miguel Bombarda e no Hospital Júlio de Matos, presentemente CHPL, em adquirir equipamentos modernos, automatizados e ligados online, para que os restantes serviços do Hospital possam ter acesso aos resultados das análises.

A dinâmica do serviço, passa pelo atendimento dos doentes na recepção, para que estes façam a sua inscrição, sendo-lhes atribuído um número, este número, com o respectivo código de barras será colocado posteriormente nos tubos de sangue, e em todas as amostras biológicas que o doente possui. Na sala de colheitas, procede-se á recolha dos produtos biológicos, sendo estes no final de todas as colheitas, distribuídos pelos vários serviços a que pertencem.

Os equipamentos são preparados diariamente, no que respeita a reagentes, calibradores e controlos, segundo as recomendações do fabricante para cada tipo de aparelho. As análises, na sua grande maioria, são realizadas em analisadores automatizados, os resultados são validados tecnicamente por técnicos superiores e medicamente pelos

médicos especialistas. Após validação médica final, os resultados são impressos e enviados para a recepção.

É política da UPC, apostar na qualidade dos serviços por ele prestados, tendo instituído a implementação de Controlos de Qualidade Internos e Avaliação Externa da Qualidade, participando activamente no Controlo de Qualidade Nacional do INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge).

1.1 – Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa – Enquadramento Histórico

O CHPL – Pólo Júlio de Matos, (fig.1) é um hospital psiquiátrico e de saúde mental, situado na cidade de Lisboa, freguesia de São João de Brito. Embora tivesse sido aberto ao público em 2 de Abril de 1942, as suas origens remontam a 1912, ano em que se iniciou o estudo para a construção do "Novo Manicómio de Lisboa", cujo objectivo era ser uma opção ao antigo Hospital Miguel Bombarda.

Considerado um dos melhores da Europa, na época da sua inauguração, assumiu a finalidade de contribuir para a assistência, ensino e investigação científica, devido à influência do Professor Júlio de Matos. Este hospital criou várias inovações, entre as quais a primeira unidade de Psicocirurgia no nosso País, onde foi desenvolvido o método cirúrgico leucotomia, da autoria do Professor Egas Moniz. Outra novidade foi a nova forma de abordagem no tratamento dos doentes psiquiátricos, que permitia, a alguns, a circulação no exterior do hospital.



Figura 1 - CHPL - Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa – Pólo Júlio de Matos

Foi, neste hospital, que se realizaram alguns encontros internacionais de renome como a primeira reunião europeia de neurocirurgia (1947), ou o primeiro congresso internacional de psicocirurgia (1948), presidido pelo médico norte-americano Walter Freeman. Neste último congresso foi proposto o Nobel de Fisiologia/Medicina ao Professor Egas Moniz.

Actualmente, mais de 15.000 pessoas são atendidas anualmente, entre consultas, internamentos e urgências. Dispõe de variados serviços clínicos como, Endocrinologia, Nutrição, Psiquiatria, Psicologia, UPC, Radiologia, Psicoterapia Comportamental, Residências de Reabilitação, Serviço Social, entre outros. Possui um centro de formação profissional, com a finalidade de colaborar na actualização e formação dos funcionários da organização.

1.2 – Caracterização da Unidade de Patologia Clínica

A UPC anteriormente denominada como Laboratório de Patologia Clínica, do CHPL, é responsável pelas áreas pré-analíticas, analíticas e pós analíticas, totalmente remodeladas e adequadas às necessidades actuais, seguindo as normas de qualidade vigentes para o volume de exames processados diariamente. Realiza várias análises nas áreas de, Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia, tratando-se de uma importante unidade de diagnóstico para o CHPL. A mesma conta ainda com o auxílio de um laboratório de apoio (Laboratório A. Reis Valle), para a realização de exames de alta complexidade.

Cabe, ainda, á UPC promover e proporcionar meios para o desenvolvimento da assistência, ensino e pesquisa no campo da Patologia Clínica, além de colaborar na formação e aperfeiçoamento dos recursos humanos dentro da sua área de acção.

A UPC encontra-se instalada no Pavilhão 24B, tendo como objectivo prestar assistência aos utentes internados no CHPL, utentes em ambulatório provenientes das consultas externas do próprio hospital, bem como dar resposta aos utentes do Serviço Nacional de Saúde provenientes dos diferentes centros de saúde. Encontra-se dividida em várias secções, entre as quais;

➤ **Secção Pré e Pós Analítica;**

Sala de Colheitas

Localizada á entrada do Laboratório, local responsável pelas diversas colheitas de produtos biológicos.

Sala de Recepção e Separação de Amostras

Faz a recepção, triagem, separação e distribuição do material biológico proveniente da sala de colheitas, enfermarias e consultas externas.

Central de Resultados e Estatística

Executa a informatização dos resultados obtidos e impressão dos mesmos, bem como o tratamento estatístico das análises executadas, controlo de stocks, entre outros.

➤ **Secção de Hematologia**

Realiza cerca de 8 análises distintas, destacando-se hemogramas, provas de coagulação e velocidade de sedimentação, com 90% das análises realizadas por automatização.

Tabela 1 – Análises efectuadas na
Secção de Hematologia

<i>Analises Efectuadas</i>	<i>Técnicas Usadas/Equipamentos</i>
Hemograma/Leucograma/Eritrograma	Pentra 60 (Citoquímica, impedância de fluxo focalizada, absorvância de luz e citometria de fluxo)
Plaquetas	Pentra 60 (impedância)
Estudo morfológico do sangue periférico	May-Grunwald-Giemsa

Contagem de reticulócitos	Azul Brillante de Cresil
Grupo sanguíneo	Hemaglutinação
Tempo Tromboplastina Parcial Activado (aPTT)	Método óptico espectrofotométrico
Tempo Protrombina (TP)	Método óptico espectrofotométrico
Fibrinogénio	Método óptico espectrofotométrico (Método de Clauss)
Velocidade Sedimentação	Westergreen Modificado

➤ Secção de Bioquímica Clínica

Realiza 40 análises diferentes, destacando-se perfil hepático, perfil renal, perfil lipídico, electrólitos e determinações para monitorização terapêutica, com 90% das análises realizadas por automatização.

Tabela 2 – Análises efectuadas na Secção de Bioquímica

<i>Metabolismo/ Funções</i>	<i>Parâmetros a dosear</i>
Metabolismo Hidratos de Carbono	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Glucose; ➤ Glucose Pós-Prandial; ➤ Prova de Tolerância oral á glucose; ➤ H_bA_{1c} (Hemoglobina glicada).

Metabolismo Mineral	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cálcio; ➤ Fósforo; ➤ Magnésio.
Metabolismo Lipídico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Colesterol total; ➤ Colesterol HDL; ➤ Colesterol LDL; ➤ Triglicéridos.
Equilíbrio Hidrolítico e ácido-base	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ionograma.
Função Renal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ureia; ➤ Creatinina; ➤ Clearance da creatinina; ➤ Ácido úrico; ➤ Proteinúria; ➤ Urina Tipo II.
Função Hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gama-Glutamiltransferase (GGT); ➤ Aspartato-aminotransferase (AST/GOT); ➤ Alanina-aminotransferase (ALT/GPT); ➤ Fosfatase Alcalina (ALP); ➤ Bilirrubina Total; ➤ Bilirrubina directa; ➤ Albumina
Função Pancreática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ α-Amilase

Estudo das proteínas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Albumina; ➤ Electroforese das proteínas; ➤ Proteínas totais
Estudo das Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ AST; ➤ ALT; ➤ ALP; ➤ Amilase; ➤ Creatinina fosfoquinase (CK); ➤ CK-MB; ➤ Gama Glutamiltransferase (GGT); ➤ Desidrogenase láctica (LDH);

➤ Secção de Imunologia Clínica

Realiza 40 análises distintas, destacando-se determinações hormonais, marcadores tumorais, marcadores de hepatite, exames serológicos, monitorização da terapêutica e avaliação da função tiroideia, com 90% das análises realizadas por automatização.

Tabela 3 – Análises efectuadas na Secção de Imunologia

<i>Equipamentos /Técnica Usadas</i>	<i>Análises Efectuadas</i>
VIDAS (Métodos Imunoenzimáticos Competitivos com Detecção Final em Fluorescência [ELFA])	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Estradiol ➤ Progesterona ➤ Testosterona Total ➤ Triiodotironina Livre (FT3) ➤ Tiroxina Livre (FT4)

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Triiodotironina (T3) ➤ Tiroxina (T4) ➤ Anticorpos (Ac's) anti-HBc ➤ Ac`s anti-HBc IgM ➤ Ac`s anti-HBe ➤ Antígenios (Ag's) anti-HBe ➤ Ag's HBs
<p>VIDAS (Métodos Imunoenzimáticos por sandwich com detecção final em fluorescência [ELFA])</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hormona Estimulante da Tiróide (TSH) ➤ Ac's anti-HBs ➤ Vírus da Imunodeficiência humana (HIV) Duo ➤ Antígeno Carbohidrato (CA) 19.9 ➤ Antígeno Carcino-Embrionário (CEA) ➤ Antígeno Específico da Prostata (TPSA /FPSA) ➤ Hormona Folículo Estimulante (FSH) ➤ Hormona luteinizante (LH) ➤ Prolactina ➤ Ferritina

➤ **Secção de Microbiologia Clínica**

Realiza 20 determinações bacteriológicas distintas, destacando-se uroculturas, exsudados vaginais e uretrais, exsudados nasofaríngeos e orofaríngeos, coproculturas e exames parasitológicos de fezes, com 90% das análises realizadas por técnicas manuais.

As exigências da qualidade, nos resultados em análises clínicas, fizeram surgir o que hoje é considerada uma nova área, a garantia de qualidade, estando presente em todas as determinações clínicas, com o objectivo de manter a excelência dos resultados, incluindo a sua precisão e exactidão, para que exista um melhoramento continuado em todas as determinações clínicas. Usa como instrumentos principais a estatística, criação e análise de indicadores de qualidade.

A UPC, possui equipamentos de tecnologia avançada, que fornecem resultados precisos e fidedignos e garantem a credibilidade das suas análises. Na sua estrutura conta com vários equipamentos nos diversos serviços, entre os quais;

Serviço de Hematologia:

- ABX Pentra 60 – Horiba
- Roller 10
- Option 2 Plus
- Hi-Auto A1c HA-8140

Serviço de Bioquímica:

- ABX Pentra 400- Horiba
- Spotlyte (Na, K, Cl, Li)
- Genio Interlab Electrophoresis
- Aution Jet (Aj-4270)

Serviço de Imunologia:

- Vidas da Biomeriux;
- Immulite 1000 DCP MedLab;

2 – Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais frequentemente requisitados no serviço de Hematologia da UPC do CHPL. Permite, a quantificação dos elementos celulares do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas, sendo o exame de primeira linha no estudo da função hematológica. Contudo, uma análise atenta e cuidada dos elementos celulares implica, para além da quantificação das células sanguíneas, o estudo da sua morfologia.

A realização de um hemograma envolve três passos fundamentais: a colheita/processamento da amostra, a análise da amostra e a avaliação/interpretação dos resultados.

2.1- Colheita e processamento da amostra

A colheita, e o processamento correcto da amostra de sangue para a análise do hemograma são fundamentais para um resultado correcto. O sangue é colhido por punção venosa para tubos com o anticoagulante (EDTA) - ácido etilendiaminotetracético. O EDTA remove o cálcio necessário à coagulação, sendo o anticoagulante mais indicado para contagens de células sanguíneas, porque induz uma anticoagulação completa com efeitos minor sobre as células, conserva a morfologia dos leucócitos e eritrócitos e permite a correcta contagem de plaquetas. A concentração correcta de anticoagulante é fundamental para minimizar as possíveis causas de erro, uma vez que, uma má correlação da concentração entre anticoagulante/volume de sangue pode afectar a análise dos estudos da concentração e alterar a morfologia celular. O excesso de EDTA afecta os eritrócitos e leucócitos, causando alterações degenerativas, provoca uma diminuição no hematócrito (htc) e aumento da concentração de hemoglobina globular média (HGM). As plaquetas também são afectadas, aumentando de volume com posterior desintegração, levando a uma contagem falsamente elevada. Após a colheita, a amostra pode ser armazenada a 4°C durante 24 horas mas, idealmente, deverá ser analisada o mais rapidamente possível.

2.2 - Análise da amostra

Pode ser realizada através de métodos manuais ou automáticos. Os métodos manuais, recorrem à observação microscópica da amostra, enquanto que os métodos automáticos, baseiam-se no uso de 3 técnicas que avaliam as variações de impedância do fluxo eléctrico ou da dispersão de luz produzida pelas diferentes células. De forma genérica, podemos afirmar que os segundos fornecem medições mais precisas e completas do que os primeiros, ao mesmo tempo, que aumentam a rapidez da análise. Os métodos automáticos, podem fornecer alguns dados qualitativos como o volume celular, mas como se baseiam em características médias, poderão conduzir a resultados erróneos. Desta forma, uma análise por métodos manuais, reveste-se de grande importância nos casos em que é necessária uma avaliação qualitativa.

2.3 - Esfregaço de Sangue Periférico

A avaliação do esfregaço de sangue periférico (SP) é de extrema importância na avaliação da doença hematológica. Baseia-se na observação das três linhagens, eritrocítica (alterações morfológicas, tais como tamanho, forma, cor e inclusões; alterações do estado de maturação), leucocítica (alterações morfológicas; alterações do estado de maturação), plaquetária (alterações morfológicas; alterações numéricas) [1]. Embora um diagnóstico específico possa ser sugerido com base em resultados obtidos por métodos automáticos, muitas doenças têm uma contagem celular normal com morfologia celular anormal, desta forma, a análise microscópica da morfologia celular, deverá ser realizada sempre, que se suspeitar de alterações qualitativas. Situações como anisocitose (variações do tamanho), poiquilocitose (variações da forma) ou anisocromia (variações da cor) só poderão ser avaliadas através da observação do esfregaço de SP. Se o anterior é verdade, também o é, que a análise morfológica pode ser prejudicada por esfregaços mal preparados ou corados, ou pela inexperiência de quem os observa. Os esfregaços devem ser feitos de preferência sem o uso de anticoagulante, no entanto se as lâminas forem feitas a partir de sangue colhido com anticoagulante (EDTA) devem ser realizadas até 30 minutos após a colheita, para evitar deformações celulares. Um bom esfregaço de SP é, por consequência, o sucesso da análise morfológica exigindo particular atenção na sua preparação, (figura 2) coloração e familiaridade com a aparência morfológica de tipos celulares normais e patológicos.

A coloração para o estudo morfológico do SP é feita pelo método de May-Grunwal-Giemsa.

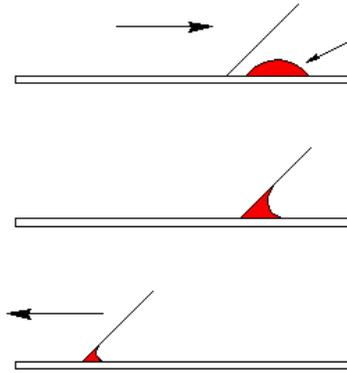


Figura 2 – Técnica de Preparação do esfregaço de sangue periférico

2.4 – Características do esfregaço de sangue periférico

- Deve ser liso, regular e homogêneo;
- A espessura deve diminuir gradualmente da cabeça para a cauda (relativamente fino);
- Deve apresentar bordos bem definidos e franja;
- Deve ser identificado com lápis de carvão na zona mais espessa, depois de bem seco.

Evitar:

Esfregaços demasiado espessos → células mal separadas;

Esfregaços demasiado finos → células muito dispersas;

Esfregaços irregulares → células concentradas nuns locais e escassas noutros;

Esfregaços mal secos → alteração da morfologia dos glóbulos vermelhos (GV).

2.5 - Hemograma e Plaquetas – Automatização

O sistema ABX Pentra 60 (figura 3), consiste, num analisador hematológico automatizado, para a realização de hemogramas e contagem de plaquetas, com uma uma

tecnologia muito sofisticada, e sensibilidade para detectar possíveis alterações existentes no sangue do doente.

Este equipamento analisa 26 parâmetros entre os quais;

- Contagem total de glóbulos brancos (GB);
- Contagem total de glóbulos vermelhos (GV);
- Determinação de Hemoglobina (Hb);
- Determinação de hematócrito (Htc);
- Determinação de volume globular médio (VGM);
- Determinação da hemoglobina globular média (HGM);
- Determinação da concentração da hemoglobina globular média (CHGM);
- Determinação do índice de anisocitose (RDW);
- Contagem total de plaquetas (Plq);
- Determinação do volume plaquetário médio (VPM);
- Determinação do plaquetócrito (Pct);
- Determinação da amplitude da distribuição de plaquetas (PDW);
- Contagem de linfócitos (valor absoluto e relativo);
- Contagem de monócitos (valor absoluto e relativo);
- Contagem de neutrófilos (valor absoluto e relativo);
- Contagem de eosinófilos (valor relativo e relativo);
- Contagem de basófilos (valor relativo e relativo);
- Contagem de linfócitos atípicos (valor relativo e relativo);
- Contagem de grandes células imaturas (valor absoluto e relativo);
- Métodos de medição; impedância de fluxo focalizada, absorvância de luz e citometria de fluxo).



Figura 3 - Contador Hematológico Automático ABX Pentra 60

Este equipamento baseia-se no princípio da impedância para a medição GB, GV, Plq e basófilos, fotometria para a determinação de Hb, impedância e difusão de luz para linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos atípicos e células imaturas. O Htc e índices eritrocitários (VGM, HGM, CHGM, RDW) e plaquetários (VPM, Pct e PDW) são obtidos por cálculo.

2.6 – Princípio de Coulter

A contagem de impedância, descrita por Wallace Coulter em 1956, fundamenta-se na detecção e medição da resistência eléctrica produzida pelas células quando passam por pequenas aberturas. A contagem e a avaliação, da dimensão dos elementos figurados do sangue, são realizadas através da detecção e da medição de mudanças na condutividade eléctrica, que surgem quando uma partícula (ou célula) num líquido condutor passa através de uma pequena fenda, existente na célula de contagem. Este fenómeno origina um impulso eléctrico.

- O número de impulsos está relacionado com a quantificação celular.
- A amplitude do impulso está relacionada com a dimensão da célula.

2.7 – Fundamento do equipamento- ABX Pentra 60

O equipamento ABX Pentra 60 rege-se pelo princípio da citometria de fluxo. A citometria é usada para determinar características químicas e fisiopatológicas de células e outras partículas biológicas [2]. A citometria de fluxo é usada para analisar células e partículas aquando da sua passagem por fluxos muito pequenos. A amostra é aspirada e medida para uma razão específica, e é enviada para uma linha de fluxo de células. O mecanismo de fluxo laminar, melhora a exactidão e reprodutibilidade da contagem celular, pelo facto das células passarem em linha, uma em relação às outras pelo centro da linha de fluxo, é prevenida a geração de impulsos anormais, assim como se reduz a contaminação. É emitido um laser semiconductor nas células que passam pelo fluxo de células. A luz que atravessa o fluxo é recebida, e aquela que é reflectida para os lados e

a luz fluorescente lateral é recebida por um fotomultiplicador. Esta luz é convertida em impulsos eléctricos, tornando assim possível receber informação acerca das células. Quando existem obstáculos (como partículas) no caminho da luz, esta é reflectida pelo obstáculo em várias direcções. Este fenómeno é conhecido como “reflexão da luz”. Pela detecção desta, é possível obter informação do tamanho das células e propriedades materiais. Da mesma forma, quando é emitido um feixe de laser em direcção das partículas de células sanguíneas, também surge uma refacção de luz. A intensidade desta luz depende de factores como diâmetro da partícula e ângulo de visão. O analisador detecta a luz que é reflectida frontalmente, esta fornece informações acerca do tamanho da partícula, enquanto que aquela que é direccionada para os lados revela dados acerca do interior das células (como o tamanho dos núcleos). Quando é emitida luz sobre uma matéria fluorescente, como são as células sanguíneas coradas, é produzida a luz num comprimento de onda superior ao original. A intensidade da luz fluorescente aumenta na mesma proporção da concentração da coloração. Pela medição da intensidade da luz fluorescente emitida, pode-se obter informações acerca do grau de coloração das células. A contagem sanguínea é conseguida, contando os impulsos e, um histograma do tamanho das células é obtido determinando o tamanho desses impulsos (figura 4).

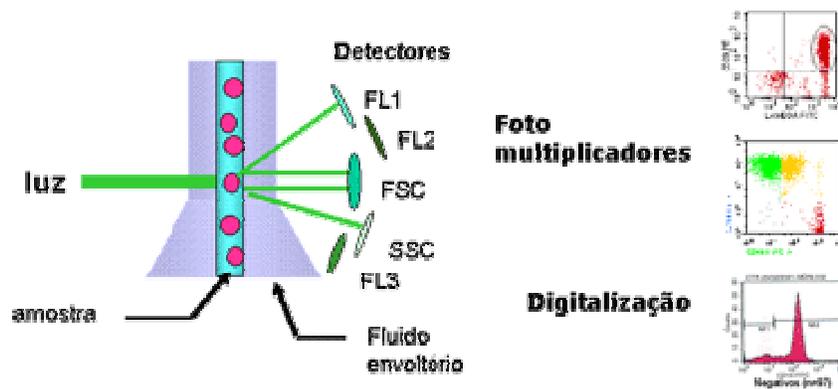


Figura 4 – Representação dos resultados obtidos por citometria de fluxo.

2.8 - Causas de erro na avaliação do hemograma

Para a correcta interpretação de um hemograma, teremos sempre de ponderar a possibilidade de ocorrerem erros desde a colheita da amostra até à análise dos

resultados. A colheita e o processamento da amostra são dois factores que determinam decisivamente o resultado de um hemograma, sobretudo pela influência que exercem sobre as etapas seguintes. Uma colheita apropriada da amostra de sangue é, talvez, o passo mais importante para que o resultado do hemograma seja o correcto. Factores como a actividade do doente, o estado de hidratação, a posição de recolha e a ansiedade aquando da colheita da amostra poderão afectar os parâmetros hematológicos e, como tal, deverão ser considerados na interpretação dos resultados. Por sua vez, durante o processamento da amostra podem ocorrer alterações nas características originais da mesma, quer em relação às células (alteração da morfologia), quer em relação ao plasma (alteração da viscosidade), podendo invalidar os resultados posteriores. Outra fonte de erro diz respeito ao método de obtenção dos vários parâmetros que fazem parte do hemograma. Se é certo, que os métodos automáticos mostram grande reprodutibilidade, é também verdade, que não estão isentos de erros, sobretudo em dois aspectos: instrumentação e amostra. Em relação ao primeiro são de referir os problemas relacionados com a má calibração do aparelho, assim como falhas eléctricas ou mecânicas e flutuações de voltagem. Em relação ao segundo, o volume ou as características do fluxo da amostra podem afectar negativamente os resultados. As características do fluxo da amostra podem ser alteradas no decurso do processamento da mesma, ou serem consequência de certas doenças concomitantes (por ex. linfocitose e dislipidemia) são duas situações associadas ao aumento da turbulência, causando elevações de Hb, VGM e CHGM que não correspondem à realidade). Na análise dos resultados, para além de todos os erros que poderão ter surgido em fases anteriores, teremos que ter em atenção que os valores que tomamos como referência variam com a idade e o sexo, assim, um mesmo valor de Hb pode representar ou não uma anemia. Situações que, alterando ou mantendo a concentração dos GV por aumento ou diminuição do volume plasmático, podem simular situações de falsa normalidade. São exemplos o aumento do volume plasmático (e Htc baixo), a gravidez, insuficiência renal, insuficiência cardíaca e o decúbito prolongado. Pelo contrário, situações como a desidratação, a diarreia, a acidose diabética e a restrição de fluidos provocam diminuição do volume plasmático (e Htc alto). Por fim, são de destacar situações que podem “mascarar” uma anemia, ou seja, casos em que o volume plasmático acompanha a diminuição do número de GV, mantendo o Htc. São exemplos a hemorragia aguda e as neoplasias. Em todas estas situações é fundamental que o volume plasmático seja tido em consideração. Desta forma, como já foi mencionado, a análise microscópica de

um esfregão de SP deverá ser realizada sempre que se suspeitar de alterações qualitativas.

2.9 – Controlo de Qualidade Interno Autoanalisador - ABX Pentra 60

A UPC do CHPL, compromete-se a atingir elevados níveis de qualidade, ética e técnica, trabalhando segundo as boas práticas clínicas, de modo, a que os serviços prestados tenham reconhecida credibilidade quer perante os utentes quer perante os outros laboratórios de ensaio. Assim para atingir e manter padrões de exigência elevados, utilizam-se diariamente no equipamento ABX Pentra 60, soros comerciais titulados de nível alto (ABX Minotrol Hight) e baixo (ABX Minotrol Low) para o controlo da exactidão, precisão, reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. Se os valores do controlo interno não estiverem dentro dos intervalos de referência, não se poderá prosseguir para a análise das amostras, sendo necessária a repetição dos mesmos, no entanto se os valores persistirem, em não conformidade, será necessário efectuar a calibração do equipamento, por técnicos especializados para o efeito, com o calibrador (minocal calibrador). Para a avaliação da precisão, o equipamento possui no seu software cartas de controlo de qualidade interno, tendo em conta as regras de westgard para a aceitação ou rejeição dos resultados dos controlos, e consequentemente a validação dos resultados das amostras.

3 - Colorações em Hematologia

3.1 – Coloração May-Grunwald-Giemsa

A coloração utilizada para a observação morfológica das células sanguíneas é a coloração de May-Grunwald-Giemsa, esta coloração baseia-se nos diferentes pH das estruturas celulares, de modo que, os organelos básicos impregnam-se de corantes ácidos (eosina), mostrando-se, assim acidófilas (molécula de Hg, granulações

eosinófilas - espermina). Por outro lado, os ácidos nucléicos proteínas do núcleo, citoplasma primitivo e granulações basófilas (heparina), como organelos ácidos, coram pelos corantes básicos (azur B), mostrando-se basófilas, enquanto que, as granulações neutrófilas coram fracamente pelos complexos azur. [3]

Inicialmente o processo de coloração inicia-se com a fixação do esfregaço de SP por metanol de modo a não perder o material do esfregaço. Este fixador permite a realização de uma fixação rápida – 3 minutos, alterando pouco a estrutura celular. Após realizada a fixação efectua-se a coloração propriamente dita, em que, o corante vai corar as estruturas que possuem afinidade para ele, dependendo do pH das estruturas e do pH do corante utilizado.

Os GV apresentam uma cor rosa pálido, com uma zona central mais clara. O ponteadado basófilo distingue-se pela sua cor azul, embora por vezes possa apresentar uma tonalidade roxa. Os restos nucleares, quer as formações corpusculares como as anelares, apresentam-se coradas de um roxo intenso ou violeta.

A cromatina nuclear apresenta-se corada de violeta escuro, apresentando bem visíveis as estruturas cromatídeas, podendo-se observar a sua disposição e densidade, a qual varia com a intensidade de cor. Pode observar-se muito bem o grau de maturidade de uma célula, tendo em conta a sua estrutura de violeta ou azul mais claro.

Os protoplasmas aparecem corados de cor rosa pálido (neutrófilos) ou de azul, a cor do azul pode variar em tons mais escuros das células plasmáticas e dos eritoblastos basófilos, aos tons mais claros dos linfócitos com grande citoplasma.

Na coloração das granulações, este método tem o máximo de eficácia. Deste modo, a granulação neutrófila madura, apresenta uma cor encarnada, as granulações imaturas dos mielócitos neutrófilos apresentam uma cor roxo púrpura (azurófila). A granulação dos eosinófilos é roxo alaranjado. A granulação dos basófilos apresenta-se violeta escuro e, os linfócitos apresentam pequenos grânulos azurófilos de cor roxo vivo, com tonalidade parecida aos monócitos.

As Plq apresentam uma porção periférica azulada e grânulos centrais roxos.

3.2 - Coloração de Reticulócitos – Azul Brillante de Cresil

Na linha eritrocitária, o reticulócito segue o eritroblasto ortocromático e precede o eritrócito. São já células anucleadas mas, dada a sua imaturidade, conservam ainda restos de RNA no citoplasma (sobretudo RNA ribossomal) que pode ser evidenciado através de uma coloração vital. [4]

A contagem de reticulócitos é o exame mais simples e directo para avaliar a taxa efectiva de produção dos eritrócitos. O número de reticulócitos no SP reflecte a actividade eritropoiética medular, partindo do princípio que há uma libertação normal dos reticulócitos da medula, e que estes permanecem em circulação o período de tempo normal (24-48h). [4]

Quando se estuda uma anemia e a sua provável etiologia, a contagem de reticulócitos é um exame de 1ª linha, a par das constantes globulares e do estudo morfológico dos GV. Permite diagnosticar se se trata de uma anemia regenerativa, em que há estimulação da medula e há uma resposta medular com aumento do número de reticulócitos e consequente aumento da produção de eritrócitos, ou de uma anemia arregenerativa, em que há um defeito na produção dos GV e não há um aumento do número de reticulócitos. O aumento de reticulócitos ocorre normalmente em pacientes com anemia e medula óssea funcional, aqui estão incluídos os doentes com perda de sangue ou anemias hemolíticas (anemia falciforme, talassemias, esferocitose, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, doença hemolítica imune e hiperesplenismo), e em doentes que foram tratados com sucesso para outros tipos de anemia. Em contraste, os doentes com aplasia medular, eritropoiese ineficaz ou produção deficiente de eritropoietina, podem mostrar uma contagem normal ou diminuída de reticulócitos devido a uma grave anemia. Nestes doentes estão incluídas as anemias por deficiências de ferro, folatos ou vitamina B12, anemia perniciosa, leucemia, carcinoma metastático, mielofibrose, insuficiência renal crónica e outros distúrbios. [4]

De forma a evidenciar os reticulócitos presentes na corrente sanguínea é realizada uma coloração com um corante vital, de natureza básica, o azul brilhante de cresil que vai neutralizar e precipitar o RNA citoplasmático residual sob a forma de grânulos e filamentos (reticulado). Os reticulócitos aparecem como células cinzento pálido azulado

e o material reticulo-filamentoso deve estar corado de azul-escuro (Figura 5). Os eritrócitos maduros aparecem corados uniformemente de azul pálido.

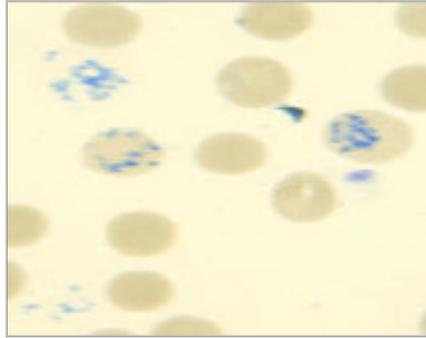


Figura 5 – Reticulócitos e material reticulo-filamentoso

4 - Determinação dos grupos sanguíneos do sistema “ABO” e factor Rh

A determinação do grupo sanguíneo consiste na identificação dos Ag`s do sistema ABO presentes nos GV e que são geneticamente determinados por 3 genes, respectivamente, os genes A, B e O. Tais genes são autossômicos (genes alelos) presentes num único locus. Conforme a existência dos Ag`s A e B, os GV são classificados (fenotipicamente) como sendo do grupo A, B, AB ou O. No soro de indivíduos de cada um dos grupos, existem Ac`s chamados naturais: Anti-A (em indivíduos do grupo B); anti-B (em indivíduos do grupo A); anti-A e anti-B (em indivíduos do grupo O), sendo que os indivíduos do grupo AB não possuem os Ac`s anti-A e anti-B no soro. Os grupos sanguíneos são transmitidos por genes autossômicos e para a sua determinação utilizam-se soros padrões, cujas principais qualidades devem ser: especificidade (antigenicidade), potência (título) e avidéz (rapidez para que se estabeleça a aglutinação). [5]

Os Ag`s eritrocitários do sistema Rh (D, C, E e os seus respectivos alelos d, c, e) são determinados geneticamente. O sistema Rh é determinado por 2 genes estruturais, intimamente ligados: 1 gene codifica o Ag D e outro codifica os Ag`s C ou c, E ou e. Os

soros específicos existentes para identificação destes Ag`s são os soros anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e, não existindo o soro anti-d. A determinação dos indivíduos em Rh positivo ou Rh negativo faz-se segundo a presença ou não no GV, de Ag D (Rh⁺). [5]

4.1 – Fundamento do Método

As reacções de hemaglutinação correspondem ao reconhecimento dos Ag´s eritrocitários pelos Ac´s presentes no soro. [2] As moléculas de Ag e Ac mantêm-se unidas à custa de forças intermoleculares não covalentes, que apenas são eficazes quando é possível um contacto próximo entre eles. A reacção Ag-Ac ocorre em dois passos principais: sensibilização e posteriormente a aglutinação.

A sensibilização refere-se ao processo em que o local de reconhecimento do Ac encontra o determinante antigénico correspondente, ao qual se vai ligar. A aglutinação diz respeito à formação de uma estrutura de ligação entre as células adjacentes que normalmente permitem que a reacção se torne visível

A aglutinação pode ser vista macroscopicamente com o auxílio de uma fonte de luz. Em casos de dúvida os resultados podem ser confirmados microscopicamente, dado que as reacções fracamente positivas podem não ser facilmente identificadas.

Glóbulos vermelhos testados com soro		Antigénios presentes nos glóbulos vermelhos	Grupo sanguíneo
Anti-A	Anti-B		
Aglutinação	-	A	A
-	Aglutinação	B	B
Aglutinação	Aglutinação	AB	AB
-	-	O	O

Tabela 4 – Comportamento da prova directa

Soro testado com glóbulos Vermelhos		Anticorpo presente no soro
Tipo A	Tipo B	
Aglutinação	-	Anti-A
-	Aglutinação	Anti-B
Aglutinação	Aglutinação	Anti-A Anti-B

Tabela 5 – Comportamento da prova reversa

5 – Determinação da Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) consiste em medir o grau de sedimentação dos GV numa amostra de sangue com EDTA, durante um período específico. Ainda hoje, a VS é utilizada com frequência na prática clínica como marcador inespecífico de doenças [5].

Em 1920, foi efectuada a padronização do teste da VS pelo método Westergren, considerado como padrão de ouro para a determinação deste parâmetro, sendo recomendado pelo *International Committee for Standardization in Hematology* (ICSH) em 1977. O método consiste em colocar a amostra com citrato de sódio a 3,8% (relação 4:1) num tubo de vidro graduado, com 200mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro interno. O tubo é preenchido até à marca zero e deixado na posição vertical por uma hora. A VS, expressa em mm/h, será a distância do menisco até ao topo da coluna de GV. O exame deve ser feito até duas horas após a colheita a uma temperatura entre 20°C e 25°C. Actualmente existem algumas variações descritas deste método, como o uso de sangue com o anticoagulante, EDTA. Esta modificação apresenta uma boa relação com o método padrão e passou a ser considerada o método de referência para a VS pela ICSH a partir de 1993. Além disso, este método, permite que a mesma amostra

de sangue possa ser utilizada para a realização da VS, bem como outros testes hematológicos e que o exame possa ser realizado até 12 horas após a colheita.

O aumento dos valores da VS, podem ser verificados em numerosas patologias, entre as quais; na hemodiluição (anemias agudas ou crónicas), no aumento de proteínas de fase aguda (doença reumática), na presença de proteínas plasmáticas anormais (mieloma múltiplo), no aumento de imunoglobulinas (processos infecciosos ou inflamatórios). Em reumatologia, a VS é útil na avaliação da presença de actividade e resposta terapêutica em pacientes com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, vasculites e outras doenças difusas do tecido conjuntivo [5]

Por outro lado, vários factores são capazes de diminuir a VS, destacando-se a temperatura ambiente mais baixa que a recomendada ($<20^{\circ}\text{C}$), o atraso na realização da análise, o uso de medicamentos como anti-inflamatórios não hormonais em altas doses e corticosteróides, a presença de GV falciformes na drepanocitose, e o aumento do Htc, comum na policitemia. A hipofibrinogenemia hereditária primária e a coagulação intravascular disseminada estão entre as patologias que reduzem a VS devido à redução do fibrinogénio. No entanto, valores baixos de VS apresentam pouco ou nenhum valor diagnóstico [5]

Recomendações para o uso da VS;

- ✓ Interpretar a VS sempre associada à clínica;
- ✓ Não usar a VS para rastreio de doenças em pacientes assintomáticos ou com sintomas inespecíficos.

Diagnóstico e controle de tratamento de:

- ✓ Polimialgia reumática;
- ✓ Arterite temporal;

Doenças Malignas:

- ✓ Não usar a VS para diagnóstico de patologia maligna;
- ✓ Usar a VS para auxiliar no diagnóstico de patologia metastática;
- ✓ Utilizar a VS como factor prognóstico no linfoma de Hodgkin.

5.1 – Velocidade de Sedimentação - Automatização

Novas técnicas de medição da VS, têm sido introduzidas com alguns objectivos: reduzir a exposição ocupacional utilizando sistemas fechados e automatizados; automatizar a leitura, otimizar o fluxo de trabalho e a utilização dos recursos humanos; utilizar uma única amostra para vários exames hematológicos (evitar a utilização de um tubo específico para a VS e reduzir o volume de sangue colhido).

O analisador automático Alifax`s (figura 6) utilizado para a determinação da VS na secção de Hematologia, utiliza a metodologia de cinética-fotométrica capilar. O analisador aspira 150 uL de amostra de sangue com EDTA, distribui num capilar, e centrifuga com uma força de 20 g. Um microfotômetro infravermelho (650nm) realiza 1.000 leituras durante um período de 20 segundos, no qual é observado a microsedimentação eritrocitária a 37°C. Os impulsos eléctricos detectados pelo fotodíodo estão directamente correlacionados à concentração de GV presentes no capilar. A curva de sedimentação é analisada e os dados são convertidos em valores de Westergren aplicando-se um modelo de regressão linear.



Figura 6 – Analisador automático Alifax`s

O sistema Alifax`s apresenta algumas vantagens em relação ao método de Westergren; não é necessário colher um tubo exclusivo para VS ou manipular a amostra para diluição; há optimização do fluxo de trabalho (amostra única com EDTA para a maioria dos exames de hematologia); utilização de pequenos volumes de amostra (150 uL de sangue); redução no volume de colheita de sangue (uma vantagem para pacientes pediátricos e oncológicos); redução na geração de resíduos biológicos e redução do

tempo de análise (método de Westergren, leitura após 60 minutos e no Alifax`s, leitura em 20 segundos).

O processo do método para determinação da VS é composto por três fases: agregação ou fase lag, decantação ou precipitação e empacotamento. Na primeira fase ocorre a formação de rouleaux e uma pequena sedimentação. Os GV apresentam carga negativa na superfície, o que faz com que haja repulsão entre as células. Altas concentrações de proteínas plasmáticas, que são carregadas positivamente, promovem a neutralização das cargas e facilitam a formação de rouleaux. A fase de decantação ou precipitação é o período na qual ocorre sedimentação mais rápida. A fase final do processo de VS - empacotamento, é uma fase lenta, porém importante para a leitura dos resultados. O comportamento da VS é uma curva sigmóide.

Resumindo, o analisador automático Alifax`s permite a determinação da VS, de forma precisa e fidedigna, substituindo o método de Westergren, utilizando pequenos volumes de amostras colhidas em EDTA, sem manipulação de material biológico e num tempo muito mais rápido de análise em comparação ao método manual.

5.2 - Causas de erro que influenciam a VS

Alguns erros analíticos, podem aumentar a VS levando a resultados falsos-positivos, nomeadamente, uma concentração de anticoagulante maior que a recomendada, temperatura ambiente elevada (> 25°C), uso de medicamentos especialmente heparina e contraceptivos orais.

5.3 – Controlo de Qualidade Interno no Analisador Alifax`s

O analisador Alifax`s possui três níveis de controlo – baixo, médio e alto, sendo cada um deles, executado alternadamente em dias consecutivos de forma a verificar a exactidão, precisão e qualidade dos resultados das amostras. Estas amostras controlo, cujos resultados são previamente conhecidos, permitem avaliar o funcionamento do equipamento e reagentes. A determinação da VS somente é realizada quando os valores

do controlo estão dentro dos intervalos de referência estipulados, caso os valores se encontrem fora do intervalo de referência, será necessária uma correcção ao aparelho, com a calibração do mesmo.

6 – Coagulação – Considerações Gerais

O Sistema Hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas. Depende de complexas interacções entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise. É um dos mecanismos de defesa mais básicos do organismo pois preserva a integridade da circulação e limita a perda de sangue. A sequência de reacções locais que culmina no controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado, define-se como Hemostase. É regulada por diferentes mecanismos e inclui várias fases:

1. **Resposta vascular** (constricção do vaso lesado);
2. **Hemostase primária** (formação do trombo plaquetário);
3. **Hemostase secundária** (formação do coágulo de fibrina);

O coágulo sanguíneo é, por sua vez, o promotor dos processos de reparação definitiva.

Classicamente a cascata da coagulação é dividida numa via intrínseca ou de contacto, em que todos os factores necessários estão presentes em circulação e a reacção inicial é o contacto com superfícies carregadas negativamente, e numa via extrínseca ou dependente do factor tecidular que é activada na sequência de uma lesão vascular. Após a activação do factor X, as duas vias convergem numa só – via comum que conduz à formação de trombina.

6.1 – Avaliação Laboratorial da Função Hemostática

A avaliação laboratorial da função hemostática sucede a avaliação clínica. Os testes de rastreio, são usados primeiramente, para medir os efeitos combinados dos factores que

influenciam uma fase particular da hemostase. Poderão ser complementados, com testes específicos que avaliam o nível ou a função de um factor da coagulação ou a função plaquetária, para que seja estabelecido um diagnóstico definitivo e correcto.

Testes de Rastreio

- Contagem de plaquetas;
- Tempo de Tromboplastina Parcial Activado (aPTT);
- Tempo de Pró-trombina (TP).

Contagem de Plaquetas

Amostra; Plasma colhido em EDTA

É particularmente útil devido à sua disponibilidade e boa correlação com o risco de hemorragia. Dadas as reduzidas dimensões das plaquetas e a sua tendência a aderirem a superfícies estranhas e a agregarem-se quando activadas, são de quantificação mais difícil que os GV ou os leucócitos. [3]

A contagem das plaquetas é realizada por método automático no equipamento ABX Pentra 60 como atrás descrito, este autoanalisador utiliza a magnitude dos limiares para distinguirem as plaquetas dos leucócitos e dos eritrócitos, tem no entanto, desvios-padrão elevados, devido a possíveis erros. Contagens falsamente reduzidas podem ocorrer, por exemplo, pela presença de agregados plaquetários ou de plaquetas gigantes, enquanto que plaquetas falsamente elevadas podem traduzir a presença de fragmentos de hemólise de GV.

6.2 – Coagulação - Automatização

O Option 4 Plus (figura 7), é um instrumento semi-automático de 4 canais para realização de todos os tipos de testes de coagulação, nomeadamente, tempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), tempo de protrombina (PT), e fibrinogénio. As suas características incluem:

- 4 canais de programação multiparamétricos;
- Identificação dos pacientes e resultados;
- Entrada de dados do reagente (controle de Valor, ISI, unidade);
- Entrada de curvas de calibração;
- Programação dos períodos de incubação;
- Disparo automático de medição de adição do reagente;
- Resultados em segundos ou Unidades;
- Auto-teste com o programa de mensagens de alarme.



Figura 7 – Analisador semi-automático OPTION-4

- Tempo de Tromboplastina Parcial Activado (aPTT)

Amostra; plasma colhido com citrato de sódio na proporção de 1/9.

O aPTT avalia a via intrínseca da cascata da coagulação, pelo que testa a pré-caliceína, o quinogénio de alto peso molecular e os factores XII, XI, IX e VIII. Avalia também a via comum (factores X, V, II e fibrinogénio). É usado na detecção de anticorpos lúpicos e para a monitorização laboratorial da heparina, mas, não é recomendado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais nem é sensível á disfunção plaquetária..

O aPTT pode estar prolongado em situações como:

- a) Deficiência dos factores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, pré-caliceína e HMWK;

- b) Doença hepática, coagulação intravascular disseminada (DIC) e transfusões sanguíneas maciças;
- c) Terapêutica com heparina e trombolíticos.

O aPTT pode estar diminuído em qualquer estado de hipercoagulabilidade.

Método

Neste teste utilizam-se substitutos de fosfolípidos plaquetários, como a cefalina ou a inositina que são tromboplastinas parciais, incapazes de activar a via extrínseca. O plasma é colocado em presença de um destes fosfolípidos pró-coagulantes, de um activador por contacto e de cálcio. Regista-se, então, o tempo que o plasma leva a coagular. A variação normal dos resultados obtidos pelo Método de Manchester é de 36-48 segundos.

➤ Tempo de Pró-Trombina (TP)

O PT avalia a via extrínseca da cascata da coagulação bem como a subsequente via comum. Reflecte alterações em três dos factores dependentes da vitamina K (factor II, VII e X), do fibrinogénio e do factor V. É utilizado na monitorização dos anticoagulantes orais.

Método

Consiste na adição de uma tromboplastina completa (equivalente à tromboplastina tecidual) a plasma citratado e na avaliação do tempo de coagulação após adição de cálcio. Não requer activação por contacto pelo que é independente da via intrínseca.

Na tentativa de obviar a enorme discrepância entre os diferentes tipos de reagentes que avaliam o PT, a Organização Mundial de Saúde propôs que as tromboplastinas fossem padronizadas segundo uma preparação de referência internacional e criou o *International Sensitivity Index (ISI)*. Após a determinação do ISI da tromboplastina, os resultados podem ser referenciados como *International Normalized Ratio (INR)*. Conceptualmente é a razão entre o PT do paciente e o PT de referência, em segundos.

Um INR prolongado pode traduzir:

- a) Deficiência dos factores I, II, V, VII e X;

- b) Deficiência de vitamina K;
- c) Terapêutica com anticoagulantes orais em doses elevadas;
- d) Doença hepática grave, Síndrome nefrótica, DIC, transfusões sanguíneas maciças.

O INR pode estar diminuído em estados pró-trombóticos (como nos períodos pós-parto ou pós-cirúrgico). Em doentes a fazer anticoagulantes orais, o INR deve variar entre 2 e 3, na doença tromboembólica venosa não complicada, entre 3 e 3.5 na trombose recorrente ou no Lúpus anticoagulante e entre 2.5 e 3.5 na trombose recorrente ou nos doentes com prótese valvular.

Testes Específicos

➤ Análise do Fibrinogénio Plasmático

A velocidade de formação do coágulo é significativamente afectada pelos níveis de fibrinogénio: concentrações elevadas de fibrinogénio associam-se a um aumento do risco trombótico enquanto que níveis baixos de fibrinogénio estão presentes em várias situações clínico-patológicas (ex. terapêutica trombolítica, doença hepática, DIC). Como o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, está frequentemente elevado durante os processos inflamatórios.

Método

O fundamento do fibrinogénio é baseado no método mais usado descrito primariamente por Clauss. Uma quantidade otimizada de trombina (bovina) é adicionada a um plasma diluído 1:10. O tempo de coagulação medido é inversamente proporcional á concentração de fibrinogénio na amostra.

6.3 - Controlo de qualidade interno no analisador Option 4 Plus

Diariamente é executado o controlo de qualidade interno que avalia os três parâmetros (aPTT, PT e fibrinogénio). O HemoStat Control Plasma Normal (CPN) e o patológico (CPA) são testados em conjunto com os plasmas dos doentes. O CPN é um plasma

normal, enquanto que o CPA é ajustado, para se aproximar moderadamente de plasmas deficientes. Como o aparelho é semi-automático é necessário um grande rigor quer na pipetagem uma vez que esta é feita manualmente, quer no controlo da temperatura do aparelho, estes dois factores são condições básicas, para que o controlo se encontre dentro dos intervalos de referência.

7 – Automatização em Bioquímica – Analisador ABX 400

O ABX pentra 400 (figura 8) é um analisador multiparamétrico especializado em química clínica, para a realização de análises de rotina. Os principais componentes são o sistema de pipetagem, o sistema de reagentes, o sistema do disco da reacção e a área das teclas de função.

As concentrações de substrato e a actividade enzimática são determinadas por espectrofotometria (colorimetria e turbidimetria). O sistema de medição fotométrica possui uma lâmpada de halogéneo-tungsténio, como fonte de luz, e um espectrofotómetro de comprimento de onda múltiplo.

O autoanalisador ABX Pentra 60, oferece uma alta precisão na determinação das análises, com opções de backup para 55 parâmetros a uma taxa de até 420 testes por hora. Possui capacidade para reagentes com códigos de barras, armazenamento refrigerado para reagentes específicos, funções de manutenção automatizadas como a notificação de calibração, informação sobre as datas de validade dos reagentes e validação automática dos resultados



Figura 8 – Analisador automático ABX PENTRA 400

7.1- Espectrofotometria

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na absorção e/ou emissão de radiação electromagnética por muitas moléculas, quando os seus electrões se movimentam entre níveis energéticos. A espectrofotometria baseia-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho. A chamada radiação luminosa corresponde a uma gama de comprimentos de onda que vai desde o ultravioleta ao infravermelho no espectro da radiação electromagnética [2].

Um espectrofotómetro é um aparelho que faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução, e mede a quantidade de luz que foi absorvida por essa solução. Usando um prisma, o aparelho separa a luz, em feixes com diferentes comprimentos de onda. Pode-se assim fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromático (de um único comprimento de onda, ou quase). O espectrofotómetro permite-nos saber que quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda. O conjunto das absorvâncias aos vários comprimentos de onda para um composto dá-se o nome de espectro de absorção e varia de substância para substância. Se uma substância é verde, por exemplo, deixa passar ou reflecte a cor nesse comprimento de onda, absorvendo mais a luz na região do vermelho. A seguir podem ver-se espectros de várias substâncias diferentes. Uma vez que diferentes substâncias têm diferentes padrões de absorção, a espectrofotometria permite-nos, por exemplo, identificar substâncias com base no seu espectro. Permite também quantificá-las, uma vez que a quantidade de luz absorvida está relacionada com a concentração da substância [2].

7.2 Colorimetria

Com alguma frequência é necessário quantificar substâncias em misturas complexas, ou que não absorvem significativamente a luz a nenhum comprimento de onda. Nestes casos utilizam-se os chamados métodos colorimétricos - o composto a quantificar é posto em contacto com um reagente específico, de modo a desenvolver uma cor cuja intensidade é directamente proporcional à concentração da substância na mistura original. Por exemplo, para quantificar proteínas numa solução pura pode medir-se a absorvância a 280 nm, sendo esta proporcional à concentração de proteína. Mas se

quisermos saber a concentração de proteína num extracto impuro, este método já não pode ser utilizado, porque outras substâncias, como por exemplo os ácidos nucleicos, também absorvem a este comprimento de onda. Neste caso podemos utilizar, por exemplo, o reagente de biureto, que reage de modo quantitativo com as proteínas, originando um complexo violeta, que absorve fortemente a radiação a 540 nm [6]

7.3 - Métodos usados em função da determinação analítica

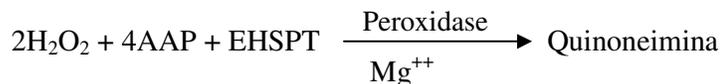
7.3.1. Ácido Úrico

Amostra; Soro /Jejum de 12 a 14 horas

O ácido úrico é um resíduo produzido durante a síntese hepática, resulta igualmente da degradação dos ácidos nucleicos de origem alimentar e celular. A sua eliminação é efectuada pelos rins e pelo intestino. A hiperuricémia está na origem, do desenvolvimento da artrite aguda recidivante, geralmente designada por gota [2].

Método

Determinação enzimática do ácido úrico de acordo com as seguintes reacções (método de trinder):



7.3.2. Albumina

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A albumina é a principal componente das proteínas plasmáticas, a sua função principal é a manutenção da pressão osmótica, assegura igualmente o transporte e a fixação de um elevado número de substâncias. Nos estados de desidratação é observado um aumento

relativo da albumina plasmática. As diminuições resultam de uma subnutrição, de uma alteração da síntese ou de um aumento de perda de albumina no organismo. O aumento da excreção urinária de albumina (microalbuminúria) precede e é indicativo de nefropatia diabética [2].

Método

Método colorimétrico com verde de bromocresol (BCG). A um pH de 4,20, o verde de bromocresol fixa-se selectivamente à albumina, apresentando uma coloração azul.

7.3.3. Alfa – Amilase

Amostra; Soro/ Não Necessita de Jejum

A medição da α -amilase no soro é utilizada principalmente no diagnóstico de distúrbios pancreáticos. Na pancreatite aguda, a actividade da amilase no sangue aumenta no espaço de algumas horas após o início das dores abdominais, e atinge o pico aproximadamente 12 horas depois, e regressa aos valores dentro do intervalo de referência, o mais tardar, após 5 dias. Níveis elevados de amilase podem também ser medidos na parotidite e na insuficiência renal [2].

Método

Teste fotométrico enzimático em que o substracto 4,6-etilideno-(G7)-p-nitrofenil-(G1)- α -D-maltoheptaoside (EPS-G7) é clivado pelas α -amilases em vários fragmentos. Estes últimos são ainda hidrolisados num segundo passo pela α -glucosidase produzindo glicose e p-nitrofenol. O aumento da absorvância representa a actividade da amilase total (pancreática e salivar) na amostra.



7.3.4. Bilirrubina Total

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A bilirrubina é um produto resultante da decomposição da hemoglobina, a hiperbilirrubinemia pode ser causada pela produção aumentada de bilirrubina devido á hemolise por lesões do parênquima hepático ou por oclusão dos canais colédocos. Uma hiperbilirrubinemia congénita crónica (predominantemente não conjugada), denominada síndrome de Gilbert, é muito frequente na população [2].

Método

Teste fotométrico utilizando 2,4-dicloroanilina (DCA).

A bilirrubina directa em presença da 2,4-dicloroanilina diazotizada forma um composto azotado de cor vermelha em solução acídica.

7.3.5. Bilirrubina Directa

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

Método

Teste fotométrico utilizando 2,4-dicloroanilina (DCA).

A bilirrubina directa em presença da 2,4-dicloroanilina diazotizada forma um composto azotado de cor vermelha em solução acídica.

7.3.6. Cálcio

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

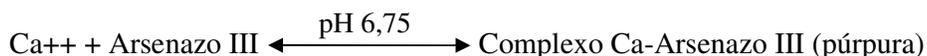
O cálcio desempenha um papel fundamental na contracção dos músculos e no metabolismo do glicogénio, na mineralização dos ossos, na coagulação do sangue e na transmissão dos impulsos nervosos. Os níveis reduzidos de cálcio total podem estar associados a doenças do sistema ósseo, doenças dos rins, deficiente absorção intestinal e

hipotireoidismo. O cálcio aumentado pode ser medido no hiperparatiroidismo, doenças malignas com metástases e sarcoidose [2].

Método

Vários métodos colorimétricos para a determinação do cálcio já foram utilizados no passado. Connerty e Briggs descreveram métodos que usavam alizarina 3-sulfonato e cresolftaleína complexona, enquanto Gindler e King descreveram um método que usava azul de timol.

Foram feitas várias modificações posteriores a estes métodos. O método utilizado baseia-se no metalocromogénio Arsenazo III. Os iões de cálcio (Ca^{2+}) reagem com o Arsenazo III (2,2`-[1,8-Diidroxi-3,6-disulfonaftileno-2,7-bizano]- ácido bisbenzenoarsónico) ao pH 6,75 para formar um cromóforo na coloração púrpura intensa. A absorvância do complexo Ca-Arsenazo III é medida bicromaticamente a 660/700 nm. O aumento resultante na absorvância desta mistura da reacção é directamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. O Arsenazo III possui alta afinidade ($K^{\circ} = 1 \times 10^{-7}$) com os iões de cálcio e não apresenta interferência de outros catiões normalmente presentes no soro, plasma ou urina.



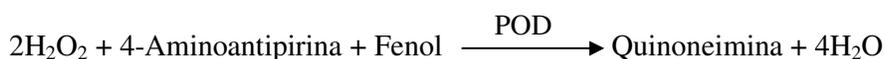
7.3.7. Colesterol

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

As determinações dos níveis de colesterol sérico são importantes no diagnóstico e classificação das hiperlipoproteinemias. Podem observar-se níveis altos de colesterol no hipotireoidismo, no síndrome nefrótico, na diabetes e em várias doenças hepáticas. Existe uma correlação entre o aumento dos níveis de colesterol no soro e a incidência de doenças das artérias coronárias [2].

Método

“CHOD-PAD”: Determinação do colesterol após a oxidação e a hidrólise enzimática. O indicador colorimétrico é a quinoneimina que é formada a partir de 4-aminoantipirina e fenol pelo peróxido de hidrogénio sob a acção catalítica da peroxidase (Reacção de Trinder).



7.3.8. Colesterol HDL

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

As lipoproteínas de alta densidade são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado. É clinicamente importante monitorizar o colesterol HDL no soro, dado que existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas do colesterol HDL e o risco de doença aterosclerótica [2].

Método

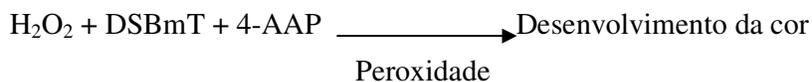
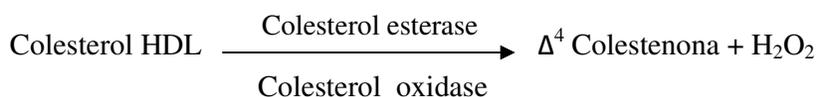
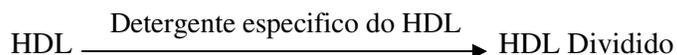
O ensaio ABX Pentra HDL Direct CP é um método homogéneo para medir directamente os níveis de HDL-C no soro ou no plasma, sem que haja necessidade de qualquer tratamento prévio ou de passos de centrifugação.

O método é um formato de dois reagentes e depende das propriedades de um único detergente, conforme ilustrado. Este método baseia-se em acelerar a reacção do colesterol oxidase (CO) com o colesterol não esterificado não-HDL e em dissolver selectivamente o HDL utilizando um detergente específico. No primeiro reagente, o colesterol não esterificado não-HDL é submetido a uma reacção enzimática e o

peróxido gerado é consumido por uma reacção de peroxidase com DSBmT dando origem a um produto incolor.

O segundo reagente consiste num detergente capaz de solubilizar o HDL especificamente, o colesterol esterase (CE) e o acoplador cromogénico de modo a desenvolver cor para a determinação quantitativa de HDL-C.

Isto pode ser referido como a metodologia Accelerator Selective Detergent (Detergente Selectivo Acelerador).



7.3.9. CK - Creatinina Fosfoquinase Total

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A creatinina fosfoquinase (CK) é uma enzima que consiste em isoenzimas principalmente do músculo (CK-M) e do cérebro (CK-B). Observam-se valores elevados de CK quando há lesões do músculo cardíaco e nas doenças do músculo-esquelético. A medição de CK é utilizada em particular juntamente com a CK-MB no diagnóstico e monitorização do enfarte agudo do miocárdio (EAM) [2].

Método

Teste UV otimizado de acordo com a Sociedade Alemã de Química Clínica (DGKC) e a Federação de Química Clínica (IFCC).



7.3.10. CK -MB

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A medição de CK-MB é um teste bastante específico para a detecção de lesões no músculo cardíaco e é, por conseguinte, utilizada no diagnóstico e monitorização do enfarte do miocárdio [2].

Método

Teste UV otimizado de acordo com a DGKC e a IFCC da CK com inibição de isoenzimas CK-M por anticorpos policlonais. A CK-MB é composta pelas sub-unidades CK-M e CK-B. Os anticorpos específicos da CK-M inibem a actividade completa da CK-MM (parte principal da actividade total da CK) e a sub-unidade CK-M da CK-MB. Apenas é medida a actividade da CK-B, que é metade da actividade da CK-MB.

7.3.11. Creatinina

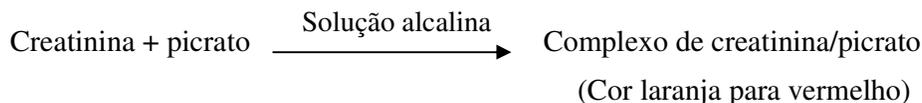
Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A creatinina é um produto de degradação formado pela desidratação espontânea de creatinina no organismo. Os níveis séricos de creatinina estão elevados em doentes com perturbações renais, principalmente naqueles com filtração glomerular diminuída [2].

Método

A creatinina reage com o picrato alcalino e produz um componente avermelhado (reação de Jaffé). A especificidade da medição foi melhorada pela introdução de um método cinético. No entanto, os antibióticos de cefalosporina ainda são as principais substâncias interferentes.

A cor vermelha obtida, medida a 500 nm por espectrometria, é directamente proporcional à concentração de creatinina presente na amostra.



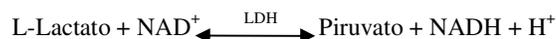
7.3.12. LDH – Lactato Desidrogenase

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A LDH é uma enzima composta por cinco isoenzimas diferentes que catalisam a interconversão do L-Lactato e piruvato. Detectam-se actividades aumentadas de LDH numa série de estados patológicos como no enfarte do miocárdio, doenças hepáticas, doenças hematológicas, cancro ou doenças musculares [2].

Método

Teste UV optimizado de acordo com a IFCC.



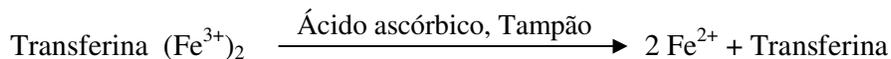
7.3.13. Ferro

Amostra; Soro/ Não necessita de Jejum

O ferro existe no organismo, como componente da hemoglobina e da mioglobina, bem como ligado à transferrina para o transporte no plasma, e armazenado na ferritina. As concentrações aumentadas de ferro ocorrem na hemacromatose e nas lesões hepáticas. A diminuição dos níveis de ferro pode ser causada por uma anemia devido a má absorção em consequência de doenças gastrointestinais, ou devido a perda de sangue resultante de lesões gastrointestinais ou de hemorragias menstruais [2].

Método

O ferro ligado à transferrina é libertado num meio ácido na forma de ferro férrico e é então reduzido para ferro ferroso na presença de ácido ascórbico. O ferro ferroso forma um complexo azul com o Ferene.



7.3.14. ALP – Fosfatase Alcalina

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A ALP, é uma enzima hidrolítica que actua de forma mais eficiente num pH alcalino, existe no sangue em numerosas formas distintas. Os aumentos fisiológicos são detectados durante o crescimento ósseo na infância e na gravidez, enquanto que os aumentos patológicos estão largamente associados às doenças hepatobiliares e ósseas [2].

Método

Teste cinético fotométrico, de acordo IFCC



7.3.15. Fósforo

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A maior parte do fósforo do organismo (80 a 85%) está presente nos ossos, sob a forma de hidroxiapatite. O restante está presente na forma de fosfato inorgânico e de ésteres de fosfato. Pode ser observado um aumento do fosfato sérico na hipervitaminose D, no hipoparatiroidismo e na insuficiência renal. Observam-se níveis reduzidos de fosfato sérico no raquitismo por deficiência de vitamina D, no hiperparatiroidismo e no síndrome de Fanconi [2].

Método

Método de U.V. com Fosfomolibdato.

O Fósforo inorgânico é doseado de acordo com a seguinte reacção:



7.3.16. GGT- Gama-glutamyltransferase

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

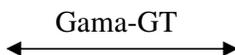
A GGT é uma enzima presente no fígado e no canal colédoco, sendo o indicador mais sensível das doenças hepatobiliares. Devido ao valor preditivo negativo elevado para estas doenças a medição de GGT é vastamente utilizada para excluir uma origem hepática ou biliar [2].

Método

Teste cinético fotométrico de acordo com Szasz modificado (1974).

A GGT, catalisa a transferência de ácido glutâmico para os receptores, como a glicilglicina, neste caso. Este processo liberta 5-amino-2-nitrobenzoato, que pode ser medido a 405 nm. O aumento da absorvância neste comprimento de onda está directamente relacionado com a actividade da GGT.

L-Gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida + Glicilglicina



Gama-glutamil-glicilglicina + 5-Amino-2-nitrobenzoato

7.3.17. Glucose

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

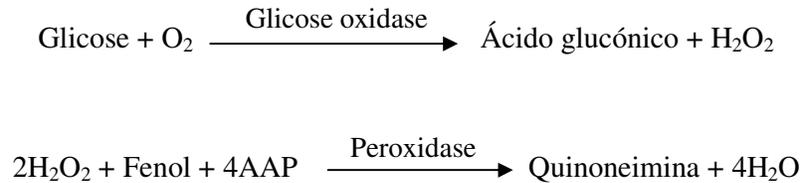
A glucose é o principal hidrato de carbono presente no sangue periférico. A oxidação da glucose constitui a principal fonte de energia celular do organismo. A glucose proveniente da dieta é convertida em glicogénio, para armazenamento no fígado ou em ácidos gordos, para armazenamento no tecido adiposo. A causa mais frequente de hiperglicemia é a diabetes mellitus, originada por um défice da secreção ou da acção da insulina. A hipoglicemia observa-se com menos frequência, podendo ser encontrada no insulinoma, o hipopituitarismo e a hipoglicemia induzida por insulina [2].

Segundo os últimos critérios da Direcção-Geral da Saúde, o diagnóstico da Diabetes Mellitus baseia-se na glicémia em jejum $\geq 126\text{mg/dl}$ ou sintomas clássicos com glicémia ocasional $\geq 200\text{mg/dl}$ ou glicémia $\geq 200\text{mg/dl}$, na PTOG com 75g de glucose, às 2 horas. A Tolerância Diminuída à Glucose apresenta glicémia de jejum $<126\text{mg/dl}$ e

às 2 horas (PTOG) ≥ 140 e < 200 mg/dl. A Anomalia da Glicémia de Jejum consiste na glicémia de jejum > 110 e < 126 mg/dl.

Método

Determinação enzimática da glicose de acordo com as seguintes reacções (método Trinder):



7.3.18 Magnésio

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A deficiência de magnésio é um distúrbio muito habitual e que pode ser causado por subnutrição, falta de absorção, perdas renais e distúrbios endócrinos. Valores elevados de magnésio podem observar-se na desidratação, nos distúrbios renais e depois da ingestão de quantidades excessivas de anti-ácidos [2].

Método

Teste fotométrico utilizando azul de xilidil. Os iões de magnésio formam um complexo colorido púrpura com azul de xilidil em solução alcalina. Em presença de GEDTA (Glicoleterdiamina-ácido tetraacético), que faz complexo com os iões de cálcio, a reacção é específica. A intensidade da cor púrpura é proporcional à concentração de magnésio.

7.3.19. PCR - Proteína C Reactiva

Amostra; Soro/ Não necessita de jejum

A PCR é uma proteína de fase aguda utilizada como um indicador de diagnóstico geral de infecções e inflamações, para além de auxiliar na monitorização do doente face á terapia ou cirurgia [2]. Na UPC, a análise da PCR é feita inicialmente por técnicas manuais (teste de aglutinação em latex) para despiste qualitativo, se o resultado for positivo é efectuada no analisador para a sua quantificação.

Método

Quando ocorre uma reacção Ag-Ac entre a PCR numa amostra e Ac anti-PCR que tenha sido sensibilizado às partículas de látex, dá-se a aglutinação. Esta aglutinação é detectada como uma alteração na absorvância, sendo a magnitude da alteração proporcional à quantidade de PCR presente na amostra. A concentração real é determinada por interpolação de uma curva de calibração preparada a partir de calibradores cuja concentração é conhecida.

7.3.20. PT - Proteínas Totais

A análise de PT é útil para monitorizar as alterações bruscas nos níveis de proteínas, causadas por vários estados induzidos por doenças. Encontram-se níveis aumentados em caso de desidratação, mieloma múltiplo e doenças crónicas do fígado, enquanto que os níveis reduzidos encontram-se em casos de doenças renais e de insuficiência hepática [2].

Método

Reacção biureto. As ligações de péptidos da proteína reagem com o cobre (Cu^{2+}) em solução alcalina para formar um complexo azul-violeta (a chamada reacção de Biuret), cada ião de cobre formando um complexo com 5 ou 6 ligações de péptidos. É adicionado tartarado como estabilizador enquanto que o iodeto é utilizado para evitar a auto-redução do complexo de cobre alcalino. A cor que se forma é proporcional à concentração de proteínas e é medida a 520-560 nm.

7.3.21. ALT- Alanina Aminotransferase

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A ALT está presente em vários tecidos. A principal fonte de ALT é o fígado, o que levou á determinação da actividade da ALT para o diagnóstico de doenças hepáticas. Observam-se níveis elevados de ALT no soro em patologias como, hepatite, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma hepático e abuso crónico do álcool. Em doentes com deficiência de vitamina B6, a actividade da aminotransferase sérica pode diminuir [2].

Método

Teste UV optimizado de acordo com o método modificado da IFCC sem piridoxal fosfato.



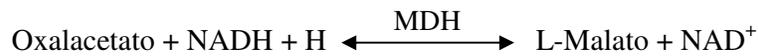
7.3.22. AST- Aspartato Aminotransferase

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A AST encontra-se amplamente distribuída nos tecidos, principalmente no tecido hepático, cardíaco, muscular e renal. As doenças hepatobiliares fazem subir os níveis séricos da AST. Após um EAM, a AST sérica aumenta e atinge um pico máximo de dois dias. Em doentes submetidos a diálise renal ou com deficiência de vitamina B6, a AST sérica pode ser baixa [2].

Método

Teste UV optimizado de acordo com o método modificado da IFCC sem piridoxal fosfato.



7.3.23. Transferrina

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A transferrina é a principal proteína plasmática responsável pelo transporte de ferro. A sua concentração determina a capacidade total de ligação ao ferro no soro. A sua determinação é essencial para diagnosticar e monitorar anemias causadas por deficiências de ferro [2].

Método

O plasma ou soro humano é misturado com a solução de Ac`s. Os complexos imunes resultantes são medidos turbidimetricamente. O sinal gerado está em correlação directa com a concentração de transferrina na amostra. A concentração de transferrina na amostra é calculada por comparação dos resultados numa curva standard.

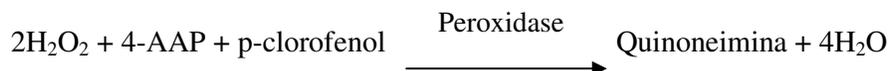
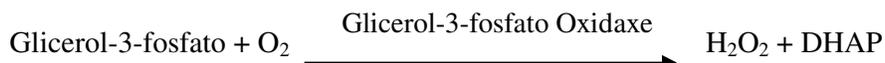
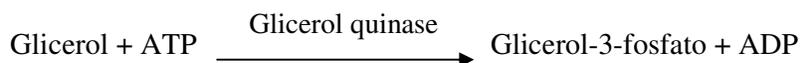
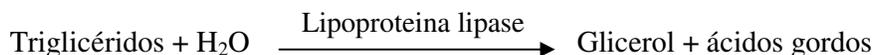
7.3.24. Triglicéridos

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

Os triglicéridos são os principais lípidos presentes no plasma humano, formam-se na mucosa intestinal, através da esterificação do glicerol e dos ácidos gordos livres. Os níveis elevados de triglicéridos têm sido associados a um risco elevado de aterosclerose grave. A existência de níveis elevados de triglicéridos e de hiperlipidemia em geral pode ser uma característica herdada ou um efeito secundário de doenças como a diabetes mellitus, a nefrose, a obstrução biliar e de perturbações metabólicas associadas a distúrbios endócrinos [2].

Método

Determinação enzimática dos triglicéridos de acordo com as seguintes reacções:



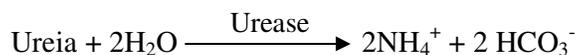
7.3.25. Ureia

Amostra; Soro/ Jejum de 12-14 horas

A ureia é o principal produto final, do catabolismo das proteínas. É sintetizada no ciclo da ureia no fígado a partir da amónia, que é produzida por desaminação dos aminoácidos. A ureia é principalmente excretada pelos rins, mas também pelo suor em quantidades mínimas, sendo degradada nos intestinos por acção bacteriana. Os estados associados a níveis elevados de ureia no sangue são referidos como hiperuremia ou azotemia. A determinação paralela da ureia e creatinina é efectuada para diferenciar no diagnóstico dos três tipos de azotemia: pré-renal, renal e pós renal. Os aumentos na concentração de ureia no sangue são observados nos casos de perfusão renal inadequada, choque, diminuição do volume sanguíneo (causas pré-renais), nefrite crónica, nefrosclerose, necrose tubular, nefrite glomerular (causas renais) e obstrução do aparelho urinário (causa pós-renais). Podem também ser observadas subidas transitórias durante períodos de ingestão proteica elevada. Ocorrem níveis imprevisíveis nas doenças hepáticas [2].

Método

Urease – GLDH: teste UV enzimático.



7.4 - Controlo de qualidade interno no analisador ABX Pentra 400

O controlo de qualidade interno é realizado diariamente antes do processamento das amostras. Os controlos encontram-se já liofilizados (prontos a usar), sendo processados de acordo com as instruções do fabricante e da mesma forma que as amostras dos doentes. Em todos os parâmetros são avaliados 2 níveis de controlo – ABX Pentra control High (controlo patológico) e ABX Pentra control normal, sendo que cada um deles é realizado em dias alternativos.

Existem controlos específicos para determinadas técnicas como CKMB, PCR e colesterol HDL, enquanto que existem técnicas diferentes em que um controlo é comum para todas elas. No aparelho ABX Pentra 400 só se trabalha com um intervalo de dois desvios padrão de forma a reduzir a probabilidade de ocorrer resultados não confiáveis.

O equipamento ABX Pentra 400 tem instalado um programa de controlo da qualidade onde estão configurados os limites aceitáveis de erro. Estes valores correspondem á média (\bar{x}) e mais ou menos dois desvios padrão. Os valores de controlo obtidos são aceites automaticamente pelo aparelho, se estiverem dentro dos desvios padrão pré-estabelecidos. Os valores de controlo fora do intervalo permitido são assinalados com um asterisco. As regras de acordo com Westgard, estão implementadas no software e os gráficos são apresentados sobre cartas de Levey-Jennings.

A calibração é executada com a utilização de um multicalibrador, ou com um calibrador específico no caso do CKMB, proteínas totais e colesterol HDL/LDL. A calibração é efectuada sempre que, uma técnica não esteja dentro dos intervalos de referência ou ocorra mudança de lote ou padrão.

8 – Ionograma

Amostra; Soro ou plasma (heparina de lítio)

No soro existem diversos electrólitos, positivos como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , ou negativos como o Cl^- , HCO_3^- e fosfatos. Os seus valores são mantidos em níveis relativamente constantes, pelo que alterações aos valores normais podem indicar situações patológicas.

O Na^+ , é o principal catião responsável pela manutenção da osmolaridade extracelular. A hipernatrémia pode resultar de um fornecimento excessivo de sódio (por exemplo, por ingestão de água do mar), mas em geral reflecte uma desidratação. A hiponatrémia, pode ser devida a perdas urinárias (por exemplo, dosagem excessiva de diuréticos) ou digestivas (vómitos repetidos, diarreia abundante) [5].

As variações do Cl^- e do bicarbonato estão frequentemente interligadas, assim o excesso de Cl^- ocorre quando há excesso de Na^+ , o Cl^- aumenta proporcionalmente. No entanto o Cl^- pode estar anormalmente elevado e o Na^+ normal, por exemplo para compensar perdas do ião bicarbonato (HCO_3^-), por exemplo se houver uma perda digestiva de bicarbonatos (diarreias abundantes, aspirações digestivas). O valor baixo de Cl^- , pode estar associado a uma baixa de Na^+ . Mas também pode existir independentemente, por exemplo quando há acidose metabólica devido ao aumento de outros aniões (ex., lactato, acetoacetato) [5].

O potássio intervém num grande número de processos bioquímicos da célula e é indispensável à manutenção da pressão osmótica celular. A hipercaliémia, resulta quer de uma diminuição da excreção urinária do potássio, quer de uma transferência do

potássio celular para o plasma, a causa mais frequente é a insuficiência renal aguda, qualquer que seja a sua origem. A hipocaliémia, resulta ou de uma depleção do potássio devida a perdas digestivas (p. ex., vômitos, aspirações gástricas) ou urinárias (p. ex., por toma de diuréticos em excesso) [5].

8.1 – Ionograma - Automatização

Concebido para uma utilização rápida e eficiente o SpotLyte 400 (figura 9) permite efectuar análises com precisão, para o diagnóstico e monitorização dos doentes. O SpotLyte é um analisador automático controlado por microprocessador, para medição do sódio, potássio, cloro e lítio no soro, plasma e na urina (a análise de lítio na urina não é aplicável). Eléctrodos selectivos de iões, da mais avançada tecnologia, medem os teores em sódio, potássio e cloro ou lítio contidos na amostra. A análise é efectuada em cerca de 55 segundos e requer apenas 100 µl de soro, plasma ou sangue total, ou 400 µl de urina diluída. Os resultados são automaticamente apresentados no ecrã, a calibração é automática podendo ser, contudo, efectuada pelo operador manualmente.



Figura 9 – Analisador automático SPOTLYTE 400

8.2 – Fundamento do Método

O SpotLyte utiliza como método de análise a potenciometria. Esta técnica consiste na medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos numa célula electroquímica. Um eléctrodo consiste num condutor metálico em contacto com uma solução electrolítica [2]. Os eléctrodos selectivos são sensores com capacidade para medir directamente fluidos biológicos. Os eléctrodos selectivos de iões medem sódio, potássio e cloro. O potencial de cada eléctrodo é medido relativamente a um eléctrodo de voltagem estável fixa por cloreto de prata, o eléctrodo de referência. Um eléctrodo selectivo de ião desenvolve uma voltagem que varia com a concentração do ião ao qual responde. A relação entre a voltagem desenvolvida e a concentração do ião detectado é logarítmica, sendo expressa pela equação de Nernst.

8.3 - Controlo de qualidade interno no analisador SpotLyte 400

Os controlos internos do SpotLyte são processados semanalmente para verificar a exactidão e a precisão do analisador, existem dois níveis de controlo (normal e patológico) que são efectuados em alternância. Quando o SpotLyte está calibrado e os resultados de controlo de qualidade estão dentro dos limites especificados, os resultados obtidos são fiáveis. Por outro lado, quando os valores de controlo estão fora dos valores limite recomendados, não se prossegue para análise das amostras até o aparelho estar correctamente calibrado e controlado. Os dados podem ser armazenados em memória, para análise estatística posterior.

9 – Hemoglobina Glicada – H_bA_{1c}

A determinação dos produtos de glicosilação é um teste de rotina efectuado através da dosagem da H_bA_{1c} (Hemoglobina glicada), a qual é utilizada para avaliação do controle metabólico nos doentes diabéticos. A H_bA_{1c} é formada através de uma reacção

irreversível entre a glucose sanguínea e o aminoácido valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A. A H_bA_{1c} representa aproximadamente 80% da fracção das hemoglobinas A1, também chamadas de rápidas, sendo esta denominação devido ao resultado no processo de separação electroforética. Num indivíduo não-diabético, cerca de 4% a 6% do total de H_bA_{1c} apresenta-se glicada, enquanto que no diabético com um descontrolo acentuado, esta percentagem pode atingir níveis duas a três vezes acima do normal. Níveis de H_bA_{1c} acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crónicas. Por isso, o conceito actual de tratamento da diabetes por objectivos, define 7% como o limite superior, acima do qual está indicada a revisão da terapia [1].

Os níveis de H_bA_{1c} resultam de todos os GV circulantes no organismo nos últimos 120 dias, desta forma, reflecte na realidade a média ponderada dos níveis da glicemia entre os 60 a 90 dias antes da análise. Patologias que alterem a vida média dos GV (e consequentemente da hemoglobina) alteram os resultados da H_bA_{1c} realizados por qualquer metodologia. As doenças que cursam com anemia hemolítica ou estados hemorrágicos podem resultar em valores inapropriadamente diminuídos de H_bA_{1c} por encurtarem a sobrevida dos GV, por outro lado patologias que aumentam a vida média dos GV, como as anemias por carência de ferro, vitamina B12 ou folatos, podem resultar em valores inapropriadamente elevados.

A determinação dos níveis da H_bA_{1c} é a melhor análise para a avaliação do controlo da glicemia a médio e longo prazo. Os testes de H_bA_{1c} devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano em todos os doentes diabéticos e quatro vezes por ano (a cada três meses) por doentes que se submeterem a alterações do esquema terapêutico ou que não atingiram os objectivos recomendados com o tratamento efectuado [1].

9.1 - Hemoglobina Glicada – Automatização

Amostra; Plasma com EDTA/ Não necessita de jejum

O equipamento para a determinação da H_bA_{1c} (figura 10) é completamente automatizado e usa a metodologia - HPLC (High-performance liquid chromatography)

de troca iónica, este método separa as variantes de hemoglobina baseado na carga. Uma vez que a HbA_{1c} contém um menor número de cargas positivas relativamente à HbA , a ligação à coluna é menos eficiente (resina com carga negativa), portanto é eluída primeiro. Um segundo tampão é utilizado para eluir a HbA e a absorvância destas duas substâncias eluídas é utilizada para calcular a percentagem de HbA_{1c} total.

Em todos os métodos de coluna de troca iónica, é importante controlar a temperatura dos reagentes e das colunas, para obter resultados precisos e reproduzíveis.



Figura 10 - Analizador Automático
Hi-auto A1cHA-8140

9.2 - Controlo de Qualidade Interno no analisador Hi-autoA1cHA-8140

O controlo de qualidade interno, é efectuado semanalmente e sempre que se realiza uma nova calibração, troca de reagente, manutenção ou correcção de um problema, apresenta valores conhecidos de HbA_{1c} , de forma a comparar-se os resultados obtidos com os esperados.

10 – Electroforese das Proteínas

A electroforese é uma técnica, que se baseia na separação de proteínas, que apresentam cargas eléctricas definidas por pH específicos.

É de grande importância conhecer e interpretar correctamente a electroforese das proteínas, uma vez que este exame facilita o diagnóstico de diversas patologias, possui baixo custo e é de fácil procedimento técnico. Apesar da sua finalidade não ser identificar proteínas específicas (uma vez que cada fracção representa um conjunto de diversas proteínas), a informação das proteínas presentes em cada fracção proteica, facilita o raciocínio clínico e auxilia no diagnóstico de doenças que possuem padrões electroforéticos característicos [2].

As alterações na fracção da albumina ocorrem devido a um desequilíbrio directo ou indirecto da sua síntese, por diminuição da ingestão ou perda através de proteinúria. A fracção alfa globulina apresenta níveis aumentados em todos os processos inflamatórios, infecciosos e imunes. O aumento da beta globulina pode ser encontrado na anemia ferropénica por aumento da síntese da transferrina, por uma alteração no metabolismo dos lípidos, ou por dificuldade na excreção biliar, verificada na colestase, e a queda desta fracção pode ter valor prognóstico nos processos de evolução crónica. A fracção gama globulina apresenta taxas aumentadas todas as vezes que se verifica uma reacção inflamatória, imune ou infecciosa, no entanto este aumento dá-se de forma policlonal. Ocorre um aumento desta fracção de forma monoclonal presente em doenças linfoproliferativas, tais como o mieloma múltiplo. A hipogamaglobulinemia é verificada em anomalias congénitas ou secundária à utilização de corticóides, terapia imunossupressora, quimioterapia ou radioterapia [5].

10.1 – Electroforese das Proteínas – Automatização

Amostra; Soro/Jejum de 12-14 horas

A electroforese de zona em acetato de celulose efectuada pelo equipamento automático Génio S, (figura 11) ocorre em várias etapas: aplicação das amostras, migração, coloração, descoloração, diafanização, secagem e leitura pela luz de digitalização. As

proteínas são separadas a um pH alcalino (8,9) utilizando o princípio de electroforese de zona em suporte adequado, acetato de celulose. O tampão confere carga negativa às proteínas e determina a passagem de corrente. A fase, separativa, consiste na migração das proteínas no sentido do cátodo para o ânodo a diferentes velocidades, quando sujeitas a um campo eléctrico. A mobilidade da albumina é superior à da alfa 1 globulina, seguindo-se a alfa 2, beta e por último a fracção gama, permitindo assim separar as várias fracções. Quando a migração está completa, as proteínas são então sujeitas a um processo de coloração com Vermelho S de Ponceau. O corante, Ponceau S, cora as fracções proteicas de vermelho, tendo igual afinidade para todas as fracções. A coloração só é possível em meio fortemente ácido. Os banhos com descolorante permitem a descoloração de tudo o que não seja proteínas. A tira é então sujeita a uma leitura por densitometria e os resultados apresentados graficamente. Os resultados são obtidos em percentagem, percentagem essa que é em função da área corada e da intensidade da cor.



Figura 11 – Analisador automático Genio S

10.2 – Controlo de qualidade Interno no analisador Genio S

O controlo interno, é processado semanalmente juntamente com as amostras, caso os valores de controlo se encontrem dentro dos limites de referência esperados, os resultados das amostras são validados, pelo contrário, se os valores de controlo não estiverem conformes, as amostras não poderão ser validadas, tendo que se substituir os

reagentes, se este último procedimento não resultar, terá de se prosseguir para a calibração do aparelho.

11 - Análise Sumaria da Urina

A análise sumaria da urina ou urianálise compreende a avaliação visual da cor e aspecto da amostra da urina, a detecção de determinadas substâncias usando tiras teste e o exame microscópico do sedimento urinário. Este exame permite detectar doença renal, patologia do tracto urinário ou sistémica que se manifesta através do sistema urinário [1].

Os principais erros na análise sumária da urina incluem, tipo de amostra inadequada para o exame a ser realizado, frascos de colheita desapropriados, atraso no transporte, falta de homogeneização das amostras, cuidados inapropriados com os reagentes, uso de técnicas inadequadas, desconhecimento do papel dos interferentes e não correlacionar todos os parâmetros analíticos em conjunto.

11.1 – Análise sumária da urina - Automatização

O Aution Jet, (Figura 12) é um analisador semi-automático de última geração usado na UPC para a realização do exame físico e químico da urina, assegura a máxima precisão na medição dos parâmetros físico-químicos, sendo capaz de detectar 23 tons de cor diferentes.

O Aution Jet é um fotómetro de reflectância, os resultados dos testes baseiam-se na leitura da intensidade de luz reflectida pela tira teste. A cabeça de leitura contém díodos de emissão de luz (LED) de três comprimentos de onda diferentes. A leitura inicia-se na placa de referência, que é utilizada para testar o sistema óptico. A luz reflectida é medida electro-ópticamente. Um LED transmite luz com um comprimento de onda definido, num ângulo ideal, para a superfície de uma banda reactiva. A luz incide na superfície da banda reactiva e é reflectida com uma intensidade que depende da cor da banda reactiva. Um detector de fotodíodo, situado directamente acima da banda

reactiva, recebe a luz reflectida. Um detector de fotodíodo recebe a luz reflectida e transmite um sinal eléctrico analógico para o conversor analógico-para-digital, o qual converte o sinal analógico num valor digital. Um microprocessador ajusta o valor digital, com base num valor de uma placa de referência interna e converte-o num valor relativo utilizando uma escala padronizada de calibração. O microprocessador calcula um valor de reflectância. O resultado semi-quantitativo da concentração é determinado, comparando o valor da reflectância com o valor dos limites de intervalo.



Figura 12 – Analisador semi-automático AUTION-JET

➤ Exame macroscópico da urina

Cor

A cor habitual da urina é amarelo citrino, que se deve, em maior parte, a um pigmento denominado de urocromo. A excreção deste pigmento é proporcional á taxa metabólica e encontra-se aumentada em estados febris. Esta coloração pode apresentar variações em situações de diluição por ingestão de uma grande quantidade de líquidos, que torna a urina mais clara (amarelo pálido); ou de privação de líquidos em que aparece mais escura. Este parâmetro pode servir para uma avaliação indirecta do grau de hidratação e da capacidade de concentração urinária. A ingestão de alguns corantes alimentares e de substâncias químicas também podem conferir á urina uma coloração diferente.

Aspecto

O aspecto normal da urina é límpido. Uma ligeira turvação pode resultar da;

- Precipitação de cristais e sais amorfos não patológicos;
- Presença de leucócitos;

- Presença de um elevado número de células epiteliais e de GV;
- Crescimento bacteriano;
- Presença de esperma ou secreções prostáticas;
- Presença de muco que pode encontrar-se aumentado em condições inflamatórias do tracto urinário inferior ou genital;
- Presença de linfa que está associada à obstrução do fluxo linfático ou ruptura dos vasos linfáticos nos ureteres, bexiga ou uretra. A urina pode ter um aspecto normal, opalescente ou leitoso de acordo com a quantidade de linfa presente;
- Presença de lipidúria.

➤ Análise química da urina

pH

A urina é naturalmente ácida, variando entre 5,5 e 7,0. Valores superiores ou iguais a 7 podem indicar presença de bactérias tornando a urina alcalina. Valores menores que 5,5 podem indicar acidose no sangue ou doença nos túbulos renais.

O pH é determinado por intermédio dos indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol, que reagem especificamente com os iões H⁺.

Leucócitos

Um dos parâmetros mais frequentes no exame sumário da urina é a presença de leucócitos, que indicam uma possível infecção do tracto urinário.

Os leucócitos são revelados pela presença das esterases granulocitárias, as quais decompõem um éster indoxílico em indoxil, que reage com o sal de diazónio, produzindo um corante violeta.

Proteínas

A presença de proteinúria muitas vezes encontra-se associada a doenças renais, o que torna este parâmetro muito importante no exame sumário da urina. Uma urina não patológica, possui quantidades muito pequenas de proteínas, inferiores 10 mg/dl. As principais causas patológicas de proteinúria são; lesão da membrana glomerular, distúrbios que afectam a reabsorção tubular das proteínas filtradas e aumento dos níveis séricos de proteínas de baixo peso molecular.

O teste para detecção de proteínas baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH.

Nitritos

A pesquisa de nitritos é útil na detecção da infecção inicial da bexiga (cistite), pois muitas vezes estas infecções são assintomáticas ou ligeiramente assintomáticas, o que levaria o médico a solicitar a cultura da urina, o que não se justifica em caso de cistite. A pielonefrite, processo inflamatório dos rins e pelve renal adjacente, é uma complicação frequente da cistite não tratada, que pode levar à lesão dos tecidos renais, com comprometimento da função renal, hipertensão e até mesmo septicemia.

O teste para nitritos é baseado na prova de Griess.

Glucose

A detecção de glucose na urina (glicosúria) quando associada a um aumento de glicemia no sangue, possui uma elevada utilidade na detecção e controlo da *Diabetes Mellitus*. Porém, a glicosúria pode não estar acompanhada de hiperglicemia, sendo esta situação observada em patologias que afectam a reabsorção tubular, na presença de lesões do sistema nervoso central e distúrbios da tiróide. Muitas mulheres grávidas que fazem diabetes gestacional, apresentam glicosúria durante o terceiro trimestre da gestação, necessitando de monitorização cuidadosa de modo a se determinar a existência de diabetes.

A determinação da glucose é baseada na reacção específica da glucoseoxidase/peroxidase (método GOD/POD).

Corpos cetónicos

O termo corpos cetónicos, engloba três produtos intermediários do metabolismo das gorduras, a acetona, o ácido acetoacético e o ácido β -hidroxibutírico. A determinação de cetonúria é útil no acompanhamento e monitorização da *Diabetes Mellitus*, demonstrando uma deficiência no tratamento com insulina que indica a necessidade de regular a dosagem. O aumento excessivo de cetonas no sangue, provoca: o desequilíbrio electrolítico, desidratação e finalmente o coma diabético.

O teste para os corpos cetónicos baseia-se no princípio da prova de Legal.

Urobilinogénio

O aumento da quantidade de urobilinogénio na urina, pode ser observado nas hepatopatias e nos distúrbios hemolíticos. O comprometimento da função hepática provocado pela hepatite e pela cirrose, diminui a capacidade hepática de processar o urobilinogénio proveniente do intestino pela circulação, como resultado o urobilinogénio excedente que fica no sangue é filtrado pelos rins. A medição da quantidade de urobilinogénio urinário, pode ser útil na detecção precoce de hepatopatias.

O urobilinogénio reage com um sal de diazónio originando um corante azóico.

Bilirrubina

A bilirrubina conjugada aparece na urina, quando o seu ciclo normal de degradação é interrompido por obstrução do ducto biliar ou quando o fígado se encontra lesado, o que permite o seu extravasamento para a circulação. A hepatite e a cirrose são exemplos comuns de condições que produzem lesão hepática resultando em bilirrubinúria.

A bilirrubina, reage com um sal de diazónio originando um corante azóico.

Hemoglobina

A presença de hemoglobinúria ou hematúria, pode estar relacionada com inúmeros estados patológicos, entre os quais;

- Hematúria – pielonefrite, glomerulonefrite, tumores, cálculos renais, trauma, exposição a produtos químicos ou a drogas tóxicas e exercício físico intenso.
- Hemoglobinúria – infecções, queimaduras graves, reacções transfusionais, anemia hemolítica e exercício físico intenso.

A hemoglobina catalisa a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona teste, originando uma coloração azul-esverdeada.

➤ Exame microscópico - sedimento urinário

O sedimento urinário é obtido após a centrifugação da urina, em condições normais é possível encontrar uma quantidade limitada de GV, de glóbulos brancos, de algumas células provenientes do epitélio das vias urinárias e uma reduzida quantidade de cristais

de urato de sódio. Considera-se anormal a detecção de um número elevado de GV, de glóbulos brancos e de cristais de diversos tipos.

Os cilindros são formados quando as proteínas se acumulam e precipitam no interior dos túbulos renais e formam um gel que posteriormente será arrastado pela urina. Os tipos de cilindros que podem ser observados são, cilindros hemáticos, leucocitários, epiteliais, granulados, hialinos, tubulares, cristalinos, celulares e cilindros cerosos.

Os cristais observados na urina ácida são, cristais de ácido úrico, uratos amorfos, oxalato de cálcio e cistina. A presença de fosfatos amorfos e fosfato triplo estão presentes na urina alcalina.

Poderão ser ainda visualizados no sedimento urinário, bactérias, leveduras, parasitas, espermatozóides e muco.

11.2 – Controlo de qualidade Interno no analisador Aution-Jet

O controlo interno é realizado com tiras Control-Test realizadas uma vez por semana que asseguram o bom funcionamento do equipamento garantindo resultados confiáveis.

12 – Automatização em Imunologia – Imunoanalisador Vidas

O VIDAS é um imunoanalisador automático multi-paramétrico, (figura 13) que inclui um módulo analítico, um computador e uma impressora. O módulo analítico executa automaticamente todas as etapas da análise, incluindo a impressão dos resultados. Contém cinco secções, cada uma delas com a capacidade de 6 testes, efectuando 30 testes por hora. As análises podem ser realizadas teste a teste ou em série.



Figura 13 – Imunoanalisador automático VIDAS

12.1 - Ensaio imuno - enzimático fluorescente (ELFA)

O imunoanalisador Vidas permite a determinação imunoenzimática no soro ou no plasma (heparina de lítio) pela técnica ELFA em que ocorre a visualização da reacção Ag-Ac por meio de uma reacção colorimétrica. O método de ELFA permite dosear Ac`s ou Ag`s procedendo à marcação de um deles com uma enzima. A actividade final é avaliada pela adição de um substracto sobre o qual a enzima de marcação vai actuar dando origem a um cromogéneo. O imunoanalisador Vidas associa o método imunoenzimático por competição e o método imunoenzimático por sandwich com uma detecção final em fluorescência. Abaixo descrevem-se os fundamentos de ambos os métodos, bem como os diversos parâmetros analisados no equipamento.

Métodos Imunoenzimáticos por sandwich com detecção final em fluorescência

Neste tipo de método, a substância a dosear, presente na amostra, é capturada pelos Ac`s específicos da mesma, fixados no cone. Uma segunda imunoglobulina conjugada com ALP ligar-se-á ao Ag, ligado ao Ac do cone, formando uma “sandwich”. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Durante a etapa final de revelação, o substracto (4- metil-umbeliferil fosfato) é hidrolisado, pela enzima do conjugado, em (4- metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a um comprimento de onda de 450 nm.

Parâmetros analisados:

12.1.1. TSH - Hormona Estimulante da Tiróide

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A produção de TSH é assegurada pelas células tirotróficas da hipófise anterior. A sua secreção na circulação sanguínea segue um ritmo circadiano que atinge o máximo entre a 1 e 2 horas da manhã. A TSH constitui o principal factor de estimulação da glândula da tiróide que determina a produção das hormonas T3 e T4. Em contra partida, estas hormonas exercem um retrocontrolo na hipófise anterior que trava a secreção de TSH. No caso de hipertiroidismo (doença de Basedow, adenomas tiroidianos, tiróides inflamatórias), a concentração de TSH diminui fortemente podendo ser mesmo indetectável. Em raras formas de hipertiroidismo de origem alta, o retrocontrolo negativo das hormonas tiroideias não produz efeito e a taxa de TSH não diminui. Nos casos de hipotiroidismo primitivo franco, a concentração de TSH é sempre nitidamente muito superior ao normal, acompanhada de uma diminuição das taxas em hormonas da tiróide [5].

12.1.2. Anticorpo anti-HBs

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

O vírus da hepatite B é responsável por hepatites agudas e crónicas que podem conduzir à cirrose e ao cancro primário do fígado. A cronicidade aparece em 5% a 10% dos casos no adulto, enquanto que nas crianças pode ir até aos 90% em consequência de uma transmissão perinatal. O vírus da hepatite B pode ser transmitido por via parenteral, perinatal e sexual. Após uma exposição ao vírus da hepatite B, o Ag HBs aparece vários dias a várias semanas e pode persistir durante vários meses, a infecção nestes casos é considerada “crónica”. O desaparecimento do Ag HBs é habitualmente seguido do aparecimento de Ac`s anti-HBs, sinal de cura. Neste caso, a presença de Ac`s anti-HBs está associada à dos Ac`s anti-HBc [1].

12.1.3. HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

Os HIV são *retrovirus* RNA transmitidos principalmente por via sexual, parenteral, perinatal e transplacentária. O diagnóstico de uma infecção pelo HIV baseia-se na detecção de Ac's séricos anti-HIV. No entanto, existe um período de 3 semanas em média entre a contaminação e o aparecimento dos primeiros Ac's. Estudos demonstraram que durante este período, o Ag p24 do HIV-1 esta presente na maioria dos doentes infectados por HIV-1. A detecção combinada da antigenemia p24 e dos Ac's anti-HIV-1 e anti-HIV-2 permite reduzir o intervalo de tempo entre a contaminação e o diagnóstico da infecção [1].

12.1.4. CA 19.9 – Antígeno Carbohidrato

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

Os valores de CA 19-9 encontram-se frequentemente aumentados nos casos de cancro do pâncreas, colorectal, entre outros, mas também em algumas patologias não malignas. Os valores do teste CA 19-9 podem diminuir depois do tratamento e aumentar no caso de uma recaída, doença residual ou metástases. Uma diminuição dos valores de CA19-9 pode ser indicação de uma boa resposta ao tratamento, e portanto de um bom prognóstico [5].

12.1.5. CEA - Antígeno Carcinoembrionário

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é produzido pelas células durante a vida embrionária e fetal, sendo a sua produção interrompida com o nascimento. Pode detectar-se uma taxa sérica muito baixa em indivíduos sem qualquer patologia. Pode detectar-se um aumento da taxa de CEA, no caso de aparecimento de alguns cancros (colo-rectal, mama, pulmão, entre outros), mas também em algumas patologias não

malignas. A taxa sérica de CEA diminui após o tratamento e aumenta em caso de recaída, doença residual e metástases. O teste CEA permite avaliar a eficácia da terapêutica, bem como diagnosticar recidivas para possível decisão de nova intervenção [5].

12.1.6. TPSA/ FPSA - Antígeno Específico da Próstata Total/Livre

Amostra; Soro ou plasma EDTA ou heparina de lítio

O PSA é produzido principalmente pelo epitélio glandular da próstata e segregado no líquido seminal. O PSA encontra-se no sangue sob três formas principais. A forma imuno-reactiva mais importante é o PSA ligado á alfa-1-antiquimiotripsina. O PSA livre é outra forma imuno-reactiva presente no soro. A terceira maior forma do PSA, complexada com a alfa-2-macroglobulina, não é detectável com os imunodoseamentos. O aumento da taxa de PSA está associado às patologias prostáticas tais como hiperplasia benigna da próstata ou cancro da próstata. O doseamento do PSA e a sua evolução são úteis para o seguimento e controlo da eficácia do tratamento de um carcinoma. A percentagem de PSA livre no soro é descrita como significativamente mais elevada nos pacientes com uma hiperplasia benigna da próstata do que nos pacientes com cancro da próstata [5].

12.1.7 FSH - Hormona Folículo Estimulante

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A FSH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior sob controlo do hipotálamo. É assegurado um retrocontrolo negativo principalmente pela inibina, cuja produção é estimulada pela FSH. No homem a FSH exerce a sua acção em algumas células do tubo seminífero e células de Sertoli. Na mulher em idade fértil, a FSH em sinergia com a LH (hormona luteinizante), intervêm directamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos aumentando a sua produção esteroideia, e determina a sua ovulação. O doseamento da FSH associado ou não ao da LH, é um

parâmetro essencial da exploração da função de reprodução. Tanto no homem como na mulher amenorreica, taxas elevadas evidenciam um hipogonadismo primário e taxas baixas devem levar à pesquisa de um hipogonadismo secundário [5].

12.1.8. LH - Hormona Luteinizante ou Leteotropina

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A LH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior, sob controlo do hipotálamo. Uma regulação negativa é assegurada pelas hormonas esteróides, cuja produção é estimulada pela LH: testosterona no Homem, estradiol na mulher. No homem, a LH exerce a sua acção nas células de Leydig do testículo, estimulando assim a produção de testosterona. Na mulher, em idade fértil, a LH em sinergia com a FSH intervém directamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos aumentando a sua produção esteroidiana, e determina a ovulação. Na menopausa, a produção de estradiol diminui provocando o aumento da taxa sérica de LH. O doseamento da FSH associado ou não ao da LH, é um parâmetro essencial da exploração da função de reprodução [5].

12.1.9. Prolactina

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A prolactina é segregada de forma pulsátil (todos os 20 minutos) e segue um ritmo circadiano, sendo os níveis mais elevados atingidos durante o sono. Fisiologicamente, a secreção em prolactina é controlada pelo hipotálamo. A dopa mina e o GABA (ácido γ -aminobutírico) são os principais inibidores. Factores exógenos como o exercício físico, o stress, o jejum, a hipoglicémia, podem ser responsáveis por um aumento da taxa de prolactina. O principal papel fisiológico da prolactina na mulher dá-se no início e durante o aleitamento. Está também implicada na maturação folicular e no desenvolvimento dos ovócitos. No Homem, tem acção ao nível das gónadas. A

hiperprolactinemia foi reconhecida como uma causa de infertilidade no homem e na mulher [5].

12.1.10. Ferritina

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A ferritina é a forma de armazenamento do ferro mais distribuída no corpo humano. As suas moléculas encontram-se nas células do sistema reticulo-endotelial, mais particularmente no fígado e baço. A anemia causada pela falta de ferro é uma doença comum que pode ser explicada por uma administração muito pobre em ferro, por uma gravidez, hemodiálise ou uma doação de sangue. A queda do nível de ferritina sérica pode ser um sinal de um défice em ferro precedente ao aparecimento da anemia. A detecção de um nível insuficiente de ferritina permite, portanto, um tratamento antecipado. Além disso, a sobrecarga férrica é característica de doenças como a talassemia e a anemia sideroblástica [5].

Métodos Imunoenzimáticos Competitivos com detecção final em fluorescência

A amostra é inicialmente inserida num poço que contém o conjugado – derivado da substância que se pretende dosear, marcado com ALP. Há, então, uma competição entre a substância presente na amostra e o conjugado, em relação aos locais de ligação aos Ac's específicos dos mesmos, fixados no cone. As etapas de lavagem eliminarão os componentes não ligados. Durante a etapa final de revelação, o substracto (4- metil-umbeliferil fosfato) é hidrolisado, pela enzima do conjugado, em (4- metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a um comprimento de onda de 450 nm.

Parâmetros analisados;

12.1.11. Estradiol

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

O estradiol é libertado principalmente pelos folículos dos ovários durante o ciclo menstrual feminino e pela placenta no decorrer da gravidez. Numa escala mais baixa, a produção é assegurada pelas glândulas supra-renais, testículos e pela conversão periférica dos androgénios. A síntese e a libertação do estradiol são estreitamente controladas pelo complexo hipotálamo-hipofisário, por intermédio da LH e da FSH. Nos casos de suspeita de hipofertilidade tanto no homem como na mulher, a avaliação da taxa de estradiol, associada aos doseamentos LH e de FSH e de progesterona, permite avaliar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisogonadal e determinar o nível da sua integridade. O doseamento quantitativo do estradiol é útil para a avaliação e o seguimento de um determinado número de disfunções sexuais precoces: menopausa, indução de ovulação e ginecomastia [5].

12.1.12 Progesterona

Amostra; Soro ou plasma (EDTA ou heparina de lítio)

A progesterona é uma das principais hormonas esteroides secretada pelo ovário na mulher. O seu nível aumenta no momento da ovulação para atingir o seu máximo durante a fase luteínica. Nos casos de suspeita de hipofertilidade na mulher, de abortos repetitivos, ou de protocolo de FIV (Fecundação *in vitro*), a avaliação da progesterona associada aos doseamentos de estradiol, de LH e de FSH permite datar a ovulação e apreciar a qualidade da fase luteínica [5].

12.1.13 Testosterona

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A testosterona principal hormona androgénica no homem é segregada pelas células de Leydig nos testículos sob a influência da LH. Este androgénio age na espermatogénese,

na maturação dos órgãos genitais externos e sobre as características sexuais secundárias (barba, pelos púbicos e axilares). Na mulher, a testosterona é segregada em diminuta quantidade pelos ovários e pelas glândulas supra-renais. No homem os níveis de testosterona permitem avaliar a segregação testicular de esteróides, concentrações baixas em testosterona estão frequentemente ligadas a um hipogonadismo ou a uma feminização do organismo. Na mulher os níveis de testosterona permitem explorar a segregação androgénica, concentrações elevadas em testosterona podem estar ligadas a um síndrome de ovários poliquísticos, a um tumor ovariano ou supra-renal, a uma hiperplasia das supra renais ou a um hirsutismo idiopático [5].

12.1.14. T3 -Triiodotironina Total / FT3 - Triiodotironina Livre

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A triiodotironina (T3) é uma hormona proveniente em grande parte da secreção tiroideia (20%) e na maioria da desiodação periférica da T4 em T3. A T3 circula de forma livre (0,3%) ou ligada a proteínas portadoras (99,7%). A forma livre é a fracção fisiologicamente activa e parece ter mais influência sobre o controlo metabólico. A FT3 não contribui para o diagnóstico de hipotiroidismo, tendo um papel diagnóstico especialmente importante no hipertiroidismo (doença de basedow, ou adenoma tóxico), seguimento de doentes hipotiroideus tratados com tiroxina e com anti-tiroideus e síndrome da diminuição da T3 [5].

12.1.15. T4-Tiroxina Total / FT4-Tiroxina Livre

Amostra; Soro ou plasma (com heparina de lítio)

A tiroxina (T4), produzida pela glândula da tiróide, encontra-se logo após a sua secreção na circulação sanguínea, maioritariamente (99,9%) ligada às proteínas portadoras. A fracção que permanece livre (FT4) é considerada como a parte activa da hormona. Os mecanismos da regulação da função tiroideia agem directamente na concentração desta fracção livre, o que explica a sua independência relativa em relação

à concentração em proteínas portadoras. No hipertiroidismo a concentração em FT4 e T4 aumenta enquanto que no hipotiroidismo a concentração está geralmente mais baixa [5].

12.1.16 Marcadores Hepatite B (anti-HBc, anti-HBc IgM/ anti- Hbe / Ag-Hbe)

Amostra; Soro ou plasma EDTA ou heparina de lítio

A infecção pelo vírus da hepatite B pode conduzir a uma hepatite aguda ou crónica. A hepatite aguda pode ser assintomática ou apresentar sintomas de gravidade variável que podem conduzir a uma hepatite fulminante. O vírus da hepatite B pode ser transmitido por via parenteral, perinatal e sexual. O Ag HBs aparece vários dias a semanas, após exposição ao vírus e pode persistir vários meses. A persistência do Ag HBs durante mais de 6 meses define serologicamente a infecção crónica ligada ao VHB. O desaparecimento do Ag HBs é habitualmente seguido do aparecimento de Ac's anti-HBs, sinal de cura [1].

Os Ac's totais dirigidos contra o Ag core do vírus da hepatite B (anti-HBc de classe IgM e IgG) podem ser detectados no soro de doentes com hepatite B aguda ou crónica ou em pacientes curados. Consequentemente os Ac's totais anti-HBc constituem um testemunho epidemiológico de uma infecção presente ou antiga ligada ao VHB. Durante uma hepatite aguda, os anti-HBc (IgM e IgG) são geralmente detectados 2 a 4 semanas após o aparecimento dos Ag's HBs e HBe. Enquanto que as IgM anti-HBc são transitórias e diminuem progressivamente, quer tenha havido cura ou passagem para a cronicidade, são detectados altos títulos de IgG anti-HBc durante a infecção e persistem após a cura. As IgG anti-HBc podem perdurar durante vários anos, ou mesmo toda a vida. O diagnóstico de uma hepatite aguda baseia-se na detecção do Ag HBs e das IgM-HBc. As IgM anti-HBc podem ser o indicador de uma replicação virai activa. Numa hepatite crónica, o aparecimento das IgM anti-HBc é o reflexo da citólise hepática, evidenciando assim uma fase activa da doença. [1]

Geralmente o Ag HBe é detectado precocemente no decurso da hepatite B aguda. Coincide com o aparecimento do Ag HBs ou no seu seguimento. Nos casos de hepatite aguda que evoluem para a cura, o Ag HBe desaparece na maioria da vezes após algumas

semanas com uma seroconversão para anti-HBe. Nos casos da hepatite B crónica, o antigénio HBe pode persistir durante vários meses, ou mesmo vários anos, testemunhando o estado de replicação activa da infecção crónica. Os indivíduos Ag HBe positivos são considerados potencialmente infecciosos para a hepatite B [1].

12.2 – Controlo de qualidade interno no imunoanalisador Vidas

O controlo de qualidade interno do imunoanalisador Vidas é processado quando é efectuada uma nova calibração e/ou na abertura de uma nova embalagem com o objectivo de confirmar a ausência de alteração dos reagentes. Diariamente o controlo, permite verificar a validade da calibração garantindo a fiabilidade dos resultados obtidos, validando-os. Se o valor do controlo se afastar dos valores esperados, os resultados não podem ser validados.

13 – Automatização em Imunologia – Autoanalisador Immulite

O Immulite 1000 (figura 14), é um equipamento de bancada para realização de imunoensaios quantitativos por quimioluminescência permitindo auto-programar as análises por inscrição e enviar os respectivos resultados para o computador central.



Figura 14 – Autoanalisador
IMMULITE 1000

13.1 - Quimioluminescência

Esta técnica envolve a oxidação de um composto orgânico, sendo a luz emitida resultante do produto excitado, formado na reação de oxidação. Estas reações ocorrem na presença de catalisadores, tais como enzimas. As enzimas quimioluminosas são fosfatases alcalinas conjugadas com Ac monoclonal específico do que vai capturar. As enzimas, através de uma reação química, convertem o substrato quimioluminescente num produto que emitirá fluorescência. As pérolas de plástico (poliestireno) estão recobertas com Ag ou Ac que corresponde a uma fase sólida, a pérola está fixada em cada unidade de teste. Esta unidade de teste serve como cuvette para a reação imune, processos de incubação, lavagem e o desenvolvimento do sinal. Todos os processos do ensaio são automatizados.

O equipamento, apresenta as seguintes características:

- 120 testes/hora;
- Sem necessidade de carregar lista de trabalho;
- Diluições onboard para ensaios que necessitam pré-diluição;
- 12 reagentes onboard;
- Resultado do teste em 15 minutos para alguns parâmetros;
- Fácil manutenção, exigindo tempo mínimo do operador (5 minutos para startup);
- Carregamento contínuo de amostras e unidades teste;
- Fácil eliminação de resíduos.

Parâmetros analisados:

13.1.1. Ácido Fólico

Amostra; Soro ou plasma (heparina de lítio)

O ácido fólico e a vitamina B12 são nutrientes essenciais para a hematopoiese. A anemia megaloblástica apresenta quase sempre como causa a ausência de uma destas

vitaminas. A deficiência de folato é normalmente observada em consequência de uma dieta deficiente (como no caso do alcoolismo), ou carência crescente desta vitamina (como na gravidez). O Folato é uma vitamina afectada pelo calor, susceptível à perda de acção se os alimentos forem cozinhados tempo demais. Os níveis de folato circulante, por serem fortemente influenciados pela ingestão recente de alimentos, não são fiáveis como índice de armazenamento nos tecidos. Desta forma, os níveis de folato medidos no soro ou plasma podem ser normais mesmo em face de deficiência de folato. Inversamente, os níveis circulantes podem estar baixos muito antes da reserva ter sido esgotada. Consequentemente, é também importante medir os níveis de folato nos GV sempre que níveis de soro ou plasma forem medidos [2].

Método

Imunoensaio competitivo com uma substância análoga de ácido fólico marcada com um ligando quimioluminescente em fase líquida, e com proteína de ligação imobilizada *in situ* com uma detecção anti-ligando. Exige pré-tratamento da amostra com uma solução de trabalho. Ocorre a competição do ácido fólico na amostra com o seu análogo para uma quantidade limitada de proteínas de ligação ao ácido fólico. Neste caso, a fase sólida contém Ac's específicos da proteína que se irá ligar ao ácido fólico. É esta proteína que será capturada pelos Ac's.

13.1.2. Vitamina B12

Amostra; Soro ou plasma (heparina de lítio)

A vitamina B12 tal como os folatos são essenciais á hematopoiese, a carência de uma destas vitaminas causa quase sempre anemia megaloblástica. A carência de vitamina B12 também pode resultar em deterioração neurológica severa. Os níveis de vitamina B12 circulante são geralmente um bom índice para determinar o armazenamento no tecido. A deficiência de vitamina B12 raramente ocorre como resultado da ausência desta vitamina na dieta, são mais comuns os casos de absorção deficitária, como na gastrectomia parcial ou total, ou de anemia perniciosa, uma condição caracterizada pela ausência completa ou quase completa de factor intrínseco (FI). Causas comuns de níveis

elevados de vitamina B12 podem incluir doença do fígado, doença mieloproliferativa e o uso de suplementos vitamínicos [5].

Método

Imunoensaio competitivo, em fase sólida, por quimioluminescência. Exige pré-tratamento da amostra com a mesma solução de trabalho dos folatos. Para que a quantificação da vitamina B12 seja possível, é necessário libertá-la das suas proteínas de transporte no soro, por acção do calor. Este passo irá inactivar também as proteínas de ligação à vitamina B12 e os anticorpos anti-FI. A vitamina B12 na amostra compete com o seu análogo na pérola para se ligar a um número limitado de locais no FI. Os Ac's conjugados com as enzimas ligam-se posteriormente ao FI.

13.1.3 Ácido Valpróico (VAL)

Amostra; Soro ou plasma (heparina de lítio)

O ácido valpróico é usado primariamente no tratamento de crises de ausência complexas e simples. O ácido valpróico aumenta a concentração do GABA inibindo a transaminase GABA. O GABA é um inibidor potente de descargas pré e pós-sinápticas no sistema nervoso central. As concentrações no plasma devem ser monitorizadas para ajudar a manter uma dosagem efectiva e prevenir efeitos colaterais causados por uma concentração excessiva [1].

Método

Imunoensaio competitivo, de fase sólida, com enzimas químico-luminosas.

13.1.4. CMP - Carbamazepina

Amostra; Soro ou plasma (heparina de lítio)

A carbamazepina é um derivado do iminostilbeno usado para o tratamento da epilepsia, da neuralgia trigemial, e convulsões generalizadas e parciais complexas e simples. A monitorização auxilia o médico na optimização da dosagem e minimiza os efeitos secundários tóxicos para cada doente [1].

Método

Imunoensaio competitivo, de fase sólida, com enzimas químico-luminosas.

13.1.5 Ac's anti-peroxidase

Amostra; Soro ou plasma (EDTA)

Os Ac's antiperoxidase da tiróide são autoanticorpos direccionados contra a enzima peroxidase da tiróide, esta enzima cataliza a iodonização da tiroxina (T4) em tiroglobulina durante a biossíntese de T3 e T4. Os autoanticorpos anti-TPO, apresentam-se elevados em virtualmente todos os casos de doença de Hashimoto e na maioria dos casos de doença de Graves. Elevados níveis de anticorpos anti-TPO, no contexto de uma sintomatologia clínica de hipotiroidismo, confirma o diagnóstico da doença de Hashimoto [1].

Método

Os Ac's na amostra competem com o seu análogo na fase sólida, para se ligar a um número limitado de locais de ligação aos Ac's. Os Ac's conjugados com as enzimas vão ligar-se ao complexo dando-se a reacção químico-luminosa.

13.1.6. Ac's anti-tiroglobulina

Amostra; Soro ou plasma (EDTA ou heparina de lítio)

A tiroglobulina é produzida unicamente pela glândula da tiróide e é o componente maioritário do coloide folicular da tiróide. As hormonas tiroideias T4 e T3 são

sintetizadas a partir da tiroglobulina. Os auto-anticorpos para a tiroglobulina estão presentes com grande frequência em doentes com patologias autoimunes da tiróide [5].

Método

Os Ac's na amostra competem com o seu análogo na fase sólida para se ligar a um número limitado de locais de ligação aos Ac's. Os Ac's conjugados com as enzimas vão ligar-se ao complexo dando-se a reacção químico-luminosa.

13.2 - Controlo de qualidade Interno no autoanalisador Immulite

O controlo interno é efectuado diariamente de forma a avaliar todos os parâmetros efectuados no analisador immulite, os controlos são multiparamétricos, ou seja, um controlo permite validar vários parâmetros:

- CON6 → Controlo de três níveis – alto, médio e baixo – para a Vitamina B12 e o Ácido Fólico;
- TAD1/TAD2 → Controlo de dois níveis – alto e baixo – para Anticorpos anti-tiróideus – Anti-TPO e Anti-TG;
- SDC1/SDC2 → Controlo de dois níveis – alto e baixo – para Carbamazepina e Ácido Valpróico.

O analisador avalia os resultados do controlo interno através de gráficos Levey-Jennings incorporados no software, realizando a validação ou rejeição automática dos valores controlo obtidos.

14 - Técnicas Manuais

14.1 – Reacção Aglutinação

A reacção de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis, como resultado da interacção de Ac's específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigénicos na sua superfície [7].

A aglutinação pode ocorrer com partículas que apresentam determinantes antigénicos naturais na sua superfície (GV, bactérias, protozoários, entre outros.) como com partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, bentonita, entre outros.), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (GV, bactérias) às quais se fixaram Ag's solúveis. No primeiro caso, a reacção é denominada como aglutinação directa, e no segundo, aglutinação indirecta ou passiva [7].

Quando existe um excesso de Ac's pode ser observado o fenómeno denominado de pró-zona obtendo-se resultados falsos negativos, este efeito é eliminado através da realização de diluições seriadas do soro. Existem duas hipóteses de tentar explicar o fenómeno de pró-zona;

- Quando ocorre um excesso de Ac's, a possibilidade de a mesma molécula de Ac's se ligar a determinantes Ag's diferentes é menor;
- Há também casos em que coexistem Ac's aglutinantes e os chamados bloqueadores. Os soros não diluídos ou diluídos em pequenas diluições permitem a acção desses Ac's que, comportando-se como monovalentes, não formam a ponte, mas bloqueiam os determinantes.

Teste de Aglutinação em Látex

Partículas de látex são esferas de poliestireno que podem ser utilizadas como suportes na adsorção de proteínas solúveis e Ag's polissacarídios, que funcionam como sistema indicador da reacção Ag-Ac.

14.1.1. RF - Factor Reumatóide

O RF, engloba um grupo de auto-ac's das classes IgG, IgM, e IgA que têm em comum a capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da molécula da imunoglobulina G humana. Apesar da pequena evolução no conhecimento dos mecanismos de ligação do RF, o RF IgM pode servir como marcador precoce da artrite reumatóide, apoiando-se em dados que demonstram que o risco de desenvolvimento desta doença aumenta de forma proporcional ao aumento da concentração do RF em indivíduos normais. Os pacientes com artrite que apresentam o RF positivo,

principalmente com concentrações elevadas, correm um risco de apresentar complicações clínicas e uma menor resposta à terapêutica. O RF está aumentado, no síndrome de Sjogren, doença mista do tecido conjuntivo, Lúpus eritematoso sistémico, esclerodermia, nefropatia, entre outras [7].

A execução dos testes de detecção do RF permite a distinção entre artrite reumatóide, doenças auto-imunes e outras doenças inflamatórias. Sabe-se hoje que o RF não é produzido apenas sob condições patológicas e um pequeno número da população normal, especialmente os idosos, pode apresentar resultados positivos para o RF.

Método

As partículas de látex estão sensibilizadas com imunoglobulinas dirigidas contra o RF. Se este estiver presente na amostra vai ocorrer aglutinação que pode ser observada macroscopicamente. A pesquisa do RF por aglutinação no látex é uma técnica de aglutinação em lâmina para a detecção directa e semi-quantitativa.

14.1.2. PCR - Proteína C Reactiva

Uma substância presente no soro de doentes com doença aguda, era capaz de se ligar ao poliosídeo C na parede celular de *Streptococcus pneumoniae*, esta substância foi inicialmente descrita em 1930. Demonstrou-se que era uma proteína e recebeu o nome de proteína C reactiva, a qual tem cinco subunidades peptídicas idênticas, sendo sintetizada no fígado [5].

A PCR no soro humano está associada a infecções agudas, situações necróticas, traumatismos, cirurgias e a uma variedade de estados inflamatórios. Existe uma correlação significativa entre os níveis séricos da PCR e o início do processo inflamatório. A monitorização dos níveis da PCR permite-nos avaliar a eficácia do tratamento e a recuperação do doente [5].

Método

As partículas de látex são revestidas com Ac`s humanos anti-PCR conforme descrito por Singer e seus colaboradores. Quando se mistura a suspensão de látex com soro que contenha níveis elevados de PCR, irá produzir-se uma aglutinação nítida num período máximo de 2 minutos.

14.1.3. TASO - Título de anti-estreptolisina O

A estreptolisina O é uma de diversas exoenzimas imunogénicas tóxicas, produzidas por estreptococos β -hemolíticos do grupo A. Um título elevado de TASO indica infecção recente por estreptococos β -hemolíticos do grupo A. Esta bactéria é responsável por patologias como, febre reumática, escarlatina, endocardite bacteriana, glomerulonefrite faringite estreptocócica. O Ac TASO pode ser encontrado no sangue durante semanas ou mesmo meses, após o desaparecimento da infecção aguda por estreptococos. Cerca de 80 a 85% dos doentes com febre reumática têm títulos elevados de TASO. Quando os valores são inferiores a 200 μ l e existe forte suspeita de febre reumática, recomenda-se uma nova titulação, 4 semanas depois da primeira [5].

Método

As partículas de látex são revestidas com Estreptolisina – O purificada e estabilizada. Quando se mistura numa lâmina a suspensão de látex com um soro contendo níveis elevados de Ac`s anti-taso, formar-se-á uma aglutinação nítida num período máximo de 2 minutos.

14.2 - Determinação qualitativa de reaginas plasmáticas (RPR) Reacção de Floculação

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível cujo agente causal é a espiroqueta *Treponema pallidum*. As vias de transmissão da doença são habitualmente por contacto sexual (principal via), transfusão de sangue infectado (hoje praticamente eliminado através de triagem sorológica de rotina), transmissão pela placenta da mãe para o feto

(sífilis congénita). O período de incubação varia de 2 a 4 semanas. A lesão primária da sífilis (sífilis primária) é caracterizada por cancro duro e ocorre geralmente nos órgãos genitais apresentando-se os gânglios linfáticos regionais duros e indolentes. O período secundário (sífilis secundária) manifesta-se de 6 a 8 semanas após a infecção e apresenta um exantema cutâneo generalizado e alterações das mucosas na boca e faringe; sem tratamento os exantemas continuam reincidentes durante 2 a 3 anos. Segue-se anemia grave com linfocitose, esplenomegália e hepatomegália.

Na ausência de terapia, cerca de um terço dos pacientes apresenta sífilis terciária entre o terceiro e o quinto ano, após a infecção que pode manifestar-se como gomas na pele (15%) sífilis cardiovascular (10%) ou neurosífilis (8 a 10%) [5].

Os testes serológicos para a sífilis são classificados como;

- a) Não treponémicos usados mais comumente para triagem como VDRL (*venereal disease research laboratory*), RPR (*rapid plasma reagine*).
- b) Testes treponémicos usados como testes confirmatórios para os soros reactivos nos testes de triagem como o TPHA (*treponema pallidum hemagglutination*), FTA-Abs (*fluorescent treponemal-abortion*) e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Método

O RPR Carbon é uma técnica de aglutinação não treponémica para detectar qualitativa e semi-quantitativamente, reaginas plasmáticas no soro humano. Estas reaginas reagem com Ag's de cardioplipina, lecitina e colesterol. No teste rápido RPR as reaginas presentes no soro dos doentes infectados com *Treponema pallidum*, reagem com os Ag's de cardioplipina, lecitina e colesterol sensibilizados sobre as partículas de carvão. A reacção inespecífica produz uma aglutinação visível macroscopicamente, favorecida pelas partículas de carvão. As reacções inespecíficas podem ser evitadas com a utilização de Ag altamente purificado e a adição de cloreto de colina.

O ensaio qualitativo é realizado de acordo com qualquer outro método de aglutinação em lâmina, fazendo reagir a amostra com o Ag correspondente. Os ensaios positivos (com aglutinação visível ao fim de 8 minutos) deverão ser repetidos preparando-se uma série de diluições em soro fisiológico. O título da amostra corresponderá à maior diluição que ainda demonstra aglutinação.

➤ Interpretação dos resultados

Reactivo: Aglutinação visível que indica a presença de reaginas na amostra (figura 15 A).

Não reactivo: Ausência de aglutinação (cor cinza homogéneo), que indica ausência de reaginas na amostra (figura 15 B).

Resultados:

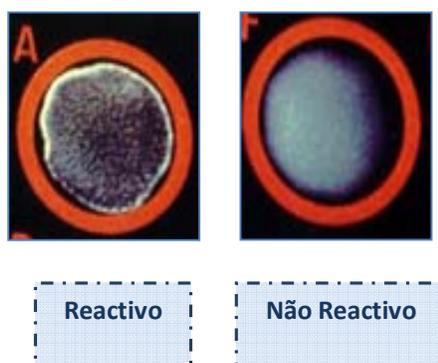


Figura 15 – Soro reactivo (A) e não reactivo (B) no teste RPR

14.3 - Controlo de qualidade interno nas técnicas manuais de aglutinação

Em todas as técnicas manuais acima descritas são usados controlos negativos e controlos positivos fornecidos em cada kit, que funcionam como modelo de comparação para a interpretação dos resultados e permitem avaliar a funcionalidade dos reagentes.

15 - Cromatografia - Conceito Geral do Método

A cromatografia é um instrumento versátil e poderoso para a separação e dosagem de uma ampla variedade de analitos clinicamente relevantes. A meta primária do processo cromatográfico é separar uma mistura, nos seus componentes individuais, chamados de

solutos. Uma separação cromatográfica requer que seja introduzida uma amostra num fluxo de gás ou líquido (fase móvel) que passa através de um suporte contendo partículas (fase estacionária). À medida que a fase móvel arrasta a amostra para dentro e através da fase estacionária, os solutos que tiverem maior solubilidade na fase móvel ou menor afinidade para a fase estacionária migram mais rápido que os outros. Na cromatografia plana, a fase estacionária encontra-se contida sobre uma superfície plana [2].

15.1. Detecção de Drogas - Metanfetaminas, Benzodiazepinas, Cannabis, Cocaína e Opiáceos

Os agentes de Marijuana que causam vários efeitos biológicos são denominados canabinóides. Um canabinóide é um estimulante do sistema nervoso central que altera o temperamento e as percepções sensoriais, produz perda de coordenação, afecta a memória por um curto período, produz sintomas de ansiedade, paranóia, depressão, confusão, alucinações, e aumento do ritmo cardíaco.

As metanfetaminas são estimulantes do sistema nervoso central cujas propriedades farmacológicas incluem vivacidade, estado de vigília, aumento de energia, redução na sensação de fome, e um estado de bem-estar geral. As doses elevadas de metanfetaminas podem desenvolver tolerância e dependência física, podendo ser usada como droga de abuso.

As benzodiazepinas são medicamentos que são frequentemente prescritos para o tratamento sintomático de ansiedade e insónia. Produzem os seus efeitos através de receptores específicos envolvendo um composto químico chamado GABA. As benzodiazepinas são também usadas como sedativos antes de alguns procedimentos cirúrgicos e médicos.

Os opiáceos são substâncias derivadas do ópio e, portanto, estão incluídos na classe dos opióides - grupo de fármacos que actuam nos receptores opióides neuronais. Produzem acções de insensibilidade e são usados principalmente na terapia da dor crónica e da dor

aguda de alta intensidade. Produzem em doses elevadas euforia, estados hipnóticos e dependência e alguns (morfina e heroína) são usados como droga recreativa de abuso.

A cocaína tem uma acção intensa mas breve (dura cerca de 30 minutos), sendo que os seus efeitos são semelhantes aos das anfetaminas. Quando consumida em doses moderadas, a cocaína pode provocar ausência de fadiga, sono e fome. Para além disso, o indivíduo poderá sentir exaltação, euforia, intenso bem-estar e maior segurança em si mesmo, nas suas competências e capacidades. Os consumidores de cocaína costumam ser conhecidos pelo seu comportamento egoísta, arrogante e prepotente. Ocasionalmente poderá ter efeitos afrodisíacos, aumentando o desejo sexual e demorando a ejaculação. A nível físico, pode provocar aceleração do ritmo cardíaco, aumento da tensão arterial, aumento da temperatura corporal e da sudação, tremores ou convulsões. As doses elevadas geralmente provocam insónia, agitação, ansiedade intensa, agressividade, visões e alucinações (as típicas são as tácteis, como a sensação de ter formigas, insectos ou cobras imaginárias debaixo da pele). Ao bem-estar inicial segue-se geralmente cansaço, apatia, irritabilidade e comportamento impulsivo.

Método

Amostra; Urina

Os testes para a detecção de drogas de abuso ou terapêuticas na urina, são imunoensaios qualitativos que permitem evidenciar a presença ou ausência de determinadas drogas e/ou os seus metabolitos excretados na urina. É um imunoensaio rápido, competitivo e cromatográfico. A tira cromatográfica está revestida com um Ac marcado com ouro coloidal, específico da droga que se pretende detectar na zona de deposição da amostra; um conjugado proteico da droga na região do teste e um Ac anti-IgG na região do controlo.

A amostra após ser colocada migra pela tira do teste por capilaridade. Nesta zona, as drogas quando presentes na urina ligam-se aos Ac's, os quais se encontram em número limitado, impedindo que o conjugado proteico se ligue aos mesmos.

Quando a droga está presente liga-se aos sítios limitados de ligação ao Ac corado e compete com o conjugado proteico da droga existente na membrana da região teste, evitando a ligação do Ac corado ao conjugado proteico impedindo a formação da banda

rosa. Haverá saturação dos locais de ligação ao Ac por parte das drogas, traduzindo-se na ausência de uma banda corada na região do teste devido à não ligação do conjugado aos Ac's (Fig.16 A).

Um resultado negativo resulta da ligação do conjugado proteico ao Ac anti-droga corado na zona teste formando uma banda cor rosa/violeta resultante da degradação do substrato num produto com cor (Fig.16 B).

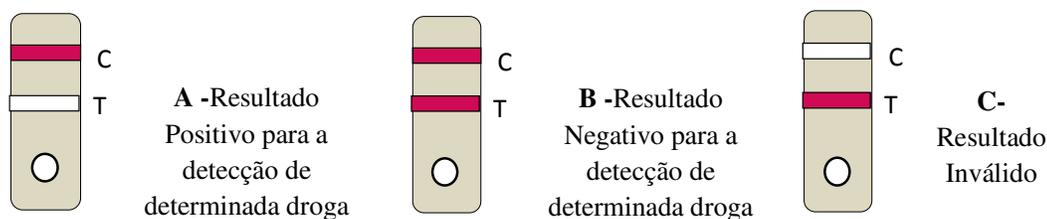


Figura 16 – Detecção de determinada droga

15.2 - Teste Imunológico da Gravidez

Amostra; Urina/Soro

A Gonadotrofina Coriônica humana (β -hCG) pertence, assim como a LH, FSH e TSH à família das glicoproteínas. A β -hCG é produzida durante a gestação na placenta e em mulheres não grávidas, por;

- Tumores do trofoblasto;
- Tumores de células germinais com tecido trofoblástico;
- Certos tumores não trofoblásticos.

A determinação da sua concentração permite o diagnóstico de uma gravidez até uma semana após a concepção. A determinação da β -hCG no primeiro trimestre da gravidez é de especial importância porque serve como indicador de várias patologias. Valores elevados podem ser indício de coriocarcinomas ou de múltipla gravidez. Concentrações elevadas de β -hCG não associadas a uma gravidez podem ser encontradas em doentes com diversos tumores, tais como, células germinais, vesicais, pancreáticos, estomacais, pulmonares, hepáticos, entre outros [5].

Método

O teste utilizado para o doseamento da β -hCG, tal como o de detecção de drogas, é um teste qualitativo de alta sensibilidade que detecta a presença de β -hCG produzida pela placenta, na urina ou no soro.

É um imunoensaio rápido e cromatográfico. A linha do teste contém Ac's monoclonais anti-hCG conjugados para detectar selectivamente níveis elevados de β -hCG. A linha do controlo é composta por Ac's policlonais e partículas de ouro coloidal.

A amostra migra por capilaridade e um aparecimento de uma banda corada na região do teste é indicativo de um resultado positivo em consequência da ligação da glicoproteína com os Ac's específicos da mesma (figura 17 B). A ausência desta linha colorida indica um resultado negativo (figura 17 A).

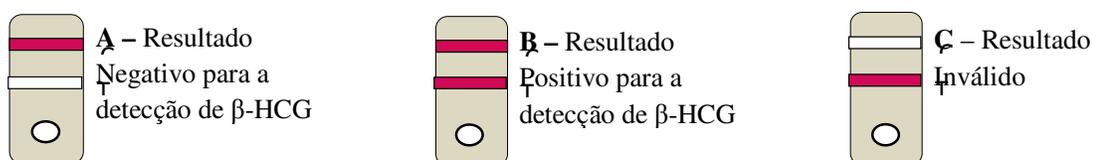


Figura 17 – Determinação de β -HCG na urina

15.3. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes

O cancro colorectal tem uma incidência de mais de 600 000 casos por ano e surge como a terceira doença maligna mais comum. Como acontece em todos os cancros, a detecção precoce de lesões, aumenta consideravelmente a taxa de sobrevivência do doente. Entre pessoas com mais de 45 anos, 10% têm pólipos colorectais, dos quais 1% irão tornar-se malignos. Tendo em conta que muitos pólipos superiores a 0,5 cm podem sangrar, o teste de sangue oculto nas fezes, é um método de rastreio simples e barato para a detecção de cancro colorectal, em comparação com a colonoscopia [1].

Método

Ocorre uma combinação de corante conjugado monoclonal e Ac's policlonais em fase sólida, para identificar selectivamente hemoglobina humana. À medida que a amostra flui através do dispositivo absorvente, o conjugado Ac-corante marcado, liga-se ao Ag de hemoglobina, formando um complexo Ag-Ac. Este complexo liga-se ao Ac de hemoglobina na zona teste, originando uma banda cor-de-rosa. Na ausência de hemoglobina, não aparece banda na zona de teste.

15.4 - Controlo de Qualidade nos testes imunocromatográficos

Nos testes qualitativos de rastreio visual para detecção de drogas na urina e glicoproteína β -hCG, o controlo vem incorporado na membrana cromatográfica do teste para identificar que o volume da amostra e a migração foram adequados, e que o ouro coloidal se dissolveu correctamente como esperado. Um resultado inválido deve ser repetido utilizando outra placa do teste. A amostra, quando migra por capilaridade, arrasta os Ac's presentes na zona de deposição da amostra (no caso das drogas) e os Ac's presentes na região do teste (no teste de gravidez) até à região do controlo. Estes Ac's ao ligarem-se aos Ag's incorporados nesta região formam uma linha corada, sendo possível a validação do teste. Quando tal não acontece, o teste não pode ser validado (fig. 16 e 17 C).

16 - Controlo de Qualidade Interno – Características Gerais

A UPC do CHPL, compromete-se a atingir elevados níveis de qualidade, ética e técnica, trabalhando segundo as boas práticas clínicas de modo a que os serviços prestados tenham reconhecida credibilidade quer perante os utentes quer perante os outros laboratórios de ensaio.

A recolha, armazenamento e processamento adequado da amostra são passos fundamentais para manter a integridade da amostra. Colher adequadamente significa possuir as condições certas (instalações, material, formação, etc.), proceder á correcta identificação do doente e da amostra e atender a um adequado transporte e armazenamento. As colheitas das amostras para o processamento analítico devem efectuar-se em condições padronizadas, nomeadamente com o doente em jejum ou dieta restritiva, na posição sentada ou deitada e após breve momento de repouso. A colheita de sangue periférico pode ser feita no sangue arterial, para a determinação de pH e gases ou, no sangue venoso para as restantes análises. A colheita em sangue capilar tem aplicação sobretudo em Neonatologia/Pediatria.

Alguns resultados podem ser influenciados por várias situações que vão desde a prévia ingestão de alimentos ou álcool, até á posição do doente no momento da colheita a ao uso prolongado de medicamentos. Além disso, no caso de alguns analítos, os resultados obtidos podem variar naturalmente ao longo do dia.

Os resultados obtidos do estudo de um produto colhido de um determinado doente, depende do estado e da preparação do doente, de modo que sejam comparáveis com os resultados obtidos em grupos de referência – “valores de referência”. Deste modo existem vários parâmetros individuais que influenciam estes resultados:

a) Dieta

Exemplos

- O álcool e o queijo interferem com o doseamento dos triglicéridos;
- A dieta rica em hidratos de carbono altera a curva da glicemia;

b) Jejum

È usual efectuar as colheitas em jejum a fim de se obter condições idênticas para comparação de resultados com outros obtidos em tempos diferentes, do mesmo doente, ou para comparação com os padrões estabelecidos para esses parâmetros (jejum 10-14 horas). A ingestão de alimentos antes da colheita provoca variações nos valores, por exemplo, da glucose, bilirrubina, fosfatos, transaminases, que podem atingir 20% dos

valores em jejum. Por outro lado, um jejum prolongado (> 24 horas) provoca alterações na concentração dos corpos cetónicos, cortisol, aldosterona, bilirrubinas, triglicéridos, ureia e ácido úrico.

c) Calor

Provoca hipovolemia e conseqüentemente aumento da secreção da aldosterona.

d) Exercício

Os efeitos do exercício físico repercutem-se nos doseamentos do lactato (por aumento da actividade metabólica) e actividade enzimática (CK, Aldolase, AST, LDH).

e) Medicamentos

Quase todos podem produzir alterações dos parâmetros hepáticos quer por simples indução enzimática, quer por agressão hepatocelular e alterações nos exames bacteriológicos (antibióticos).

f) Ansiedade

O simples stress altera parâmetros como a prolactina, sujeita a estímulos hipotalâmicos (efectuar 2 colheitas em tempos diferentes). A hiperventilação provoca alterações no equilíbrio ácido-básico. É necessário informar e tranquilizar o doente.

g) Posição

Ao passar de decúbito ao ortostatismo o volume plasmático diminui em cerca de 10-15% com conseqüente alteração das concentrações das substâncias. Por exemplo, a secreção de renina aumenta 2 vezes na posição ortostática.

h) Hábitos tabágicos

O fumo altera o teor de alguns parâmetros: diminui a diurese e aumenta a glicose.

A escolha do anticoagulante é fundamental para as correctas determinações analíticas. Os doseamentos para química clínica são quase exclusivamente efectuados no soro ou

no plasma, que se obtêm, respectivamente, a partir do sangue coagulado espontaneamente (tubo seco, com grânulos de gel) ou de sangue colhido para tubo contendo o anticoagulante. Para a grande maioria das análises hematológicas usa-se o sangue venoso anticoagulado com EDTA (K3). Em raros casos este anticoagulante pode provocar aglutinação das plaquetas *in vitro* e conduzir, por isso, a falsas trombocitopénias que normalizam repetindo a contagem em sangue citratado. O anticoagulante para os testes de coagulação é o citrato de sódio a 3,8% que deve ser utilizado exactamente na proporção de uma parte de anticoagulante para 9 partes de sangue. As amostras hemolizadas ou com início de coagulação devem ser rejeitadas.

Para o estudo da coagulação, hemograma e bioquímica são suficientes cerca de 10 ml de sangue colhidos, na seguinte ordem;

1. Estudo bioquímico – tubo sem anticoagulante (tubo seco).
2. Estudo da coagulação – tubo com citrato trissódico.
3. Estudo do hemograma e plaquetas – tubo com EDTA K3.

Em termos gerais, relativamente á análise de urinas, as amostras devem ser processadas logo que possível, até 3 horas após a colheita. Se isso não for possível devemos guardá-las no frigorífico ou adicionar um conservante, consoante os casos, de modo a manter as características que queremos estudar.

No que se refere a equipamentos, todos os que são usados para a obtenção de resultados, ou que os podem influenciar, são periodicamente sujeitos a manutenção interna e/ou calibração interna, todas estas operações são objecto de uma planificação anual. A UPC tem todos os registos dos equipamentos principais, nestes constam todas as informações necessárias para a reconstituição do historial de um equipamento (ficha do equipamento, manutenções, calibrações, ocorrências, certificados, instruções de operação. etc.), identifica de forma inequívoca o estado de operacionalidade do equipamento com a finalidade de garantir que somente é utilizado se estiver em boas condições de operação. Os equipamentos não conformes, são identificados como tal e permanecem com esta indicação até que sejam reparados e tenham demonstrado, através de manutenção, ensaio ou calibração, estarem em bom estado de funcionamento. Nos casos em que o mau funcionamento do equipamento possa ter afectado a qualidade das análises

anteriores, é efectuada a avaliação das mesmas, com o objectivo de determinar se devem ou não ser repetidas. Os equipamentos são operados exclusivamente por pessoal devidamente qualificado para tal.

17 – Controlo de Qualidade Externo – Avaliação Externa da Qualidade

A UPC aposta na qualidade dos serviços por ela prestados, tendo instituído o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), inserido nas atribuições do INSA.

O INSA é o laboratório nacional de referência para a saúde, a quem compete promover, organizar e garantir a Avaliação Externa da Qualidade no âmbito laboratorial para laboratórios de análises clínicas e ambientais.

A participação, voluntária e confidencial, num Programa de Avaliação Externa da Qualidade (EQA) constitui, para os laboratórios, a única forma de detecção de erros sistemáticos, através da comparação dos seus resultados. O INSA é uma entidade nacional de reconhecida competência na organização de ensaios interlaboratoriais, pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), exigência legal para todos os laboratórios, e requisito obrigatório para as normas de acreditação (NP EN ISO/IEC 17025/ NP EN ISO 15189). Os controlos de qualidade externo são enviados de 3 em 3 meses para a UPC sendo processados da mesma forma como uma amostra. Desta forma, é assegurada a comparabilidade e uniformidade dos resultados obtidos permitindo melhorar a sua performance, aumentar o nível da qualidade laboratorial, permitir o cálculo do erro total admissível e aumentar o nível técnico nas suas áreas de acção.

Os Programas de Avaliação Externa da Qualidade (EQAS - External Quality Assessment Schemes) são uma ferramenta crucial que beneficia os laboratórios participantes, através da identificação e avaliação das capacidades dos laboratórios, orientando-os nas acções correctivas e melhorias, assim como através da formação contínua dos profissionais de laboratório nos métodos de diagnóstico padrão, de forma a

contribuir para o aumento da percepção dos sucessos e mudanças na prática do laboratório. A avaliação externa da qualidade avalia serviços e técnicas, entre as quais;

- Fase Pré-Analítica, Analítica e Pós-Analítica;

- **Hematologia:** Coagulação, contagem celular em sangue total, contagem diferencial leucocitária, morfologia do sangue periférico, reticulócitos, velocidade de sedimentação.

- **Química Clínica:** Drogas de abuso na urina, hemoglobina glicada, electroforese das proteínas, química clínica (rotina), sangue oculto nas fezes, teste de gravidez, urina tipo II;

- **Imunologia:** Autoimunidade, Marcadores Tumorais, Hepatite B – Anti HBs (quantitativo).

18. Conclusão

Concluído este trabalho que se apresenta, resta acrescentar o quanto foi gratificante os ensinamentos adquiridos ao longo do período em que estive em contacto com doentes, profissionais, metodologias, entre outros.

Considera-se que a frequência do Mestrado em Análises Clínicas, foi um projecto que em muito contribuiu para o desenvolvimento pessoal e profissional de forma a fortalecer a formação académica e rectificar automatismos que muitas das vezes se “instalam” numa prática profissional desenvolvida há cerca de seis anos, que muitas vezes são descurados nomeadamente, no que concerne ao conhecimento de novas técnicas, procedimentos e conhecimentos teórico-práticos. Forneceu, concomitantemente, “ferramentas” indispensáveis ao exercício da prática clínica, pela abrangência das componentes teóricas retratadas, além de possibilitar o aprofundamento dos conhecimentos adquiridos durante a licenciatura, bem como estudar outros métodos com grande aplicabilidade em diversas áreas. No decorrer desta etapa académica, houve a oportunidade de contactar com um excelente corpo docente, com bastante reconhecimento na área das Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, que de forma despretensiosa e de mais alto nível pedagógico transmitiram todo o seu saber, motivando e impulsionando todos nós para uma prática e dinâmica profissional futura o mais rentável e competente possível. A estes o meu agradecimento!

A possibilidade de testar e controlar os métodos usados na execução das análises, efectuar colheitas biológicas e proceder á sua manipulação, controlar a qualidade técnica e instrumental, efectuar a manutenção dos equipamentos; colaborar na implementação de novos procedimentos, foi uma experiência extremamente enriquecedora.

Toda a matéria aqui desenvolvida foi criteriosamente recolhida através dos conhecimentos teóricos adquiridos no primeiro ano do Mestrado, assim como conhecimentos práticos adquiridos ao longo estágio, da leitura de livros adequados e da discussão com profissionais credenciados.

Embora, este trabalho, possa parecer extenso, o mesmo pela sua complexidade não chegou no meu entender a desenvolver como pretendia toda uma variedade e vastíssimo leque de informações e observações. Fica-se, no entanto, pela certeza de que o mesmo traduz na sua essência os pontos mais relevantes e reveladores da área de saúde que proponho seguir.

Se consegui atingir os objectivos com este trabalho fico, como é obvio, altamente satisfeita, mas, se em contra partida tal não foi conseguido após a análise de quem decide, não deixo no entanto de ressaltar o quanto de gratificante senti, e o entusiasmo que neste trabalho coloquei, pois considero que ao longo do tempo foi um dos melhores, investimentos no campo do conhecimento e do profissionalismo de quem sempre me aconselhou e acompanhou.

19. Bibliografia

- [1] Henry JB. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 20ª Edição. Manole LTDA; 2008

- [2] Burtis C, Ashwood E. Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry. Elsevier Science; 2001

- [3] Wallach JMD. Interpretações de Exames Laboratoriais. 7ª Edição. MEDSI; 2003

- [4] Hoffbrand A, Pettit J, Moss P. Essencial Haematology. Blackwell Science; 2001

- [5] Caquet R. Guia Prático de Análises Clínicas. 1ª Edição. Climepsi; 2004

- [6] Alçada M, Azevedo I, Reis C. Práticas de Bioquímica para Ciências da Saúde. Lidel; 2002

- [7] Stites D, Terr A, Parslow T. Imunologia Médica. Guanabara Koogan; 2000