

Ricardo José Silva Vieira

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ANÁLISES CLÍNICAS

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

Laboratório do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.

Orientadores: Dr. Elmano Ramalheira e Professora Doutora Gabriela Silva

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Índice

| | |
|--|----|
| Lista de Ilustrações..... | IV |
| Lista de Tabelas..... | V |
| Lista de Abreviaturas..... | VI |
| Resumo..... | IX |
| Abstract..... | IX |
| I. Introdução..... | I |
| II. Caracterização do laboratório de estágio..... | 2 |
| III. Fase Pré-analítica..... | 4 |
| IV. Sector de Microbiologia..... | 6 |
| V. Sector de Imunologia..... | 8 |
| VI. Sector de Hematologia..... | 10 |
| 1. Preparação das amostras..... | 10 |
| 2. Hemograma com plaquetas..... | 11 |
| 3. ABX Pentra DX Nexus..... | 14 |
| 4. Esfregaço de Sangue Periférico (SP)..... | 21 |
| 5. Hemoglobinas Variantes..... | 23 |
| 6. D-10..... | 24 |
| 7. Velocidade de Sedimentação..... | 25 |
| 8. Estudo da Coagulação..... | 26 |
| 9. BCS XP..... | 30 |
| 10. Citometria de fluxo..... | 31 |
| 11. Pesquisa de <i>Plasmodium sp</i> | 32 |
| VII. Sector de Química Clínica e Imunoquímica..... | 33 |
| 1. Preparação das amostras..... | 33 |
| 2. ADVIA Labcell..... | 33 |
| 3. ADVIA Centaur XP..... | 35 |

| | |
|---|-----|
| 4. ADVIA I800 | 38 |
| 5. Rapidlab I265 | 41 |
| 6. Immulite 2000 | 43 |
| 7. Rastreio Pré-Natal | 43 |
| VIII. Casos Clínicos..... | 45 |
| IX. Controlo de Qualidade Interno e Manutenção..... | 54 |
| X. Controlo de Qualidade Externo | 56 |
| XI. Conclusão | 57 |
| Bibliografia | X |
| Anexos | XVI |

Lista de Ilustrações

| | |
|--|----|
| Ilustração 1 - Eritrócitos (1) e plaquetas (2) [3]..... | 11 |
| Ilustração 2- Policromasia – Eritrócitos (1) e Reticulócito (2) [11]..... | 12 |
| Ilustração 3 - Neutrófilo [6]..... | 13 |
| Ilustração 4 – Basófilo [6] | 13 |
| Ilustração 5 – Eosinófilo [7]..... | 13 |
| Ilustração 6 – Linfócito [8] | 13 |
| Ilustração 7 – Monócito [9]..... | 13 |
| Ilustração 8 – Analisador ABX Pentra DX Nexus..... | 14 |
| Ilustração 9 - Representação do método de impedância elétrica [13]..... | 16 |
| Ilustração 10 – Determinação espectrofotométrica da citoquímica dos leucócitos [13]. | 18 |
| Ilustração 11 - Gráfico resultante da contagem diferencial de leucócitos [13]..... | 18 |
| Ilustração 12 - Gráfico resultante da contagem de reticulócitos [13]..... | 19 |
| Ilustração 13 – Eritroblastos [14] | 22 |
| Ilustração 14 - Esfregaço de Anemia Falciforme - Célula falciforme (1) [19] | 23 |
| Ilustração 15 - Analisador D-10 | 24 |
| Ilustração 16 - Cromatograma com níveis normais das hemoglobinas A2 e F [22]..... | 25 |
| Ilustração 17 - SediPlus S-2000..... | 25 |
| Ilustração 18 – Cascata da Coagulação..... | 27 |
| Ilustração 19 - Analisador BCS XP | 30 |
| Ilustração 20 - Cytomics FC 500 | 31 |
| Ilustração 22 – Gametócito de <i>Plasmodium falciparum</i> [36]..... | 32 |
| Ilustração 21 – Trofozoíto de <i>Plasmodium falciparum</i> [36]..... | 32 |
| Ilustração 23 - Esquema do Core laboratorial..... | 34 |
| Ilustração 24 - Analisador ADVIA Centaur XP | 35 |
| Ilustração 25 - Analisador ADVIA 1800 | 38 |
| Ilustração 26 - Analisador Rapidlab 1265..... | 41 |
| Ilustração 27 - Analisador Immulite 2000 | 43 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Organização do Serviço de Patologia Clínica..... | 2 |
| Tabela 2 - Diferentes tubos de colheita venosa utilizados no Serviço de Patologia Clínica..... | 5 |
| Tabela 3 - Equipamento existente no Sector de Microbiologia | 7 |
| Tabela 4 - Equipamento existente no Sector de Imunologia | 9 |
| Tabela 5 - Características e funções dos diferentes leucócitos | 13 |
| Tabela 6 - Parâmetros determinados pelo equipamento ABX Pentra DX Nexus | 14 |
| Tabela 7 – Cálculos estatísticos efetuados pelo analisador para a determinação dos restantes parâmetros | 20 |
| Tabela 8 - Parâmetros analisados no ADVIA Centaur XP..... | 36 |
| Tabela 9 - Parâmetros analisados no ADVIA 1800..... | 38 |
| Tabela 10 - Tipos de Rastreios realizados no Serviço de Patologia Clínica | 44 |
| Tabela 11 - Controlo de qualidade interno e Manutenção do Sector de Hematologia | 54 |
| Tabela 12 - Controlo de qualidade interno e Manutenção do Sector de Química Clínica e Imunoquímica..... | 55 |
| Tabela 13 - Participação do laboratório nos Programas de Avaliação Externa da Qualidade | 56 |

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormona Adrenocorticotrópica
AFP – Alfa-Fetoproteína
ALP – Fosfatase Alcalina
ALT – Alanina Aminotransferase
ALY – Linfócitos Atípicos
ANA – Anticorpos Anti-nucleares
ANCA – Anticorpos Citoplasmáticos Anti-neutrófilos
AST – Aspartato Aminotransferase
aTPP – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
BAS – Basófilos
BNP – Peptídeo Natriurético B
CA – Antígeno Carbohidrato
CD – Cluster de Diferenciação
CEA – Antígeno Carcino-Embrionário
CHBV – Centro Hospitalar Baixo Vouga
CID – Coagulação Intravascular Disseminada
CPK – Creatinafosfoquinase
CRL – Diâmetro Craneo-caudal
cTnl – Troponina I Cardíaca
DNT – Doença do Tubo Neural
DPN – Diagnóstico Pré-Natal
EA – Éster de Acridina
EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMIT – Técnica de Imunoensaio Multiplicado por Enzima
EOS – Eosinófilos
EPO – Eritropoietina
FIV – Fertilização *in vitro*
FSH – Hormona Estimulante dos Folículos
GLDH – Desidrogenase Glutâmica
GPO – Glicerol Fosfato Oxidase
hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

Hct – Hematócrito
Hg – Hemoglobina
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
INR – Razão Normalizada Internacional
IRC – Insuficiência Renal Crônica
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
LDH - Lactato Desidrogenase
LH – Hormona Luteinizante
LIC – Células Imaturas
LYM – Linfócitos
MCH – Hemoglobina Globular Média
MCHC – Concentração Média da Hemoglobina Globular
MCV – Volume Globular Médio
MO – Medula Óssea
MON – Monócitos
NEU – Neutrófilos
PAPP-A – Proteína Plasmática Associada à Gravidez
PEG – Polietilenoglicol
Plt – Plaquetas
PMT – Tubo Fotomultiplicador
PSA – Antígeno Específico da Próstata
PTH – Hormona Paratiroideia
RBC – *Red Blood Cell*
RDW – Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos
RET – Reticulócitos
RNA – Ácido Ribonucleico
RPN – Rastreio Pré-Natal
SP – Sangue Periférico
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
TN – Translucência da Nuca
TP – Tempo Protrombina

TSH – Hormona Estimulante da Tireoide

TSS – Técnico Superior de Saúde

uE3 – Estriol não Conjugado

VS – Velocidade de Sedimentação

WBC – *White Blood Cell*

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo abordar as atividades desenvolvidas pelo aluno ao longo de seis meses, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga.

Durante o estágio o estagiário teve a oportunidade de contactar com todas as áreas de trabalho do laboratório de análises clínicas do Serviço de Patologia Clínica, nomeadamente, Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia.

Ao longo do relatório será caracterizada a organização e funcionamento do laboratório e descritas as atividades desenvolvidas, destacando os parâmetros analíticos efetuados, os aparelhos utilizados, o fundamento dos métodos, o controlo de qualidade e a interpretação de dados laboratoriais.

Serão abordados, de forma genérica, todos os Sectores do Serviço de Patologia Clínica, contudo, o Sector de Hematologia e o Sector de Química Clínica e Imunoquímica foram os sectores elegidos para uma maior abordagem.

Abstract

This study aims to report the activities developed by the student over six months, in the Clinical Pathology Department of Centro Hospitalar do Baixo Vouga.

During the internship, the intern was able to contact with all areas of work of the laboratory of Clinical Pathology Service, in particular, Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology.

Throughout the report, will be characterized the organization and operation of the laboratory and it will be described all the activities, highlighting the analytical parameters carried out, the equipment used, the methods principles, quality control and the interpretation of laboratory data.

All sectors of the Clinical Pathology Service will be examined, however, the Haematology sector and the Immunochemistry and Clinical Chemistry sector were the chosen ones for a more detailed approach.

I. Introdução

No âmbito do Estágio Curricular, pertencente ao segundo ano do Mestrado em Análises Clínicas, surge o corrente documento. O seu primordial objetivo é, desta forma, relatar a dinâmica laboratorial e o percurso, por mim vivido, ao longo de seis meses (período compreendido entre 1 de Dezembro de 2014 e 28 de Maio de 2015), num total de 800 horas, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE (CHBV).

Os objetivos do estágio prenderam-se, essencialmente, com o contato com toda a variedade de espécimes clínicos e com a realidade da função desempenhada por um Técnico de Superior de Saúde, bem como, com o ambiente vivido diariamente num laboratório de Análises Clínicas. Objetivei, também, aprender a utilizar e a gerir diferentes equipamentos analíticos e, sobretudo, enquadrar os conhecimentos teóricos e práticos apreendidos ao longo destes dois anos de formação na área.

Genericamente, a organização do relatório encontra-se dividida em cinco partes. Inicialmente e, por forma, a contextualizar-se o local de estágio, optou-se pela caracterização do laboratório. Segue-se a descrição da fase pré-analítica. De um modo sintético, serão apresentadas, posteriormente, breves abordagens das Valências de Microbiologia e Imunologia. Ainda neste seguimento, é feita a descrição da dinâmica de trabalho da Valência de Hematologia e da Valência de Química Clínica e Imunoquímica, onde serão explicados os métodos utilizados, bem como as determinações inerentes a cada equipamento. Após a descrição detalhada dos dois sectores elegidos, serão apresentados alguns casos clínicos ocorridos no SPC do CHBV. Por fim, será exibida uma breve descrição relativa ao Controlo de Qualidade.

Os últimos meses foram marcados por muitos ganhos, mas também, de dificuldades divergentes do contato prático com a realidade laboratorial. Desta forma, é feito, em último lugar, uma avaliação retrospectiva do estágio realizado.

II. Caracterização do laboratório de estágio

O CHBV é o resultado da integração, numa mesma organização, de 3 unidades hospitalares: Hospital Infante D. Pedro (Aveiro), Hospital Distrital de Águeda e Hospital Visconde de Salreu. É de referir que o Serviço de Patologia Clínica é comum às 3 unidades hospitalares. No esquema abaixo (tabela 1), pode-se visualizar como está organizado o serviço.

Tabela 1 - Organização do Serviço de Patologia Clínica

| | |
|---|---|
| Laboratório | Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga EPE |
| Diretor Serviço | Dr. Elmano Ramalheira |
| Secções | <ul style="list-style-type: none">- Recepção de amostras e triagem- Química Clínica e Imunoquímica- Imunologia- Hematologia- Microbiologia |
| Outros espaços | <ul style="list-style-type: none">- Gabinete do diretor de serviço- Gabinete dos médicos- Gabinete técnica coordenadora- Sala de esterilização e lavagem do material |
| Constituição da equipa de trabalho | <ul style="list-style-type: none">- Diretor de serviço- Médicos- Técnicos superiores de saúde- Técnicos de análises clínicas- Auxiliares |
| Programa Informático | Appolo® 2.0 |

Fonte: Elaborado pelo autor

Relativamente ao Laboratório, o mesmo recebe amostras de várias origens, como é o caso das consultas externas, do internamento no hospital e ainda do Serviço de Urgência, sendo estes pacientes, em paralelo com os oncológicos, aqueles que possuem maior prioridade.

Em relação ao ano de 2014, podemos concluir que o Serviço de Patologia Clínica realizou uma média de 4000 análises diárias, onde mais de um quarto dessas análises se tratou de análises de Química Clínica e Imunoquímica (gráfico 3).

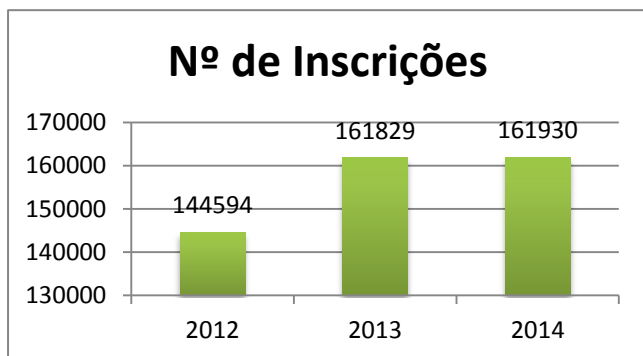


Gráfico 1 – Número de inscrições relativas aos anos 2012, 2013 e 2014

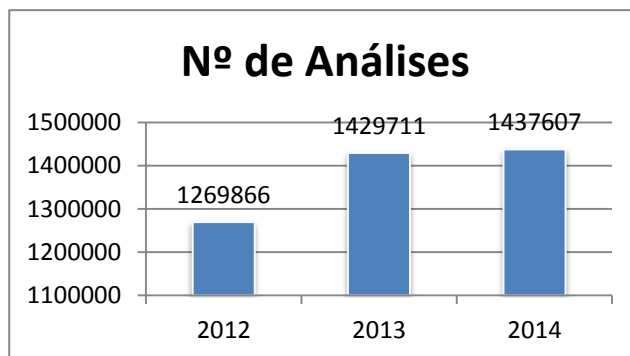


Gráfico 2 - Número de análises relativas aos anos 2012, 2013 e 2014

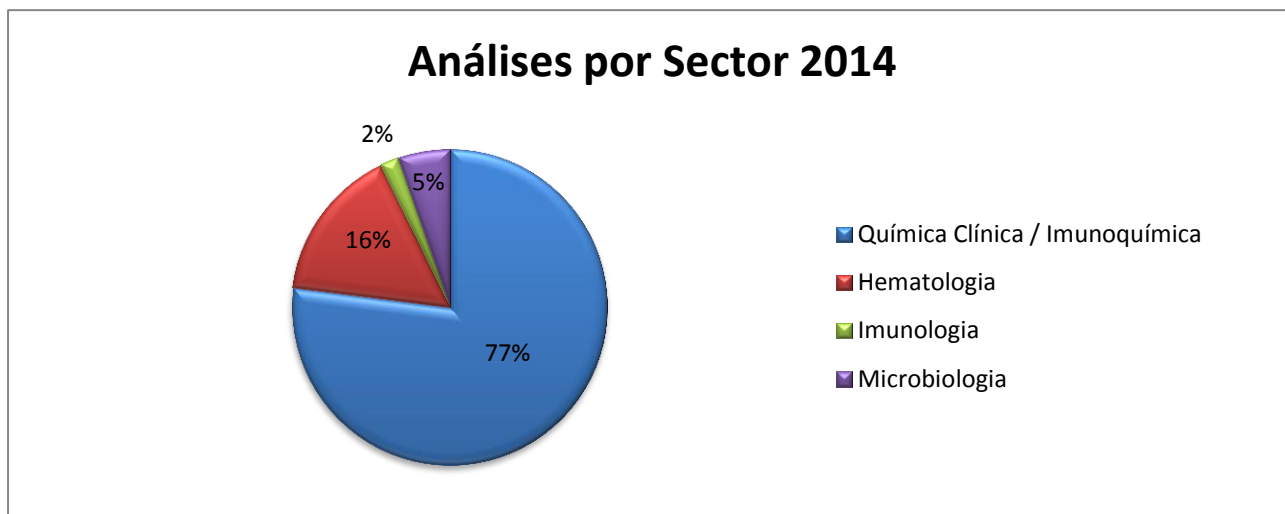


Gráfico 3 - Percentagem de análises por sector, relativo ao ano 2014

III. Fase Pré-analítica

A fase pré-analítica apresenta-se como um sistema complexo, dinâmico e não linear. Faz parte do processo que envolve todos os passos a seguir em ordem cronológica, desde a solicitação do médico, a preparação do paciente, a obtenção da amostra primária, o transporte até o laboratório e termina quando o procedimento analítico começa [1].






Segundo Guimarães (2011), a fase pré-analítica é a fase onde se encontra a maior frequência de erros, os maiores riscos à saúde dos profissionais e ainda é a fase que ocorre as mais elevadas taxas de erro humano. Neste contexto, a atuação de um Técnico de Análises Clínicas na diminuição dos erros pré-analíticos incide na preparação de amostras biológicas, incluindo identificação, colheita e tratamento da amostra (transporte, centrifugação/homogeneização e armazenamento) [1].

Relativamente à fase pré-analítica, nas salas de colheitas, anexas ao Serviço de Patologia Clínica, são efetuadas diariamente colheitas de sangue venoso. Inicialmente, procede-se à correta identificação do utente antes da punção. Seguidamente, prepara-se a colheita venosa e, neste patamar, é necessária a identificação dos tubos, que devem ser rotulados junto do doente e após confirmação da identificação pelo profissional que procede à colheita. A importância deste passo prende-se com a probabilidade de ocorrência de troca da identidade das amostras. Antes da colheita, a escolha exata dos tubos para a punção é outro fator importante a ter em conta, dado que, uma troca de tubos impossibilita as determinações analíticas pretendidas e ainda acarreta um transtorno ao utente, dada a necessidade de repetição da colheita. Assim, a escolha dos tubos tem de ser realizada segundo a tabela 2, abaixo descrita.

Em relação à colheita, deve ser colhida a quantidade suficiente de sangue, de modo a não ocorrer alterações no resultado da análise, devido à ocorrência de diluição pelo anticoagulante presente no tubo. Durante a colheita, ao nível da aplicação do garrote, seleção do local e execução da punção, devem ser cumpridas as boas práticas, de modo a ser evitado o fenómeno de hemólise que impossibilita as determinações analíticas, devido aos falsos resultados que gera. É ainda de salientar que, imediatamente após a colheita de sangue deve proceder-se à homogeneização do tubo, de modo a ser evitada a formação de coágulos. Não menos importante será realçar que durante e após a colheita, deve ser assegurado o bem-estar físico do doente. Seguidamente, as amostras de sangue, bem como outros produtos biológicos (fezes e urina), são enviados com a maior brevidade ao Serviço

de Patologia Clínica, de modo a que o processo analítico seja iniciado com a maior brevidade possível.

Tabela 2 - Diferentes tubos de colheita venosa utilizados no Serviço de Patologia Clínica

| Cor da tampa | Anticoagulante | Função | Objetivo de estudo |
|---|--|---|---|
|  | Sem anticoagulante e com gel separador | Após centrifugação, o gel proporciona uma barreira entre as células sanguíneas e o soro | Química clínica, Imunoquímica e Serologia |
|  | Heparina-Lítio | Ligação à Antitrombina III | Plasma heparinizado para Química clínica e Imunoquímica |
|  | Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) | Quelante de Cálcio | Hematologia |
|  | Citrato de Sódio (1:9) | Quelante de Cálcio | Coagulação |
|  | Citrato de Sódio (1:4) | Quelante de Cálcio | Velocidade de sedimentação |

Fonte: Elaborado pelo autor [2]

Na zona de triagem, onde são rececionadas as amostras, é realizado o primeiro controlo de qualidade à colheita efetuada, dado que, aquando da informatização do produto no software Appolo, é verificada a correta escolha do tubo de colheita, a presença de coágulo e a quantidade de sangue colhido.

IV. Sector de Microbiologia

Leitura de serviço - A rotina de trabalho do laboratório de Microbiologia inicia-se, diariamente, com a visualização das placas de gelose após incubação *overnight* das sementeiras efetuadas, no dia anterior, a partir dos diversos produtos biológicos recebidos no laboratório. Deste modo, em primeiro lugar, todas as placas são retiradas das estufas de incubação (exceto da estufa de anaerobiose que são analisadas separadamente e, numa fase posterior, de modo a diminuir ao máximo a sua exposição ao oxigénio e evitar a morte dos possíveis microrganismos presentes). A divisão das placas é feita de acordo com cada produto biológico (respetivamente urinas, hemoculturas, expetorações, aspirados brônquicos exsudados da orofaringe, fezes, pus, líquidos biológicos e exsudados vaginorrectais), de forma a facilitar a leitura das placas e o registo dos resultados obtidos.

Identificação e TSA – São, ainda, feitas as leituras dos isolamentos e reisolamentos efetuados no dia anterior, de modo a serem obtidas culturas puras do microrganismo, para seguidamente se proceder aos respetivos testes de identificação e de suscetibilidade a antibióticos (VITEK 2 e MiniApi). Por fim, são observados os resultados dos testes de sensibilidade à optoquina e dos testes de sensibilidade microbiana manuais quando realizados (tiras E-test e Antibiogramas pela técnica de difusão em disco).

Isolamentos - Nas placas que não apresentam culturas puras, são efetuadas repicagens das colónias dos microrganismos suspeitos (em função do produto biológico), de forma a serem obtidas culturas puras, com colónias isoladas que possibilitem a sua identificação.

Colorações – As colorações são um importante auxílio na identificação e classificação de bactérias. É utilizada a coloração de Gram para classificar as bactérias como Gram-positivas e Gram-negativas (apenas em caso de dúvida) e também permite avaliar a qualidade da amostra de expetoração (Expetoração vs. Saliva). Uma outra coloração usada é a coloração de Ziehl-Neelsen para a observação de bacilos álcool-acido resistentes.

Processamento dos diversos produtos biológicos - Através da zona de triagem/receção das amostras, dão entrada diversos produtos biológicos com destino ao Sector de Microbiologia, nomeadamente, frascos de urina, fezes, expetoração, aspirados brônquicos, aspirado endotraquial, suco gástrico, esperma, exsudados da orofaringe, exsudados vaginorrectais e vaginais, cálculos renais, pus, hemoculturas, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, ascítico e sinovial e, por fim, soro proveniente do Sector de Química Clínica e Imunoquímica.

Análise Sumária de Urina - Apesar de se tratar de uma análise bioquímica, também é realizada no sector de Microbiologia. Esta análise é efetuada com recurso às tiras de teste Uriflet que são lidas no analisador Aution MAX e que permitem a determinação rápida de ácido ascórbico, bilirrubina, sangue, glicose, cetona, leucócitos, nitrito, pH, proteínas, densidade e urobilinogénio na urina.

Na tabela abaixo, pode-se visualizar os equipamentos presentes no Sector de Microbiologia:

Tabela 3 - Equipamento existente no Sector de Microbiologia

| Equipamento | Função |
|--|--|
| BacT/ALERT 3D BioMérieux | Sistema de Detecção Microbiana em hemoculturas |
| MiniAPI BioMérieux | Identificação e Antibiogramas (alternativa ao VITEK 2) |
| VITEK 2 BioMérieux | Identificação e Antibiogramas |
| VersaTREK Thermo Scientific | Sistema de Detecção Microbiana (Micobactérias) |
| Aution MAX Menarini | Análise Sumária de Urina |
| Estufa de aerobiose e anaerobiose, Câmara de fluxo laminar, Microscópio óptico | |

Fonte: Elaborado pelo autor

O Sector Microbiologia inclui, ainda, uma área da Biologia Molecular (numa zona em separado), onde são realizados testes moleculares para a pesquisa de diversos microrganismos, podendo destacar a espécie *Mycobacterium tuberculosis*.

V. Sector de Imunologia

O Sector de Imunologia é o sector que recebe menos amostras de todo o Serviço de Patologia Clínica. Os ensaios realizados são as determinações de Proteínas específicas, Eletroforese Capilar, Alergologia, Autoimunidade e Imunofluorescência.

Em relação à determinação de Proteínas específicas é utilizado um nefelómetro, o BN ProSpec e as principais proteínas determinadas são a IgA, IgM e IgG, cadeias leves Kappa e Lambda, Haptoglobina, Alfa-1-antitripsina, fatores de complemento C3 e C4, Cistatina C e Beta-2-microglobulina.

O Minicap é o equipamento que efetua eletroforese capilar, o que permite a separação eletroforética das proteínas do soro e da urina. Em relação às proteínas séricas, são separadas em cinco frações: albumina; alfa-1; alfa-2; beta e gama globulinas. O resultado da eletroforese, o proteinograma, permite a comparação das bandas possibilitando uma melhor evidência de alguma anormalidade, como gamopatias monoclonais ou estados fisiopatológicos em que resultem alterações nas diferentes quantidades proteicas. É possível também efetuar eletroforese às proteínas da urina, sobretudo para detetar a proteína de Bence-Jones, uma proteína específica produzida em gamopatias monoclonais como é exemplo o Mieloma Múltiplo. Em casos de suspeita de gamopatias monoclonais também se realiza Imunofixação.

Os ensaios de alergologia e autoimunidade são executados no equipamento Unicap. Em relação aos ensaios de alergologia, podem ser testados os mais variados alergénios, apesar de no sector de Imunologia apenas serem utilizadas IgE específicas de alguns ácaros (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor* e pó de casa), epitélios animais (caspa de cão e caspa de gato), oliveira, leite de vaca, gema de ovo, ovalbumina, clara de ovo, látex e amoxicilina, também são utilizados o painel de alergénios alimentares (Leite, Clara de ovo, Bacalhau, Trigo mourisco, Amendoim, Grão de soja), o painel de alergénios de ervas daninhas (*Ambrósia elatitor*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*), o painel de alergénios de gramíneas (*Dactylis glomerata*, *Festuca elatior*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*), o painel para rastreio em adultos (alergénios inalantes) e painel de rastreio para crianças (alergénios inalantes e alimentares). Quanto aos ensaios de autoimunidade os anticorpos testados são Anticorpos Antinucleares (ANA) (Sm, UI-RNP, SSA (Ro), SSB (La), Scl-70, Jo-1, CENP-B), Anticorpos anti-dsDNA, Anticorpos Anti-citoplasma dos Neutrófilos (ANCA) (PR3 e MPO) e Anticorpos Anti-peptídeos citrulinados Cíclicos (Anti-CCP). Os resultados dos doseamentos

de autoimunidade são comparados com os resultados de imunofluorescência, caso esta técnica seja solicitada.

No que diz respeito à Imunofluorescência, esta técnica é executada por uma médica especialista e os anticorpos estudados são: Anticorpos Antinucleares (ANA), Anticorpos anti-dsDNA, Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA), Anticorpos anti-Membrana Basal Glomerular (AMBG), Anticorpos Antimitocondriais (AMA), Anticorpos Anti-Músculo Liso (ASMA), Anticorpos anti-Fração Microsomal de Fígado e Rim (anti-LKM), Anticorpos anti-Célula Parietal Gástrica (APCA) e Anticorpos Anti-Endomísio (AAE).

No esquema abaixo (tabela 4), pode-se visualizar os equipamentos presentes no Sector de Imunologia:

Tabela 4 - Equipamento existente no Sector de Imunologia

| Equipamento | Função |
|------------------------------|--|
| BN ProSpec Siemens | Nefelómetro Determinação de proteínas específicas |
| Minicap Sebia | Eletroforese capilar |
| Unicap 100 Phadia | Ensaio de Alergologia e Autoimunidade |
| Microscópio de fluorescência | |

Fonte: Elaborado pelo autor

VI. Sector de Hematologia

Antes de descrever a rotina laboratorial inerente ao Sector da Hematologia, devo indicar a constituição física do mesmo. Esta área apresenta uma zona destinada ao estudo hematológico, estando presentes dois analisadores ABX Pentra Dx Nexus e uma bancada que suporta dois analisadores BCS XP, onde é realizado o estudo da coagulação. Seguidamente, encontra-se uma bancada onde são analisadas as velocidades de sedimentação, estando, aqui, situados dois microscópios óticos para a visualização dos esfregaços efetuados, encontrando-se, também, o analisador D-10 (destinado à análise de hemoglobinas variantes). Nesta área pode-se presenciar, ainda, um espaço destinado à realização dos esfregaços (sangue periférico (SP) e medula óssea (MO)) e à sua coloração. Existe, também, uma zona destinada à citometria de fluxo, onde se encontra o citometro Cytomics FC 500. Por fim, o Sector de hematologia apresenta uma centrífuga, um banho-maria e um frigorífico, onde são armazenados diversos reagentes e controlos de qualidade, bem como amostras de sangue com anticoagulante EDTA, sendo estas armazenadas por um período de sete dias.

Relativamente à rotina laboratorial, o hemograma com plaquetas é o exame de primeira linha no estudo da função hematológica e, por este motivo, representa o maior volume de análises realizadas diariamente. No entanto, rotineiramente, são ainda realizadas as seguintes determinações: reticulócitos, velocidade de sedimentação, fração A1c e variantes de hemoglobina (A2,F e S) e observação microscópica de esfregaços de SP. Quanto ao estudo da coagulação, as determinações mais efetuadas diariamente são o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT). Com menor frequência também se determinam: D-Dímeros, Fibrinogénio, Proteína C, Proteína S e Antitrombina III.

I. Preparação das amostras

No Sector de Hematologia são utilizados tubos de EDTA (ABX Pentra Dx Nexus e D-10), tubos de citrato de sódio 1:9 (BCS) e tubos de citrato de sódio 1:4 (Velocidade de sedimentação).

As amostras colhidas para tubo, contendo anticoagulante EDTA, são homogeneizadas e é de novo verificada a presença de coágulo. Em relação às amostras colhidas para tubo, contendo anticoagulante citrato de sódio 1:9, verifica-se novamente o volume de amostra e

a presença de coágulo, sendo que, na sua ausência procede-se à centrifugação durante 10 minutos a 4000rpm. Após centrifugação é avaliada a qualidade do plasma obtido, nomeadamente, ao nível da hemólise, lipémia e icterícia. Nesta área, é muito importante que seja colhida a quantidade ideal de sangue, dado que, a colheita insuficiente de amostra, leva à sua diluição no anticoagulante citrato de sódio e conseqüentemente à obtenção de falsos resultados.

Por fim, às amostras destinadas à realização das velocidades de sedimentação (tubo de citrato 1:4) é também examinada a presença de coágulo.¹

2. Hemograma com plaquetas

O hemograma com plaquetas permite a quantificação e o estudo da morfologia de cada um dos elementos celulares do sangue, respetivamente, eritrócitos (eritrograma), leucócitos (leucograma) e plaquetas (plaquetograma). Os valores de referência do hemograma variam de laboratório para laboratório e em função da população em estudo. Neste contexto, no anexo A, encontram-se os dados relativos aos valores de referência para o hemograma, utilizados no Serviço de Patologia Clínica do CHBV. No mesmo estão indicados apenas os resultados enviados pelo Laboratório ao Clínico (Via Appolo), no entanto, outros parâmetros são avaliados, como é o caso das células imaturas. Relativamente às células imaturas da linhagem eritróide, é de salientar a determinação específica de reticulócitos, que permite determinar o grau de imaturidade dos eritrócitos presente no SP e ainda auxiliar na classificação das anemias.

Todos os parâmetros, que não são apresentados ao clínico, assumem especial importância na interpretação do Técnico Superior de Saúde (TSS) face aos resultados obtidos, induzindo neste uma atitude crítica, que pode culminar na realização de um esfregaço sanguíneo, na repetição da análise, entre outras ações, sempre sob orientação da informação clínica disponível, dos resultados analíticos e do histórico do doente.

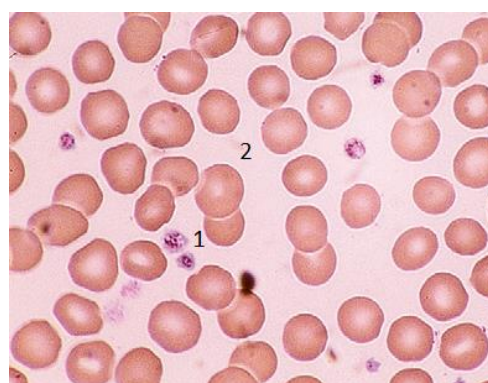


Ilustração 1 - Eritrócitos (1) e plaquetas (2), adaptado de Dacie And Lewis Practical Haematology [3]

¹ **Nota:** A presença de coágulo em qualquer amostra, não permite a realização das análises pretendidas, pelo que é necessária a repetição da colheita. A presença de aglutinação devido a aglutininas frias, é solucionada através do aquecimento da amostra a 37°C em banho-maria [2].

Eritrócitos

Relativamente aos eritrócitos (ilustração 1), que se representam como células sanguíneas anucleadas e bicôncavas, no hemograma é realizada a sua contagem, é avaliada a morfologia eritrocitária e procede-se à determinação do hematócrito e índices globulares. No interior dos eritrócitos, está presente a hemoglobina, uma proteína transportadora de O₂ e CO₂, à qual se procede ao seu doseamento [4].

Leucócitos

Através do hemograma, deriva-se o estudo dos leucócitos, também designadas por células de defesa, com papel essencial nos mecanismos imunológicos do organismo. Existem 5 tipos de leucócitos (tabela 5), que apresentam diferentes características e desenvolvem diferentes funções na manutenção da homeostasia [5].

Plaquetas

As plaquetas (ilustração 1), células sanguíneas anucleadas e discoides, têm como função manter a integridade dos vasos sanguíneos e a formação de tampões hemostáticos para parar a perda de sangue nos vasos lesados. No hemograma, procede-se principalmente à sua contagem total [5].

Reticulócitos

Os reticulócitos (ilustração 2) definem-se como eritrócitos jovens, não totalmente maduros, que precocemente são libertados pela MO. Caracteristicamente, apresentam RNA ribossomal e são células anucleadas. Relativamente à maturação do eritrócito, os reticulócitos apresentam a fase de maturação entre o eritrócito e o eritroblasto ortocromático [4].

No sangue SP, os valores de referência para a contagem de reticulócitos num indivíduo saudável, são entre 40 a 140 $\times 10^9/L$, o que equivale na proporção total de eritrócitos representa entre 0,5 e 2%. O aumento da contagem de reticulócitos pode indicar uma resposta da MO, face a fenómenos hemorrágicos ou hemolíticos (anemias hemolíticas autoimunes, doença hemolítica do recém-nascido entre outras) [12].

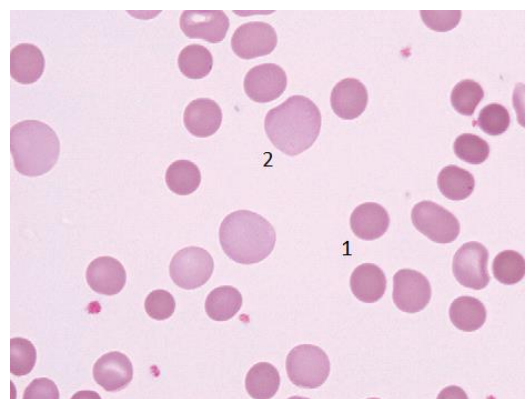

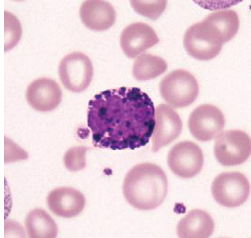
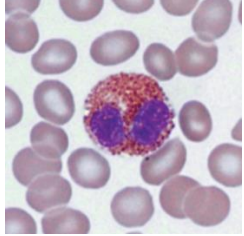
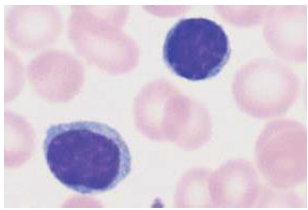



Ilustração 2- Policromasia – Eritrócitos (1) e Reticulócito (2), adaptado de Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods [11]

Tabela 5 - Características e funções dos diferentes leucócitos

| Leucócitos | Características | Funções |
|--|---|--|
|  <p>Ilustração 3 - Neutrófilo [6]</p> | <p>Núcleo lobulado (3 a 5 lóbulos). Citoplasma com grânulos.</p> | <p>Propriedade de fagocitose, e liberação de várias substâncias como lisozima e agentes oxidantes.</p> |
|  <p>Ilustração 4 – Basófilo [6]</p> | <p>Núcleo trilobado. Citoplasma com grânulos que coram fortemente com corantes básicos.</p> | <p>Libertação de mediadores de inflamação (heparina e histamina).</p> |
|  <p>Ilustração 5 – Eosinófilo [7]</p> | <p>Núcleo bilobado. Citoplasma com grânulos que coram fortemente com corantes ácidos.</p> | <p>Regulação da reação inflamatória alérgica. Envolvimento na destruição de parasitas.</p> |
|  <p>Ilustração 6 – Linfócito [8]</p> | <p>Núcleo esférico que ocupa a maior parte do volume da célula. Citoplasma pouco abundante e sem grânulos.</p> | <p>Linfócitos T – atuam diretamente nos vírus infetantes de células ou em células tumorais. Linfócitos B – produção de imunoglobulinas que atuam na imunidade humoral.</p> |
|  <p>Ilustração 7 – Monócito [9]</p> | <p>Núcleo ovoide ou em forma de rim. O citoplasma pode conter alguns grânulos e vacúolos, e é mais abundante e mais claro que o dos linfócitos.</p> | <p>Em processos inflamatórios, invadem os tecidos por diapedese, transformando-se em macrófagos, exercendo propriedades fagocitárias.</p> |

Fonte: Elaborado pelo autor [5,10]

3. ABX Pentra DX Nexus

O analisador ABX Pentra DX Nexus (Horiba) (ilustração 8) apresenta um sistema de análise em tubo fechado e em tubo aberto (cuja introdução da amostra é manual). Na sua constituição, o analisador apresenta um sistema de identificação das amostras por leitura do código de barras e um mecanismo de agitação das racks, proporcionando uma correta homogeneização das amostras de sangue total, antes de se proceder à análise.²



Ilustração 8 – Analisador ABX Pentra DX Nexus, (<http://www.horiba.com/medical/products/hematology/pentra-nexus/>)

De salientar que existem dois analisadores desta gama a operar simultaneamente (24 horas/dia), no entanto, diariamente, apenas um faz contagem de reticulócitos. A adoção desta medida, perante o volume de amostras para determinação de reticulócitos, permite a poupança de reagentes na realização do controlo de qualidade para este parâmetro. Na tabela 6, podem ser consultados todos os parâmetros determinados pelo analisador ABX Pentra DX Nexus.

Tabela 6 - Parâmetros determinados pelo equipamento ABX Pentra DX Nexus

| Parâmetros analisados | Descrição do Parâmetro | Observações |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| WBC | Contagem de Leucócitos | A contagem total de leucócitos é útil em vários tipos de patologia, pode ser indicador do grau de gravidade da doença |
| LYM | Contagem e % de Linfócitos | A contagem diferencial é de grande importância, dada a possibilidade de serem definidos perfis patológicos, pela avaliação quantitativa e qualitativa das |
| MON | Contagem e % de Monócitos | |
| NEU | Contagem e % de Neutrófilos | |
| EOS | Contagem e % de Eosinófilos | |

² **Nota:** Antes da introdução das amostras nas racks ou manualmente através de tubo aberto, deve ser sempre verificada a ausência de coágulos, de modo a serem obtidos resultados reais para as diferentes células analisadas. Ao nível mecânico, a pipetagem de um coágulo, pode provocar a obstrução do canal da pipeta, o que seguidamente condicionará a utilização do equipamento.

| | | |
|---------|---|---|
| BAS | Contagem e % de Basófilos | diferentes fórmulas leucocitárias. |
| LIC | Contagem e % de células grandes imaturas | Indicador de patologias envolvendo o comprometimento da MO, como é o caso das Leucemias |
| ALY | Contagem e % de Linfócitos Atípicos | Indicador de atividade dos linfócitos, como por exemplo em infecções víricas. |
| RBC | Contagem de Eritrócitos | Útil na avaliação de anemias e policitémias. |
| Hgb | Determinação da concentração de Hemoglobina | Parâmetro indicador de anemia |
| Hct | Hematócrito | Proporção do volume da amostra que é ocupado pelos eritrócitos. |
| MCV | Volume corpuscular médio | Avalia o tamanho dos eritrócitos Aumento MCV – Macrocitose Diminuição MCV – Microcitose |
| MCH | Hemoglobina corpuscular média | Avalia a cromia dos eritrócitos Diminuição MCH - Hipocromia |
| MCHC | Concentração da Hemoglobina corpuscular média | Concentração média da hemoglobina nos eritrócitos. |
| RDW | Distribuição do tamanho dos Eritrócitos | Útil na avaliação de anisocitose eritrocitária. |
| Plt | Contagem de Plaquetas | Útil na avaliação de trombocitopenia e trombocitose |
| PDW | Distribuição do tamanho das Plaquetas | Avalia o grau de anisocitose plaquetária |
| Pct | Plaquetócrito | Proporção do volume da amostra que é ocupado pelas plaquetas. |
| RET (#) | Contagem absoluta de Reticulócitos | Útil na avaliação do grau de maturação dos eritrócitos |

| RET (%) | % de Reticulócitos |
|---------|---|
| RET L | Reticulócitos com baixo conteúdo de RNA |
| RET M | Reticulócitos com conteúdo médio de RNA |
| RET H | Reticulócitos com alto conteúdo de RNA |

Fonte: Elaborado pelo autor [13]

O ABX Pentra DX Nexus realiza as determinações, executando diferentes métodos analíticos, nomeadamente, impedância elétrica, espectrofotometria e medição de fluorescência após excitação de um laser.³

Impedância Elétrica

Relativamente à impedância elétrica, a contagem e avaliação do tamanho celular, é baseada na deteção e medida das alterações provocadas numa corrente elétrica (resistência), quando as células de uma amostra diluída num meio condutor passam, separadamente, através de uma micro-abertura calibrada onde a corrente é aplicada (ilustração 9). O número de impulsos gerados durante um período de tempo específico é proporcional ao número de células em suspensão e a amplitude do impulso elétrico indica o volume celular.

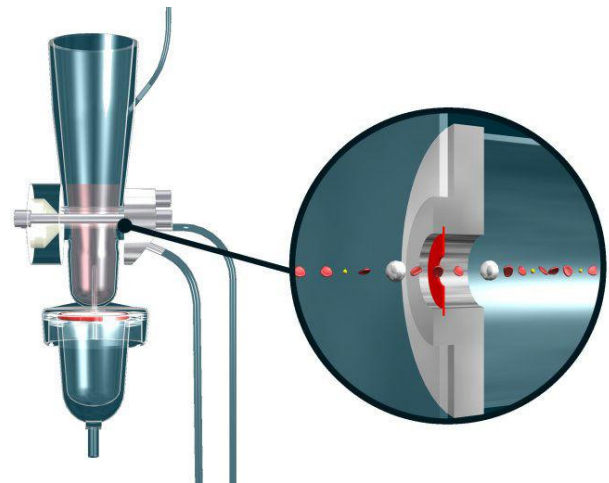


Ilustração 9 - Representação do método de impedância elétrica, adaptado de Manual do Utilizador Pentra DX Nexus [13]

Através da impedância elétrica, é determinada a contagem de eritrócitos, plaquetas e basófilos. Na contagem de basófilos, efetuada numa câmara distinta (*BASO chamber*), o analisador utiliza, inicialmente, o reagente ABX *Basolyse* que provoca a lise de todos os leucócitos à exceção dos basófilos. Após este passo é realizada a contagem dos basófilos pelo método supracitado, estando definido no analisador um valor limiar de volume celular,

³ **Nota:** Em determinadas patologias, nomeadamente envolvendo uma anormal e aumentada proliferação das células sanguíneas, o analisador ABX Pentra DX Nexus, tem a capacidade de emitir uma mensagem indicando a necessidade de diluição da amostra, dada a impossibilidade de efetuar uma contagem real do número de células.

permitindo a diferenciação daquelas células dos núcleos e dos restantes leucócitos lisados [13].

Doseamento de Hemoglobina

Para a determinação do valor de hemoglobina, na câmara WBC/HGB, o analisador aplica o método da metahemoglobina. Inicialmente, é realizado um passo de lise dos eritrócitos e é libertada a hemoglobina, através do reagente ABX *Lysebio*. Seguidamente, a hemoglobina livre é recombinada e forma-se a metahemoglobina. Com a presença deste composto em solução, procede-se à determinação espectrofotométrica da absorvância a um comprimento de onda de 550 nm. Posteriormente, a hemoglobina é calculada pelo analisador através do valor da absorvância da solução e de um coeficiente resultante de um ciclo em branco efetuado pelo analisador. A concentração da hemoglobina é diretamente proporcional à absorvância da solução [13].

Contagem Total de Leucócitos

A contagem total de leucócitos é efetuada na câmara WBC/HGB, a mesma que é utilizada no doseamento da hemoglobina. Nesta câmara, após a lise dos eritrócitos pelo reagente ABX *Lysebio*, procede-se à contagem do número de leucócitos pelo método de impedância elétrica. Relativamente ao volume das células contadas, o analisador apresenta um limiar entre o volume dos leucócitos, das plaquetas e dos restos celulares dos eritrócitos, o que permite a distinção da população dos leucócitos.

Além da contagem efetuada na câmara WBC/HGB, também na câmara dos basófilos se procede à contagem total dos leucócitos. Neste sentido, a soma do número de basófilos com a contagem dos núcleos dos leucócitos lisados, indica a contagem total de leucócitos. Automaticamente, o analisador determina ainda a percentagem dos basófilos na amostra.

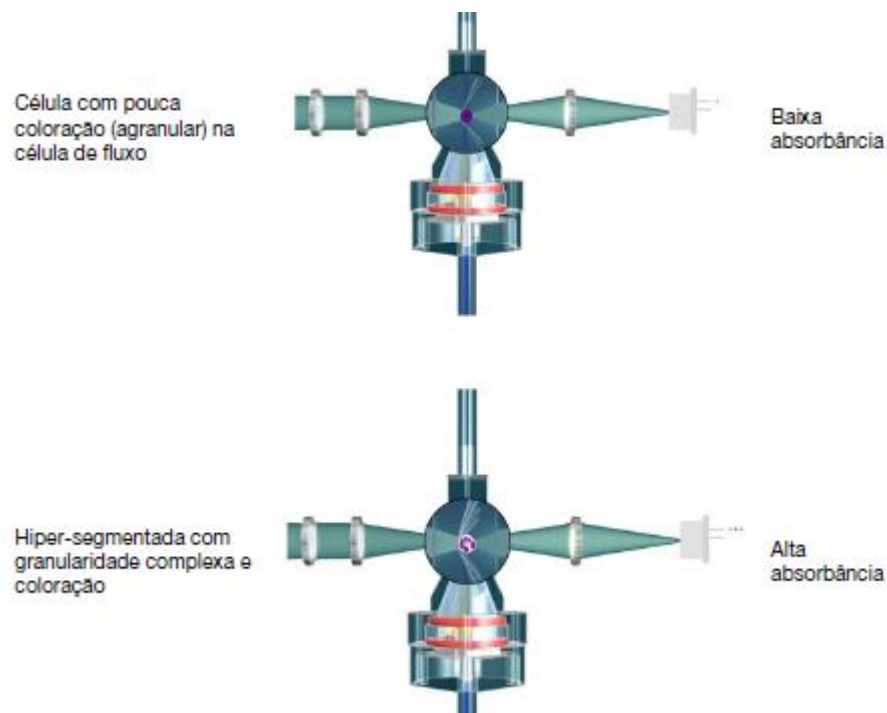
Por conseguinte, de modo a melhorar e/ou corrigir a contagem total absoluta e diferencial de leucócitos, o analisador procede a uma comparação entre a contagem na câmara WBC/HGB, na câmara dos basófilos e na câmara LMNE [13].

Contagem Diferencial de Leucócitos

No canal LMNE processa-se a contagem diferencial dos leucócitos. Nesta determinação, após um passo inicial de lise dos eritrócitos através do reagente ABX *Leucodiff*, o analisador aplica dois métodos distintos, que determinam a definição de *double hydrodynamic sleeving* (DHSS). Este reagente permite, ainda, estabilizar as formas nativas dos

leucócitos e corar os núcleos e granulações destes. Deste modo, na contagem diferencial de leucócitos, através de impedância elétrica, como explicado anteriormente, o analisador procede à contagem e análise do volume celular. Em seguida, a mesma célula é avaliada em termos de citoquímica, através da medição da absorvância por espectrofotometria. Relativamente à absorvância, esta resulta da coloração efetuada pelo reagente inicial. Neste contexto, a absorvância é proporcional à complexidade nuclear e ao teor em grânulos presente no citoplasma, como exemplificado na ilustração 10 [13].

Ilustração 10 – Determinação espectrofotométrica da citoquímica dos leucócitos, adaptado de Manual do Utilizador Pentra DX Nexus [13].



Após as determinações supracitadas, o analisador define as diferentes populações de leucócitos numa matriz, respetivamente Linfócitos, Neutrófilos, Eosinófilos e Monócitos, apresentando o volume celular no eixo dos XX e a complexidade citoquímica no eixo dos YY, como é exemplificado na ilustração 11. A semelhança em termos de volume e citoquímica, dentro de cada população de leucócitos, permite a clara diferenciação destes através da matriz desenvolvida pelo analisador. Contrariamente, em

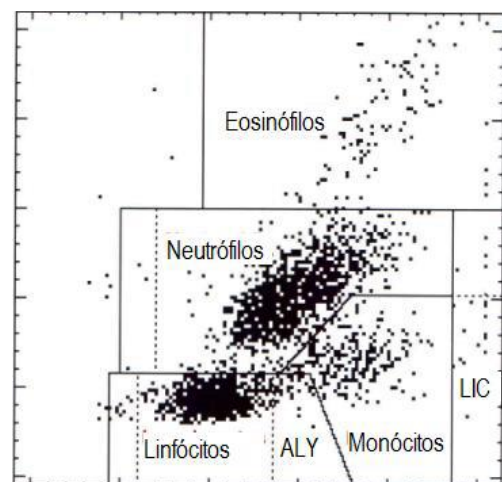


Ilustração 11 - Gráfico resultante da contagem diferencial de leucócitos, adaptado do Manual do Utilizador Pentra DX Nexus [13]

situações patológicas, a matriz não apresenta a linearidade indicada, pelo que, este fator se apresenta como um indicador para a visualização do esfregaço de SP, auxiliando deste modo no *screening* inicial de uma patologia hematológica. Como é visível na ilustração 11, a matriz permite ainda a discriminação de linfócitos atípicos (ALY) e células imaturas (LIC) [13].

Reticulócitos

Na determinação de reticulócitos, o analisador utiliza o reagente ABX *Fluocyte*. Especificamente, este reagente vai efetuar uma coloração fluorescente dos ácidos nucleicos presentes nos reticulócitos. O composto responsável por esta coloração designa-se por Laranja de Tiazol.

Seguidamente, através do laser ótico (diferente da luz emitida para a análise espectrofotométrica) procede-se a uma medição tripla, nomeadamente do volume celular pelo método de impedância elétrica, medição da luz dispersa frontalmente (*Forward Scattered Light* de forma semelhante à citometria de fluxo) e do sinal de fluorescência emitido (decorrente da excitação pelo laser) a um ângulo de 90° relativamente ao fluxo celular. As lentes de captação da fluorescência apresentam um filtro específico de captação da fluorescência, oriunda da coloração do Laranja de Tiazol. Neste contexto, a fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos presentes na célula.

Através desta medição, o analisador indica a contagem absoluta de reticulócitos e a percentagem destes na contagem total de eritrócitos. Após a tripla medição, analogamente ao efetuado na contagem diferencial de leucócitos, o analisador elabora uma matriz, indicando no eixo dos XX o volume celular e no eixo dos YY a concentração de ácidos nucleicos, permitindo, ainda, a diferenciação em reticulócitos com baixo, médio e alto conteúdo de ácidos nucleicos, como é exemplo a ilustração 12. Em relação à matriz da contagem de reticulócitos, é de salientar a mancha dominante na base do gráfico que indica os eritrócitos analisados. Seguidamente e, de forma ascendente (pelo eixo dos YY), o primeiro, segundo e terceiro retângulos, indicam, respetivamente, os reticulócitos que apresentam baixo, médio e alto conteúdo de ácidos nucleicos [13]

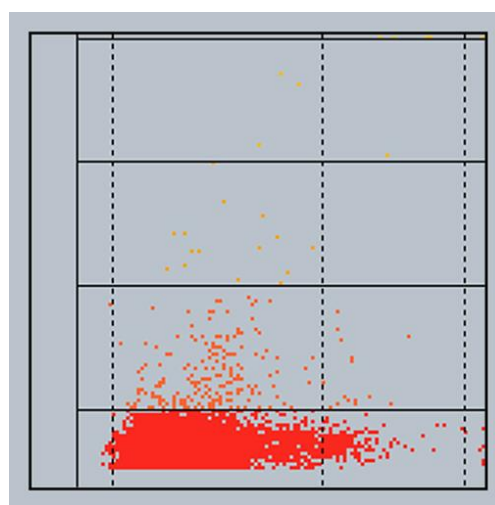


Ilustração 12 - Gráfico resultante da contagem de reticulócitos, adaptado do Manual do Utilizador Pentra DX Nexus [13]

Restantes Parâmetros

Em relação aos restantes parâmetros, o analisador procede à sua determinação, através de cálculos estatísticos derivados de outras determinações, como é indicado na tabela 7.

Tabela 7 – Cálculos estatísticos efetuados pelo analisador para a determinação dos restantes parâmetros

| Parâmetro | Modo de cálculo | Observação |
|------------------|---|--|
| MCV | - | O MCV é calculado diretamente do histograma da contagem de eritrócitos. |
| MCH (pg) | $(HGB/RBC) \times 100$ | - |
| MCHC (g/dL) | $(HGB/HCT) \times 100$ | - |
| Hct | - | O hematócrito é medido em função da contagem de eritrócitos através da integração numérica do MCV. |
| RDW | $(k \times dp) / MCV$ | k – constante do sistema dp – desvio padrão determinado de acordo com estudos estatísticos da distribuição celular. |
| MPV | - | O MPV é diretamente derivado da análise da curva de distribuição das plaquetas |
| Pct | $[Plt (10^3/mm^3) \times MPV(\mu m^3)] / 10\ 000$ | - |
| PDW | - | O PDW é calculado diretamente curva de distribuição das plaquetas |
| RET# | $(RET\% \times RBC\#) / 100$ | - |
| RETL% | $(RETL\# \times 100) / RET\#$ | - |
| RETM% | $(RETM\# \times 100) / RET\#$ | - |
| RETH% | $(RETH\# \times 100) / RET\#$ | - |

Fonte: Elaborado pelo autor [13]

4. Esfregaço de Sangue Periférico (SP)

No Sector da Hematologia, a execução e coloração do esfregaço de SP é totalmente manual, estando o seu procedimento detalhado no Anexo C e no Anexo D.⁴ No entanto, o que importa referir, é a sua aplicabilidade e respetiva importância clínica. Neste sentido, o esfregaço é realizado quando solicitado pelo clínico e quando o TSS pretende confirmar ou rejeitar uma análise efetuada pelo analisador ABX Pentra DX Nexus. Por vezes, determinados resultados evidenciados pelo analisador, comparando com a informação clínica do doente e com o seu histórico de análises, são questionáveis, dada a fonte de variáveis que podem determinar o desvio dos resultados.

Relativamente à aplicabilidade do esfregaço de SP, o exame microscópico oferece a possibilidade de avaliar qualitativa e quantitativamente as diferentes linhagens celulares, nomeadamente:

- Eritrócitos - Avaliação Qualitativa (anisocitose, anisocromia, poiquilocitose e policromasia) [10]
- Plaquetas - Avaliação Qualitativa (anisocitose e agregados, muito importante na avaliação de falsas trombocitopenias indicadas pelo analisador) [10]
- Leucócitos - A contagem diferencial é de grande importância podendo definir perfis patológicos, pela avaliação qualitativa e quantitativa das diferentes formas leucocitárias [10]

Em relação à importância clínica, a primeira suposição de algo questionável resulta da análise da matriz, derivada da contagem diferencial de leucócitos. Nestas circunstâncias, quando as diferentes populações leucocitárias não são bem definidas e, em muitos dos casos o analisador não consegue definir a respetiva contagem diferencial, parte-se para a realização do esfregaço de SP e consecutiva contagem diferencial de leucócitos manual, de modo a serem estabelecidas as respetivas percentagens.

⁴ **Nota:** Além dos esfregaços de SP, no Sector da Hematologia, é ainda realizada a coloração dos esfregaços de Medula Óssea (MO) preparadas pelo Dr. Carlos Seabra. Relativamente àqueles esfregaços, rotineiramente, é efetuada a coloração a dois de cada amostra de MO, um pela Coloração de Perl's (ver anexo E) e outro pela coloração de May-Grunwald Giemsa (ver anexo F).

Na contagem manual, através de um contador digital, são contados 100 leucócitos e determina-se a percentagem de cada um. Por fim, separadamente, através da multiplicação das percentagens, pela contagem total de leucócitos (indicada pelo analisador), são calculadas as contagens absolutas de cada tipo de leucócitos.

Além da impossibilidade de definir a fórmula leucocitária, o analisador pode ainda indicar a presença de células imaturas no SP. Neste contexto, procede-se à realização do esfregaço e confirmação das respetivas células por visualização microscópica. A correta identificação de blastos pelo TSS assume especial interesse, dada a importante informação clínica transmitida ao médico.

Relativamente aos blastos e, especificamente os eritroblastos (ilustração 13), são interpretados pelo analisador como leucócitos. Neste contexto, resulta uma determinação errada da contagem total e diferencial de leucócitos. Nesta situação, através do esfregaço de SP, é realizada a correção das contagens supracitadas. Neste sentido, efetua-se a

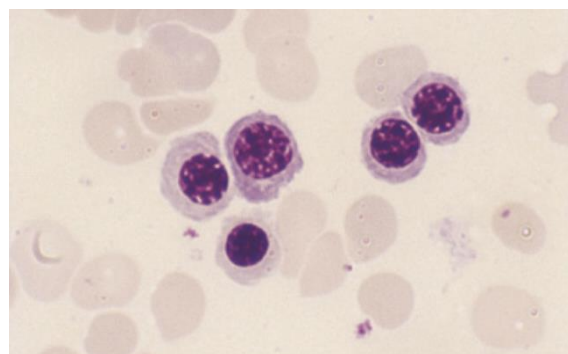


Ilustração 13 – Eritroblastos, adaptado de Fundamentos em Hematologia [14]

contagem de 100 leucócitos e, simultaneamente, são contados os eritroblastos visualizados ao longo da contagem dos leucócitos. Relativamente aos leucócitos, é determinada a percentagem de cada tipo, para no fim ser calculada a contagem absoluta de cada tipo de leucócitos. Seguidamente, através de uma razão 3 simples é determinado o real número de leucócitos presente na amostra.

Num contexto diferente, relativamente aos eritrócitos, quando o analisador apresenta os índices globulares muito aumentados (especialmente o MCH e MCHC), parte-se para a suspeita de aglutininas a frio. Como referido anteriormente, o aquecimento da amostra, antes da análise soluciona o problema, no entanto, nestes casos, a realização de um esfregaço a frio, pode confirmar a presença da aglutinação. É de destacar que, o processo de aquecimento permite a análise da mesma amostra, obtendo-se resultados reais para a contagem de eritrócitos e conseqüentemente para todos os índices que são calculados em função daquele parâmetro [2].

Por fim, relativamente aos eritrócitos, a observação de policromasia (ilustração 7), é também um bom indicador da presença de reticulócitos no SP [10].

5. Hemoglobinas Variantes

As combinações entre as cadeias das globinas (alfa, beta, gama e delta) com o grupo heme formam as diferentes hemoglobinas humanas, denominadas por hemoglobina A1 ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) e hemoglobina fetal (F) ($\alpha_2\gamma_2$).

A síntese das cadeias globínicas alfa, beta, gama e delta, exige um rigoroso controlo genético, do qual resulta um equilíbrio de produção de cada uma das cadeias. Após a maturação proteica e respetiva formação do tetrâmero das globinas, num indivíduo saudável, estão presentes as seguintes hemoglobinas: A1, A2 e F, respetivamente nas seguintes concentrações 96,0 a 98,0%, 2,0 a 3,0% e igual ou inferior a 1% [15,16]. No entanto, em situações patológicas de carácter genético, podem ocorrer alterações qualitativas e quantitativas na síntese estrutural das globinas, resultando no primeiro caso em hemoglobinopatias com produção de hemoglobinas anormais ou variantes. Dentro das variantes genéticas podem ser destacadas as hemoglobinas S, C, entre outras [15,17]

Relativamente às hemoglobinas A2 e F, o seu doseamento assume especial importância no diagnóstico de Talassemias. [16]

Contrariamente e, tendo em conta as alterações qualitativas, a hemoglobina S, presente na anemia falciforme, é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no Homem. Causada por uma mutação no gene da beta da globina, produz uma alteração estrutural na molécula, através da substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da beta globina. Os eritrócitos com a variante de hemoglobina S (Hb S) apresentam um fenómeno falciforme (ilustração 14), fisiologicamente provocado pela baixa tensão de oxigénio, acidose e desidratação. As células falciformes apresentam a forma de foice ou de lua, com consequências variáveis no portador, dependentes da quantidade de hemoglobina S [18].

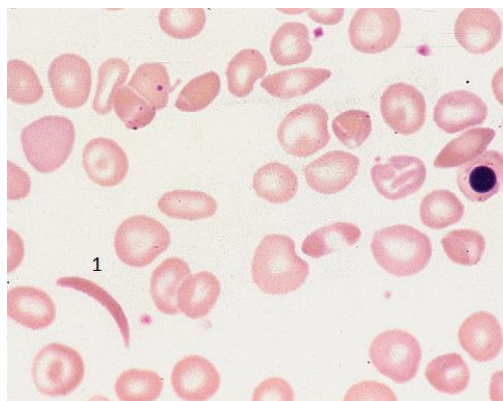


Ilustração 14 - Esfregaço de Anemia Falciforme - Célula falciforme (1), adaptado de Dacie And Lewis Practical Haematology [19]

Clinicamente importante, a hemoglobina A1c ou hemoglobina glicada é a fração da hemoglobina maioritariamente monitorizada na clínica. O doseamento da hemoglobina A1c assume particular interesse no diagnóstico e classificação de Diabetes Mellitus, bem como, na monitorização do índice de glicose em indivíduos já diagnosticados. Uma elevada concentração de glicose sanguínea durante longos períodos de tempo, leva à ocorrência de um processo de glicação não enzimático da hemoglobina. Neste processo, dividido em duas

fases, inicialmente a glicose condensa-se com uma valina N terminal das cadeias β , dando origem a uma aldimina instável. Seguidamente, através de um rearranjo de Amadori, ocorre a transformação para a forma de ceto-amina estável, designada de hemoglobina A1c. Como o processo de glicação está dependente do tempo de semivida dos eritrócitos, o doseamento da hemoglobina A1c é um indicador dos valores de glicemia atingidos nos 2 a 4 meses precedentes à análise. Neste contexto, esta determinação permite uma avaliação retrospectiva da eficácia da terapêutica diabética [20,21]. Atualmente, em relação aos utentes do CHBV, a manutenção do nível de A1C inferior a 7% é considerada como uma das principais metas da terapêutica no controlo da Diabetes Mellitus.

Neste contexto, no Sector da Hematologia, são efetuados as determinações da concentração das hemoglobinas variantes supracitadas, nomeadamente A2, F e S e da fração A1c, através do analisador D-10 da casa comercial BIO-RAD.

Relativamente à rotina laboratorial deste Sector, devido ao reduzido volume de amostras para a determinação de hemoglobinas A2, F e S, e com vista à poupança de reagentes, aqueles parâmetros podem ser acumulados durante a semana. Contrariamente, em relação à variante A1c, procede-se à sua determinação diariamente.

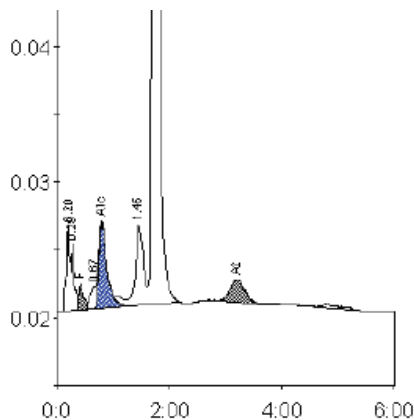
6. D-10

O analisador D-10 (Bio Rad) (ilustração 15) apresenta-se como um sistema automatizado para a separação de hemoglobinas variantes através do método de HPLC (*high-performance liquid chromatography*).

Quanto ao princípio do método, especificamente neste tipo de cromatografia líquida, a separação das diferentes hemoglobinas é baseada na troca iónica entre estas e a coluna cromatográfica. A afinidade, baseada na troca iónica, entre a substância presente no lúmen da coluna e as diferentes hemoglobinas, vai determinar a separação sequencial destas. Neste método, o analisador utiliza os reagentes *Elution Buffer* 1 e 2 que constituem o eluente, responsável pela eluição das diferentes hemoglobinas da coluna cromatográfica. Após a saída da coluna, o eluente é medido fotometricamente a 415 nm, de forma a ser avaliada a variação da absorvância provocada pela presença das diferentes hemoglobinas em suspensão [22].



Ilustração 15 - Analisador D-10
(<http://www.bio-rad.com/en-pt/category/d-10-hemoglobin-testing-system>)



Peak table - ID: ZX012104

| Peak | R.time | Height | Area | Area % |
|-------------|--------|--------|---------|---------|
| A1a | 0.20 | 6272 | 29570 | 2.0 |
| A1b | 0.28 | 4916 | 16182 | 1.1 |
| F | 0.42 | 1962 | 12076 | < 0.8 * |
| LA1c/CHb-1 | 0.67 | 1692 | 11897 | 0.8 |
| A1c | 0.80 | 6280 | 62837 | 5.8 |
| P3 | 1.45 | 5984 | 57425 | 3.9 |
| A0 | 1.71 | 238640 | 1247984 | 85.1 |
| A2 | 3.19 | 1647 | 28742 | 2.4 |
| Total Area: | | | 1466712 | |

Através da variação da absorvância e da análise dos diferentes tempos de retenção das hemoglobinas, o analisador determina um cromatograma (ilustração 16), onde são indicados os diferentes picos de hemoglobina em função do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica [22]. Pela separação de todas as hemoglobinas, incluindo a fração A1c, o analisador determina a percentagem de cada uma, como é indicado no resultado de uma cromatografia, evidenciado na ilustração 16.

Ilustração 16 - Cromatograma de paciente com níveis normais das hemoglobinas A2 e F, adaptado do Manual de Instruções D-10 [22]

7. Velocidade de Sedimentação

Relativamente ao princípio do teste, caracteriza-se pela medição da altura da coluna de plasma desprovido de eritrócitos ao fim de uma hora de sedimentação. Embora tratando-se de um teste totalmente inespecífico, a VS é largamente utilizada na Clínica.

Neste contexto, é um teste utilizado como indicador do processo inflamatório, infeccioso e neoplásico e ainda na monitorização da resposta à terapêutica. A inespecificidade característica da VS resulta da alteração do seu valor em praticamente todas as patologias, nomeadamente que afetam: de forma quantitativa e qualitativa as células sanguíneas e a concentração de proteínas plasmáticas, como globulinas e fibrinogénio. Neste contexto, posso destacar que, indivíduos com hematócrito diminuído apresentam uma VS aumentada e, num processo inflamatório, em que ocorre um aumento da produção de fibrinogénio e globulinas (proteínas carregadas positivamente), a carga negativa dos eritrócitos é parcialmente neutralizada, resultando na sua aproximação e na tendência para a agregação, formando complexos que sedimentam mais rapidamente [10,23].

Quanto ao procedimento, inicialmente, a amostra deve ser corretamente homogeneizada, verificada a ausência de coágulos e o correto volume de amostra. Após a



Ilustração 17 - SediPlus S-2000
[\(https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/blood-sedimentation/sediplus-devices/product/90189700/\)](https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/blood-sedimentation/sediplus-devices/product/90189700/)

verificação, este é introduzido no SediPlus S-2000 (ilustração 17), aparelho que faz a leitura da VS ao fim de 30 e 60 minutos.

No CHBV, relativamente aos valores de referência, valores inferiores a 15 e 20 mm indicam respetivamente a normalidade para indivíduos do sexo masculino e feminino.

8. Estudo da Coagulação

O Sistema Hemostático é responsável pelo processo de coagulação sanguínea. Fisiologicamente protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão dos tecidos ocorra a sua reparação e o restabelecimento das suas funções. A Coagulação sanguínea depende de complexas interações entre a parede dos vasos, as plaquetas e os mecanismos de coagulação e fibrinólise. Neste contexto, é um dos mecanismos de defesa mais importantes do organismo, pois preserva a integridade da circulação e limita a perda de sangue. A sequência de reações locais que levam ao controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado, define-se como Hemóstase. É regulada por diferentes mecanismos e inclui várias fases, nomeadamente, Resposta vascular (constrição do vaso lesado), Hemóstase primária (formação do trombo plaquetário) e Hemóstase secundária (formação do coágulo de fibrina) [24,25,26].

Classicamente, a cascata da coagulação (ilustração 18) é dividida em via intrínseca, em que todos os fatores necessários estão presentes em circulação e a reação inicial é o contacto com superfícies carregadas negativamente, e em via extrínseca (ou dependente do fator tecidual) que é ativada na sequência de uma lesão vascular. Após a ativação do fator X, as duas vias convergem numa só, designada por via comum [24,25,26]

Neste contexto, no Sector da Hematologia (na área do estudo da Coagulação) são efetuadas as seguintes determinações analíticas através do analisador BCS: Tempo de Protrombina (TP), Razão Normalizada Internacional (INR), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), Fibrinogénio, D-Dímeros, Proteína C, Proteína S e Antitrombina III.⁵

⁵ **Nota:** Os valores de referência para os parâmetros supracitados podem ser consultados no Anexo B.

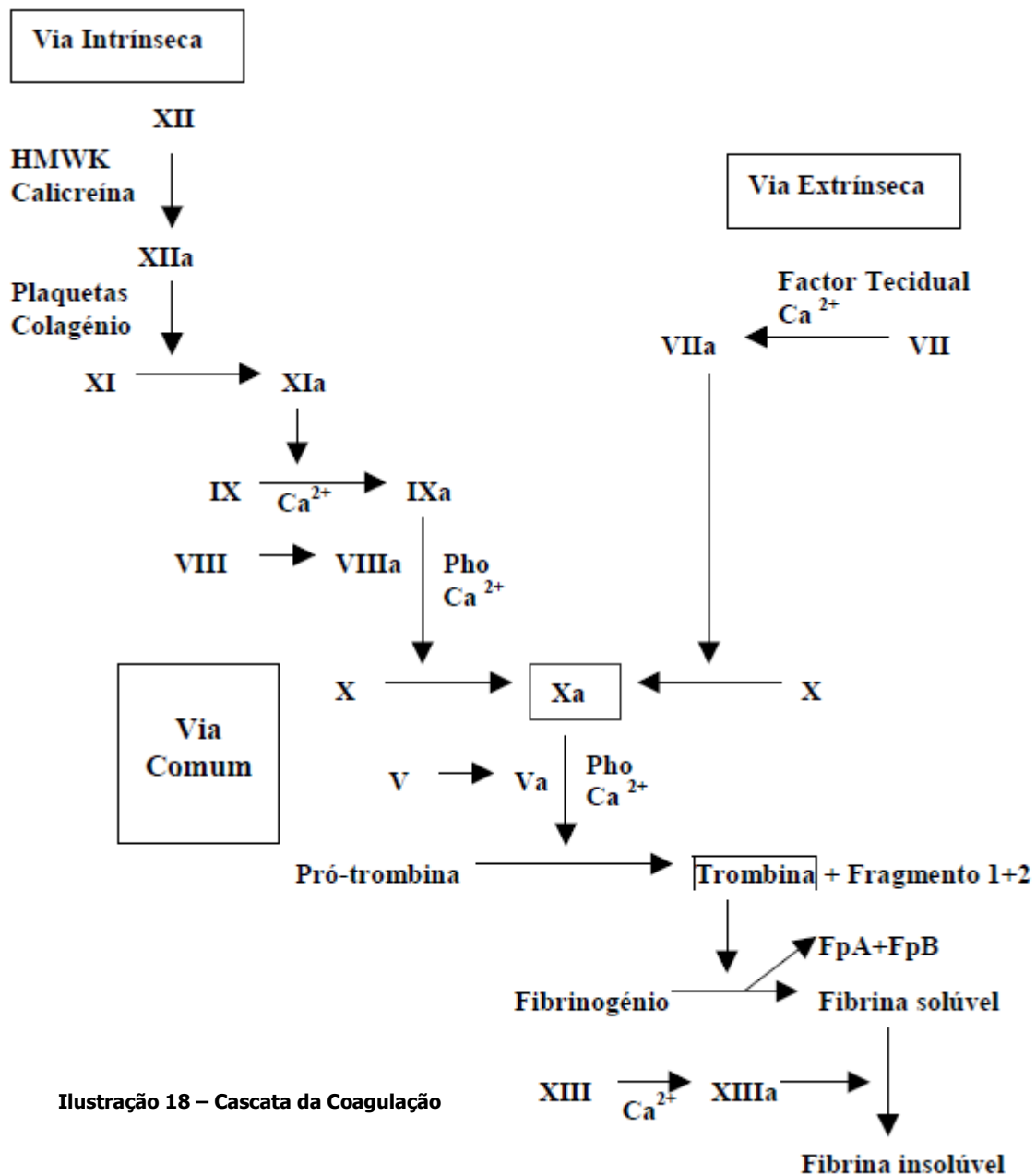


Ilustração 18 – Cascata da Coagulação

Tempo de Protrombina (TP)

O TP avalia a via extrínseca da cascata da coagulação bem como a subsequente via comum. Reflete alterações em três dos fatores dependentes da vitamina K (fator II, VII e X) e do fator V. A sua determinação é maioritariamente utilizada na monitorização da terapia anticoagulante por via oral, no diagnóstico de deficiências congénitas de fatores do sistema extrínseco, no controlo da atividade de síntese hepática em doenças do fígado, entre outros [26,27].

De forma a uniformizar a variabilidade inerente à determinação do TP em todo o Mundo, a Organização Mundial de Saúde, propôs que a tromboplastina fosse padronizada segundo uma preparação de referência internacional e, neste sentido, criou o Índice de

Sensibilidade Internacional (ISI). Após a determinação do ISI da tromboplastina, os resultados podem ser referenciados como a Razão Normalizada Internacional (INR). Conceptualmente é a razão entre o PT do paciente e o PT de controlo, elevada ao ISI. Um prolongamento do INR pode traduzir um distúrbio relacionado com os fatores supracitados. Contrariamente, a diminuição do INR ocorre em estados pró-trombóticos (incluindo períodos pós-parto ou pós-cirúrgico). O INR é aplicado na monitorização de doentes a efetuar terapia anticoagulante oral. Neste sentido, na prevenção das seguintes patologias: trombose venosa profunda, embolia pulmonar ou doenças arteriais, o INR recomendado é entre 2 e 3. Para doentes com válvulas cardíacas artificiais ou que sofram de embolias sistémicas recidivantes, é aconselhável um INR entre 3 e 4 [28].

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)

A determinação do aPTT apresenta-se como um importante teste de *screening* no diagnóstico de perturbações da coagulação e na monitorização da terapia com heparina não fracionada, em pacientes com propensão para hemorragias ou trombozes [26,27].

O aPTT avalia a via intrínseca da cascata da coagulação, testando a pré-caliceína, o cininogénio de alto peso molecular e os fatores XII, XI, IX e VIII. Consequentemente avalia também a via comum (fatores X, V, II e I). Um valor de aPTT prolongado pode ser decorrente da terapêutica com heparina, ou pode indicar um distúrbio nos fatores supracitados. Contrariamente, a diminuição do aPTT pode acontecer em estados de hipercoaguabilidade, como gravidez, cirurgias, trombose venosa profunda, entre outros fatores [26,27].

Fibrinogénio

A determinação de fibrinogénio, uma proteína sintetizada no fígado permite avaliar a fibrinogénese e efetuar o *screening* de anomalias congénitas do fibrinogénio (disfibrinogenemias e hipofibrinogenemias). É um marcador útil na avaliação de diversas doenças incluindo a coagulação intravascular disseminada (CID), disfunções hepáticas, quadros inflamatórios e tumores malignos. Com o aumento da idade, observam-se níveis de fibrinogénio ligeiramente aumentados. É de salientar que, um nível elevado de fibrinogénio apresenta-se como um fator de risco para as doenças cardiovasculares [27].

D-Dímeros

Em resposta ao processo de coagulação, o sistema fibrinolítico é ativado resultando na conversão de plasminogénio em plasmina, o que leva à clivagem da fibrina nos fragmentos D e E. Devido à ligação transversal entre os domínios D no coágulo de fibrina, a ação da plasmina leva à libertação de produtos de degradação da fibrina com domínios D ligados transversalmente. A unidade mais pequena é designada de D-Dímero. Neste sentido, a deteção de D-Dímeros é um indicador de atividade de coagulação [29].

São observados níveis elevados de D-Dímeros, em todas as patologias e condições com ativação da coagulação aumentada, como é exemplo a doença tromboembólica, Coagulopatia Intravascular Disseminada (CID), enfarte do miocárdio, terceiro trimestre de gravidez, cirurgia, entre outras condições. Neste contexto, a determinação de D-Dímeros apresenta-se algo inespecífica. No entanto, perante resultados inferiores ao limiar, podem ser excluídos fenómenos tromboembólicos, assumindo-se como um teste com valor preditivo negativo [29].

Proteína C

A Proteína C é uma glicoproteína plasmática (sintetizada no fígado), dependente da vitamina K e circula no sangue sob a forma de zimogénio. As suas propriedades anticoagulantes residem na sua capacidade de inativar os cofatores Va e VIIIa por degradação proteolítica.

A sua reduzida concentração plasmática pode ser devida a uma deficiência congénita, de carácter homozigótica (se não tratada conduz a um tromboembolismo maciço e fatal logo após o nascimento) ou heterozigótica (leva a uma elevada incidência de tromboes venosas, dependentes da idade). Noutro contexto, os défices adquiridos de Proteína C estão associados a doenças hepáticas, a terapêutica com anticoagulantes orais, CID ou simplesmente a uma deficiência da vitamina K [29,30].

Proteína S

A Proteína S caracteriza-se como o cofator da Proteína C, pelo que, estimula a inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa, tal como explicado anteriormente. Tal como a Proteína C, é dependente da Vitamina K e está presente no plasma sob a forma de proteína livre ativa e inativa ligada à proteína C4b. Uma redução da atividade da Proteína S, devido a variados fatores, como: distúrbio genético, perturbação hepática, anticoagulação oral, gravidez, entre outros, aumenta o risco tromboembólico [29,30].

Antitrombina III (ATIII)

A ATIII define-se como um inibidor plasmático da trombina e do fator X ativado, pela formação de um complexo inativo com estas enzimas. O processo de inativação é potenciado fortemente pela heparina. Neste contexto, a determinação da ATIII, assume-se com um indicador da atividade fibrinolítica. Assim, fisiologicamente, estados de deficiência de ATIII, quer de causa genética quer adquirida, representam um risco elevado de tromboembolismo [30].⁶

9. BCS XP

Como referido anteriormente, no Sector da Hematologia, estão presentes dois analisadores BCS XP da casa comercial Siemens, no entanto, diariamente, apenas um se encontra em atividade, pelo que, os controlos de qualidade apenas são efetuados nesse analisador.

O analisador BCS XP (ilustração 19) define-se como um sistema de coagulação para o processamento de análises coagulométricas, cromogénicas e de química imunológica em amostras de plasma.

Nas reações coagulométricas é aplicado o método de deteção por turbidimetria. Neste tipo de ensaio, é medido o tempo que demora a formar um coágulo de fibrina ou a atingir outro ponto limite. O tempo medido vai desde a mistura do preparado até formação de coágulos, que são detetados turbidimetricamente pela formação de fibrina que reduz a quantidade de luz transmitida devido ao aumento da turvação. Através deste método o analisador determina o TP, o aPTT, a Proteína S e o Fibrinogénio Clauss [31].

Relativamente às recções cromogénicas, os analitos são medidos enzimaticamente com recurso a substratos cromogénicos. Na presença do analito alvo, ocorre a formação de um pigmento e, através do método de fotometria é medida a absorvância da solução a um comprimento de onda de 405 nm que, através da curva de calibração permite calcular a



Ilustração 19 - Analisador BCS XP
(<http://www.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/bcs-xp-system>)

⁶ **Nota:** Relativamente à rotina laboratorial desta área, devido ao reduzido volume de amostras para a determinação das Proteínas C e S e Antitrombina III, e com vista à poupança de reagentes, aqueles parâmetros são acumulados durante a semana e analisados geralmente à quarta-feira.

concentração do analito alvo. Este método é aplicado na determinação da Proteína C e ATIII [31].

Por fim, nos métodos imunquímicos, a amostra é colocada a reagir com anticorpos específicos ligados a partículas de látex. Em presença do analito alvo, ocorre a reação específica antígeno-anticorpo que culmina com a formação de agregados. Turbidimetricamente é medida a alteração da turvação provocada por aqueles agregados. Através deste método (aplicado na determinação de D-Dímeros) é medida a velocidade da alteração da turvação que é proporcional ao analito alvo [31].

10. Citometria de fluxo

No Sector de Hematologia do CHBV, também se encontra uma área destinada à citometria de fluxo. Esta área dedica-se exclusivamente à imunofenotipagem de populações linfocitárias.

A imunofenotipagem de populações linfocitárias é de grande utilidade clínica e tem valor no acompanhamento e prognóstico de diferentes patologias. A grande maioria das amostras com pedido de populações linfocitárias são de doentes com HIV positivo, porque a taxa de linfócitos T CD4, juntamente com monitorização da carga viral, constitui um marcador de evolução muito precioso e um dos melhores elementos de prognóstico da doença. A diminuição da taxa de linfócitos T CD4 em infeções pelo HIV 1 e 2, deve-se ao facto do vírus encontrar nestas células (entre outras) o recetor de membrana necessário para o seu ciclo biológico, causando a sua destruição e desequilíbrio no sistema imune, gerando imunodeficiência [32,33].

Este tipo de análises recorre a anticorpos monoclonais, classificados como “*cluster or differentiation*” ou CD, que vão reconhecer os antígenos membranares presentes nas células. No Sector de Hematologia são usados os seguintes anticorpos monoclonais:

- CD3+CD4+ - Linfócitos T CD4
- CD3+CD8+ - Linfócitos T CD8
- CD19+ - Linfócitos B
- CD3-CD56+ - Linfócitos NK



Ilustração 20 - Cytomics FC 500
(<http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/flow-cytometry/index.htm>)

Após a lise dos glóbulos vermelhos, as diferentes populações linfocitárias são marcadas pelos anticorpos monoclonais (CD) ligados a um fluorocromo, analisando-se de seguida por citometria de fluxo as intensidades de fluorescência provenientes dos linfócitos marcados pelos anticorpos [33].

O Citometro utilizado é o Cytomics FC 500 da casa comercial Beckman Coulter.⁷

II. Pesquisa de *Plasmodium sp*

O *plasmodium sp* é o agente etiológico da Malaria. Existem 4 espécies de *Plasmodium* que podem parasitar o Homem (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*), no entanto o responsável pela maioria dos casos de Malária é o *P. falciparum* [34].

A prevalência da doença depende da distribuição do vetor de infeção (mosquitos fêmea *Anopheles*) necessário para a sua transmissão natural a qual, por sua vez, é determinada por fatores ambientais como a temperatura e a humidade. Apesar de Portugal ser uma zona não endémica, nas últimas décadas, o aumento do volume de viagens internacionais, nomeadamente para destinos tropicais, endémicos para esta doença, provocou um aumento dos casos [35].

A Pesquisa de *Plasmodium sp* consiste em encontrar o parasita através da observação microscópica do esfregaço de SP. O *plasmodium sp* apresenta várias formas de acordo com a fase do seu ciclo de vida, no caso do *P. falciparum* podemos encontrar 3 formas distintas: trofozoíto, gametócito e esquizonte, apesar da forma de esquizonte raramente circular em infeções por *P. falciparum* (ilustrações 21 e 22) [34].

O resultado da pesquisa de *Plasmodium sp* é dado como positivo ou negativo.

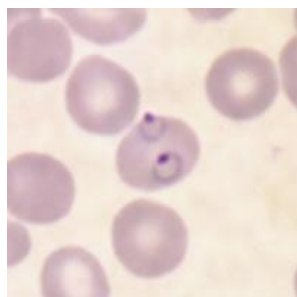


Ilustração 22 – Trofozoíto de *Plasmodium falciparum*, adaptado de Dacie And Lewis Practical Haematology [36]

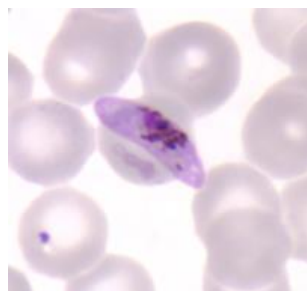


Ilustração 21 – Gametócito de *Plasmodium falciparum*, adaptado de Dacie And Lewis Practical Haematology [36]

⁷ **Nota:** Este tipo de análise é realizado à terça-feira e quinta-feira. O número de amostras não justifica a sua realização diária, sendo esta mais uma medida de poupança de reagentes por parte do Serviço.

VII. Sector de Química Clínica e Imunoquímica

O Sector de Química Clínica e Imunoquímica do Serviço de Patologia Clínica do CHBV é o sector que recebe mais amostras e o que realiza a maior quantidade de determinações analíticas. A área de Química Clínica realiza todas as determinações de parâmetros bioquímicos e monitorização de fármacos, enquanto que a área de Imunoquímica contempla, principalmente, a determinação de hormonas, marcadores tumorais e marcadores séricos de doenças infecciosas.

I. Preparação das amostras

No Sector de Química Clínica e Imunoquímica são utilizados tubos sem preparação, tubos de Heparina-Lítio (doentes oncológicos), tubos de EDTA (por ex. determinação BNP), seringas heparinizadas (Gasimetria), amostras de urina (inclui urina de 12 e 24 horas) e Líquido Cefalorraquidiano (LCR). Em relação aos tubos com e sem anticoagulantes e urina, antes de serem introduzidos na cadeia automatizada têm de ser previamente centrifugados durante 10 min a 3500 rpm. Após centrifugação é necessária a avaliação da qualidade do plasma/soro obtido, nomeadamente ao nível da hemólise, lipémia e icterícia. Alguns parâmetros requerem que a amostra de urina seja de 12 ou 24 horas, devido á necessidade de se conhecer o seu volume, como é o caso das Proteínas totais.

2. ADVIA Labcell

A fim de aumentar a produtividade e a rapidez de execução das análises, o Sector dispõe de um sistema Core Laboratorial, caracterizado por uma cadeia automatizada de distribuição de soros – ADVIA Labcell.

A Célula de Trabalho Analítica ADVIA Labcell é um sistema modular concebido para automatizar o manuseamento e processamento das amostras no laboratório clínico. Esta cadeia de transporte reúne os instrumentos analíticos ADVIA 1800 e ADVIA Centaur XP numa estação de trabalho única, através da utilização de uma capacidade de processamento de amostras em comum. O *software* da célula de trabalho, CentraLink, permite a gestão de tarefas, a gestão de dados e a monitorização do estado de funcionamento dos analisadores. Isto é conseguido através de ligações de comunicação entre a célula de trabalho, os analisadores e o sistema informático interno do hospital, nomeadamente o *software* Appolo.

Os principais componentes da célula de trabalho são o módulo de entrada/saída “*Sample Manager*”, o módulo descapsulador e o módulo de transporte.

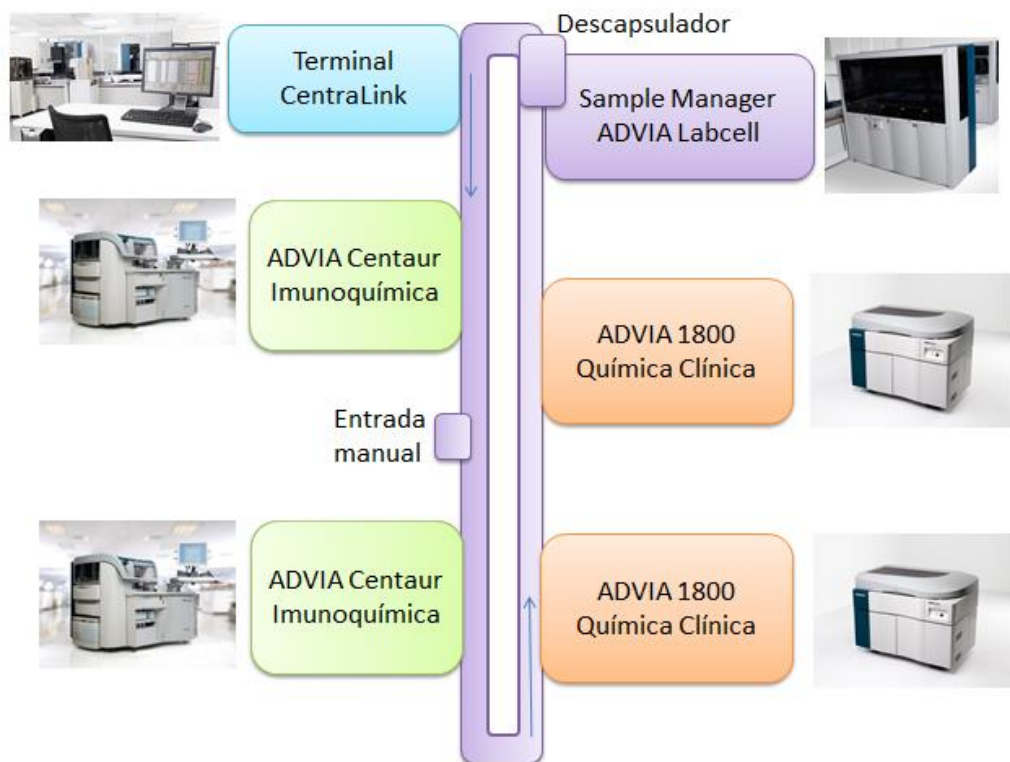


Ilustração 23 - Esquema do Core laboratorial

O módulo de entrada/saída é constituído por um conjunto de 10 racks com 100 posições cada (onde são introduzidas as amostras) e por um robot que introduz os tubos na cadeia de transporte. Permite ainda a identificação e o acompanhamento de tubos com código de barras, funcionando como a interface do utilizador. Seguidamente, o descapsulador, finaliza a preparação dos tubos contendo os soros e o módulo de transporte leva continuamente os tubos até aos analisadores, para ser(em) efetuada(s) a(s) análise(s) respetivas de cada paciente, sendo esta ação efetuada através da comunicação entre o sistema informático Appolo, o CentraLink e os analisadores respetivos, através da leitura de códigos de barra.

É de notar que os tubos permanecem sempre na cadeia e nunca dão entrada diretamente no interior dos analisadores, os braços pipetadores dos aparelhos permitem pipetar uma amostra de soro diretamente da cadeia de transporte e a partir daí desenvolver as respetivas análises. Após a pipetagem, os soros completam o circuito de transporte, no entanto podem ser pipetados por ambos os analisadores, consoante as respetivas análises pedidas, e regressam ao início da cadeia onde automaticamente são arrumados em racks de saída com posicionamento pré-definido.

A Célula de Trabalho Analítica ADVIA Labcell, permite ainda introduzir tubos descapsulados através de uma entrada manual e o *software* CentraLink, possibilita ao

operador programar manualmente análises a tubos específicos e ainda localizar tubos na cadeia e nas racks de saída, facilitando assim o manuseamento dos soros e aumentando a rapidez das análises.

Para concluir, e de modo a aumentar os bons resultados e bom funcionamento do laboratório, o *software* CentraLink, permite colocar em Off-line e On-line os analisadores, sempre que for necessário, bem como emite informações relativamente a erros de análise que tenham ocorrido ou a resultados alarmantes obtidos, suscetíveis de não validação.



Ilustração 24 - Analisador ADVIA Centaur XP
(<http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaur-xp>)

3. ADVIA Centaur XP

O analisador ADVIA Centaur XP (ilustração 24) é o primeiro instrumento analítico tendo em conta o percurso efetuado pelos soros ao longo da cadeia de transporte. As análises realizadas neste instrumento analítico são do foro imunoquímico, sendo o princípio das determinações deste analisador, caracterizado pela Quimioluminescência direta. Os parâmetros analisados são

maioritariamente hormonas e marcadores tumorais, sendo também analisadas vitaminas, marcadores cardíacos, marcadores séricos de doenças infecciosas, entre outros (tabela 8).

“A Quimioluminescência é uma reação química que emite energia sob a forma de luz e quando utilizada em combinação com imunoensaios, a luz produzida indica a quantidade de analito na amostra. Na Quimioluminescência direta, é medida diretamente a intensidade da energia da luz resultante de reações sem utilização de procedimentos adicionais ou de moléculas amplificadoras” [37].

Nas análises do ADVIA Centaur XP, é utilizada a forma dimetil de Éster de Acridina (EA) como marcador quimioluminescente e não exige a adição de um catalisador ou de um substrato. Tendo em conta o princípio do método usado nos imunoensaios do analisador, é de realçar a presença de partículas paramagnéticas que revestem a área reativa dos tubos onde ocorre a análise. Em relação à pesquisa de antigénios, estas partículas são revestidas por anticorpos ligados covalentemente ao EA, não alterando a sua capacidade de ligação ao antigénio, constituindo a Fase Sólida do imunoensaio. Após incubação com a amostra e na presença de antigénio, este liga-se à Fase Sólida. Seguidamente é aplicado um campo elétrico à cuvete, de modo a fixar o antigénio do analito nas paredes desta, permitindo assim a

lavagem da amostra e dos reagentes não ligados às partículas paramagnéticas. Por fim e apenas na presença do marcador luminescente ligado ao analito alvo, é efetuada a medição da energia sob a forma de luz, pelo que a concentração de analito é diretamente proporcional à energia da luz emitida [37].

De salientar que o sistema ADVIA Centaur XP, utiliza diversos formatos quanto ao princípio da ligação dos anticorpos, nomeadamente o imunoensaio tipo “sanduíche”, imunoensaio competitivo e o formato de captura de anticorpos.

Tabela 8 - Parâmetros analisados no ADVIA Centaur XP

| Parâmetro | Princípio do Ensaio | Utilidade | Amostras |
|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| CEA | Tipo “sanduíche” | Marcadores Tumorais | Soro |
| CA 15-3 | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| CA 19-9 | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| CA 125 | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| cPSA | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| PSA | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| AFP | Tipo “sanduíche” | | Soro ou fluido amniótico |
| T3 | Tipo competitivo | Função da Tiróide | Soro |
| T3 livre | Tipo competitivo | | Soro |
| T4 | Tipo competitivo | | Soro |
| T4 livre | Tipo competitivo | | Soro e plasma |
| TSH | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| Anti-tiroglobulina | Tipo competitivo | | Soro e plasma |
| Anti-TPO | Tipo competitivo | | Soro e plasma |
| PTH | Tipo “sanduíche” | Metabolismo ósseo | Soro e plasma |
| Estradiol | Tipo competitivo | Fertilidade | Soro e plasma |
| FSH | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| LH | Tipo “sanduíche” | | Soro |

| | | | |
|-----------------------|------------------|----------------------------------|---------------|
| Progesterona | Tipo competitivo | | Soro |
| Prolactina | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| Testosterona | Tipo competitivo | | Soro |
| β-hCG total | Tipo “sanduíche” | | Soro |
| BNP | Tipo “sanduíche” | Função cardíaca | Plasma (EDTA) |
| Mioglobina | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |
| cTnl | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |
| Cortisol | Tipo competitivo | Função Suprarrenal | Soro e urina |
| Ferritina | Tipo “sanduíche” | Avaliação de Anemias | Soro e plasma |
| Ácido Fólico | Tipo competitivo | | Soro |
| Vitamina B12 | Tipo competitivo | | Soro |
| Insulina | Tipo “sanduíche” | | Diabetes |
| Rubéola IgM | Tipo “sanduíche” | Marcadores de Doenças Infeciosas | Soro e plasma |
| Rubéola IgG | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |
| <i>Toxoplasma</i> IgM | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |
| <i>Toxoplasma</i> IgG | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |
| Sífilis | Tipo “sanduíche” | | Soro e plasma |

Fonte: Elaborado pelo autor [38,39]

4. ADVIA 1800

O sistema bioquímico ADVIA 1800 (ilustração 25) é um analisador automatizado de química clínica, que pode processar testes de urina, LCR, plasma e soro humano. O Analisador fotométrico realiza medições colorimétricas e imunoturbidimétricas e é também um analisador de eletrólitos, mede as concentrações de sódio, potássio e cloreto nas amostras de soro, plasma ou urina com base num procedimento potenciométrico que utiliza elétrodos ião-seletivos (ISE) [40].



Ilustração 25 - Analisador ADVIA 1800 (<http://www.healthcare.siemens.com/clinica-l-chemistry/systems/advia-1800-chemistry-system>)

Colorimetria, em termos simples, é a medição das cores e é provavelmente o método mais usado para a determinação da concentração de compostos bioquímicos. Este importante procedimento laboratorial baseia-se no princípio de que quando a luz branca passa através de uma solução colorida, alguns comprimentos de onda são mais absorvidos do que outros. Muitos compostos, embora não sejam coloridos, por reação com reagentes adequados, podem absorver a luz no espectro visível. A luz absorvida pelos compostos coloridos depende da intensidade da sua cor e, por sua vez, a intensidade de cor é proporcional à concentração do analito [41].

Em Imunoturbidimetria, o sistema ótico mede a luz transmitida. A quantidade de luz que passa através do imunocomplexo é inversamente proporcional à concentração de antigénio. Para um ótimo desempenho, incluem polietilenoglicol (PEG) na mistura de reação. Este polímero de alto peso molecular sendo altamente higroscópico é utilizado para remover as moléculas de água em torno do anticorpo e antigénio, o que permite a formação de imunocomplexos em poucos minutos [42].

O analisador ADVIA 1800 realiza análises dos seguintes parâmetros (tabela 9):

Tabela 9 - Parâmetros analisados no ADVIA 1800

| Parâmetro | Princípio do Método | Utilidade | Amostras |
|------------------|-----------------------|---|---------------|
| Colesterol Total | Enzimático | Avaliação Cardiovascular Perfil Lipídico | Soro e plasma |
| Colesterol HDL | Eliminação/ Catalase | | Soro e plasma |
| Colesterol LDL | Eliminação/ Catalase | | Soro e plasma |
| Triglicéridos | GPO | | Soro e plasma |
| Amilase | Amilase colorimétrica | Patologia Pancreática | Soro |

| | | | |
|--------------------------------------|--|--|----------------------|
| | bloqueada por anticorpos | | |
| Lipase | Taxa colorimétrica | | Soro e plasma |
| Alanina Aminotransferase | IFCC modificado | Função Hepática | Soro e plasma |
| Aspartato Aminotransferase | IFCC modificado | Função Hepática e Cardíaca | Soro e plasma |
| Gama-Glutamil Transferase | IFCC modificado | Função Hepática | Soro e plasma |
| Fosfatase Alcalina | IFCC modificado | Função Hepática Metabolismo Ósseo | Soro e plasma |
| Bilirrubina Directa | Oxidação com vanadato | Função Hepática | Soro e plasma |
| Bilirrubina Total | Oxidação com vanadato | | Soro e plasma |
| Proteínas Totais | Biureto | Função Hepática e Renal Perturbações Metabólicas e Nutricionais | Soro e plasma |
| Proteínas Totais | Ligação de corantes | | Urina e LCR |
| Albumina | Ligação a corantes BCG | | Soro e plasma |
| Transferrina | Imunoturbidimetria intensificada por PEG | Avaliação de Anemia | Soro e plasma |
| Ferro | Ferrozina | | Soro e plasma |
| Capacidade total de ligação de ferro | Libertação e fixação sequencial do ferro | | Soro |
| Proteína C-reativa | Imunoturbidimetria intensificada por látex | Processo Inflamatório Agudo | Soro e plasma |
| Creatinina | Enzimático/ Creatinina Deiminase/ GLDH | Função Renal | Soro e plasma |
| Ureia | Urease com GLDH | | Soro, plasma e urina |
| Microalbumina | Imunoturbidimetria intensificada com PEG | | Urina |
| Ácido Úrico | Uricase/ Peroxidase | Função Renal Gota | Soro, plasma e urina |
| Lactato Desidrogenase | Lactato/ NAD | Enzima inespecífica (hepática, músculo cardíaco, sistema | Soro e plasma |

| | | | |
|--------------------|---|---|---------------------------|
| | | músculoesquelético) Doenças Hemato-oncológicas | |
| Glucose | Hexoquinase | Diabetes Defeitos Congênitos Enzimáticos | Soro, plasma, urina e LCR |
| Cálcio | Arsenazo III | Paratiróide Metabolismo Ósseo Doença Renal Crônica Tetania | Soro, plasma e urina |
| Cloreto | Eléctrodo seletivo iões (ISE) diluído | Função Hidroeletrólítica Função Renal | Soro, plasma e urina |
| Sódio | ISE, diluído | | Soro, plasma e urina |
| Potássio | ISE, diluído | | Soro, plasma e urina |
| Fósforo inorgânico | Fosfomolibdato/ UV | Metabolismo Ósseo Insuficiência Renal Aporte nutricional | Soro, plasma e urina |
| Magnésio | Azul de Xilidil | | Soro, plasma e urina |
| Colinesterase | Butiriltiocolina/ 5-tio-2-nitrobenzoato | Diagnóstico de Intoxicações por Organofosforados | Soro e plasma |
| Carbamazepina | Técnica de imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT) | Monitorização Terapêutica | Soro e plasma |
| Digoxina | Imunoturbidimetria intensificada por látex | | Soro e plasma |
| Gentamicina | EMIT | | Soro e plasma |
| Lítio | Colorimétrico | | Soro e plasma |
| Fenobarbital | EMIT | | Soro e plasma |
| Vancomicina | EMIT | | Soro e plasma |
| Ácido Valpróico | Imunoturbidimetria intensificada por látex | | Soro e plasma |
| Etanol | Enzimático | Toxicologia | Soro, plasma e urina |
| Acetaminofeno | Enzimático | | Soro e plasma |

Fonte: Elaborado pelo autor [38,39]

5. Rapidlab I265

As “Gasimetrias arteriais com Co-oximetria”, são efetuadas no analisador RapidLab I265 (ilustração 26), sendo estas amostras, (sangue arterial em seringas heparinizadas), consideradas de maior urgência, quer pela rapidez da sua execução quer pela informação clínica útil, que pode dar ao clínico em situações de urgência e não só.



Ilustração 26 - Analisador Rapidlab I265
(<http://www.healthcare.siemens.com/point-of-care/blood-gas/rapidlab-i200-systems>)

Este analisador, na realização das Gasimetrias arteriais com Co-oximetria, utiliza tecnologia de medição que se baseia na física eletroquímica, bioquímica e ótica. A eletroquímica consiste na medição da corrente numa célula eletroquímica. A célula é composta por 2 elétrodos (um elétrodo de medição e um elétrodo de referência) que interagem com uma substância química na solução e que estão ligados a um sistema elétrico. Os elétrodos utilizados são designados por sensores que são responsáveis pela medição direta de uma substância específica presente na amostra, dado que apresentam uma membrana que é seletiva para um ião específico, o que confere a diferentes sensores a capacidade de medir diferentes analitos na mesma solução. Seguidamente, um mecanismo transdutor converte o potencial gerado num sinal elétrico, utilizando potenciometria ou amperometria [43].

O sistema Rapidlab I265 analisa amostras sanguíneas quanto ao equilíbrio ácido-base, nomeadamente, o pH, pressão de oxigénio (pO_2) e pressão de dióxido de carbono (pCO_2). A análise ao pH é determinada através da atividade dos iões de hidrogénio, detetados pelo “sensor de pH” que tem como base um elétrodo seletivo de iões [43].

Relativamente à pCO_2 , e tal como para o hidrogénio, é utilizado um sensor específico, composto por um elétrodo com uma membrana permeável ao CO_2 gasoso, que, com a sua difusão leva a uma alteração na atividade dos iões de hidrogénio que gera um potencial detetável e mensurável pelo elétrodo de referência. Dado que o CO_2 é também transportado no sangue sob a forma de bicarbonato e ácido carbónico, a análise a estes parâmetros também é efetuada com recurso à metodologia descrita anteriormente, a fim de interpretar o equilíbrio ácido-base do sangue. Por fim, a pO_2 , é analisada através de um sensor que consiste numa célula eletroquímica que se baseia na tecnologia amperométrica, composta por um cátodo, um ânodo, uma solução eletrolítica e uma membrana permeável

ao O_2 , que à medida que o oxigénio da amostra é reduzido no cátodo, é gerada uma corrente que permite determinar a quantidade de oxigénio na solução [43].

O analisador Rapidlab 1265 também determina a presença dos seguintes eletrólitos: sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) e ainda dá-nos a indicação do Anion Gap e do valor do cálcio ajustado para o pH de 7,40. Os sensores utilizados para os eletrólitos, baseiam-se na tecnologia do eletrodo seletivo de iões, e consequentemente cada sensor possui uma membrana que é altamente seletiva para um ião específico [43].

Além do pH, gases sanguíneos e eletrólitos, o sistema permite também determinar a concentração de glucose e de lactato, sendo que os biossensores respetivos são células eletroquímicas completas que incorporam a tecnologia amperométrica, constituídos por 4 eletrodos. Como resultado, durante a análise, o analito específico vai gerar um fluxo de eletrões (fluxo de corrente) mensurável e que é proporcional à sua concentração na amostra [43].

Por fim, o analisador Rapidlab 1265 avalia também a concentração de hemoglobina e seus derivados, visto ser importante para a avaliação do sistema de transporte de oxigénio, pelo que a necessidade desta análise levou ao desenvolvimento de métodos para a determinação da concentração de hemoglobina total, derivados de hemoglobina e hemoglobinas disfuncionais (ambas doseadas pelo analisador Rapidlab 1265), dado que estas possuem menor capacidade de se ligar ao oxigénio e consequentemente de o transportar. É de realçar que estes doseamentos denominam-se Co-oximetria, completando assim o leque de análises efetuadas pelo Rapidlab 1265 [43].

6. Immulite 2000

O Analisador automático de Imunoensaio IMMULITE 2000 (ilustração 27) é um instrumento que também efetua imunoensaios de quimioluminescência.

A tecnologia de quimioluminescência utilizada no IMMULITE 2000 recorre á fosfatase alcalina como catalisador enzimático e ao dioxetano como substrato. A fosfatase alcalina catalisa a reação de degradação do substrato num produto fluorescente. A luz é emitida quando o substrato de quimioluminescência reage com a camada de fosfatase alcalina ligada à esfera revestida. A quantidade de luz emitida é proporcional (no caso de um ensaio tipo



Ilustração 27 - Analisador Immulite 2000
(<http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-2000-immunoassay-system>)

“sanduíche”) ou inversamente proporcional (no caso de um ensaio competitivo) à quantidade de analito inicialmente contida na amostra. A emissão de luz é detetada pelo tubo fotomultiplicador (PMT) onde a luz gerada pela reação luminogénica é medida e os resultados são calculados para cada amostra [44].

O analisador Immulite 2000 está preparado para realizar as determinações necessárias ao Rastreio Pré-natal (β -hCG livre, PAPP-A, β -hCG total, Estriol e AFP) e mais alguns parâmetros, entre os quais: Péptideo C, Gastrina, ACTH, Tiroglobulina e Citomegalovirus IgM e IgG.

7. Rastreio Pré-Natal

O Rastreio Pré-Natal (RPN) permite determinar o Risco Fetal, para uma determinada alteração cromossómica e/ou defeito do tubo neural (DNT), auxiliando a tomada de decisões relativamente ao futuro de uma gestação [45].

Atualmente, são vários os métodos de RPN que empregando marcadores bioquímicos e/ou ecográficos, permitem identificar, de modo não invasivo, as gestações de fetos com risco aumentado de trissomia 21 (Síndrome de Down), trissomia 18 (Síndrome de Edwards), trissomia 13 (Síndrome de Patau) e DTN. A escolha do método de RPN será influenciada pelo tempo de gestação, altura em que se pretendem os resultados e pela preferência do médico [45].

O RPN não é um exame de diagnóstico, indica apenas um valor estatístico do risco do recém-nascido apresentar alguma cromossomopatia ou malformação. Perante a determinação de um risco elevado, a utilização de outros métodos de diagnóstico deve ser considerada, tais como a ecografia detalhada ou um exame de Diagnóstico Pré-Natal (DPN) [45].

No Serviço de Patologia Clínica do CHBV realizam-se o Rastreio Combinado de 1º Trimestre (entre as 8 e as 13 semanas + 6 dias) e o Rastreio de 2º Trimestre (entre a 14ª e 22ª semanas) (tabela 10).

Tabela 10 - Tipos de Rastreios realizados no Serviço de Patologia Clínica

| | |
|---------------------------------------|---|
| Rastreio Combinado | <ul style="list-style-type: none">• Idade materna, marcadores ecográficos (TN entre outros) e marcadores bioquímicos (β-hCG livre e PAPP-A) |
| Rastreio 2º Trimestre (Triplo) | <ul style="list-style-type: none">• Idade materna e marcadores bioquímicos (β-hCG total, uE3 e AFP) |

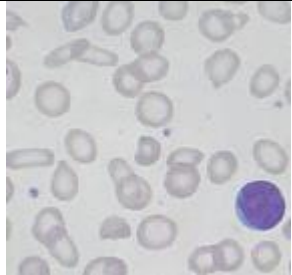
Fonte: Elaborado pelo autor [45]

O risco é calculado separadamente para cada uma das condições (trissomia 21, trissomia 18, DTN), com recurso a um software, o PRISCA. No *software* introduzem-se dados como a idade materna, a idade gestacional, os dados da ecografia, os níveis de marcadores bioquímicos maternos e fatores que possam afetar o resultado do risco (ex: peso, etnia, cromossomopatia em gravidez anterior, tabagismo, diabetes mellitus insulino-dependente, FIV).

Perante um resultado positivo, a grávida é encaminhada para a consulta de DPN, onde é feita a avaliação desse resultado, o significado dos riscos genéticos fetais, são apresentadas opções em termos de exame de DPN, bem como os riscos inerentes a cada procedimento invasivo.

VIII. Casos Clínicos

A. Caso I – Criança, 4 anos

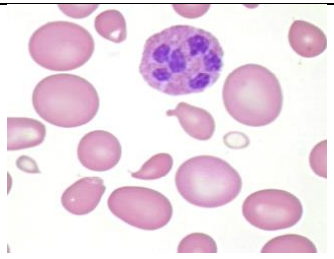
| | | |
|--|---|-------------|
| Hemograma | | |
| Eritrócitos | $5,12 \times 10^{12}/L$ | 4.10 – 5.50 |
| Hemoglobina | 7.3 g/dL | 10.5 – 13.5 |
| Hematócrito | 25.5 % | 37.0 – 45.0 |
| V.G.M. | 50.0 fL | 73.0 – 86.0 |
| H.G.M. | 14.3 pg | 24.0 – 30.0 |
| C.H.C.M. | 28.7 g/dL | 32.0 – 36.0 |
| RDW | 27.1 % | 11.0 – 15.8 |
|  | Microcitose. Anisocitose. Poiquilocitose com GV em charuto. Hipocromia muito marcada. | |

Após a análise dos valores do hemograma e da visualização do esfregaço suspeita-se que se trata de uma Anemia Ferropénica. São realizadas as determinações de Ferro, Ferritina, Transferrina e Saturação de Transferrina.

| | | |
|---------------------------|------------|---------------|
| Ferro | 11.0 µg/dL | 50.0 – 170.0 |
| Ferritina | <1 ng/mL | 20.0 – 291.0 |
| Transferrina | 360 mg/dL | 200.0 – 360.0 |
| Saturação de transferrina | 2.78% | 20.0 – 55.0 |


Diagnóstico: Anemia Ferropénica – Relativamente ao hemograma, pode-se dizer que se trata de uma anemia (Hb 7.3 g/dL) microcítica (↓VGM) hipocrômica (↓ HGM) com um RDW aumentado, o que é característico da Anemia Ferropénica. Quanto ao esfregaço, este apresenta microcitose, anisocitose e uma hipocromia muito marcada. A presença de glóbulos vermelhos em forma charuto também é típica desta situação. A confirmação do diagnóstico é obtida através do doseamento de parâmetros ligados ao metabolismo férrico. O ferro e a ferritina estão bastante diminuídos, tal como a saturação de transferrina.

B. Caso 2 – Homem, 80 anos

| | | |
|--|---|--------------|
| Hemograma | | |
| Eritrócitos | $0.9 \times 10^{12}/L$ | 4.50 – 6.50 |
| Hemoglobina | 4.2 g/dL | 13.0 – 18.0 |
| Hematócrito | 12.5 % | 41.0 – 55.0 |
| V.G.M. | 138.0 fL | 76.0 – 96.0 |
| H.G.M. | 46.1 pg | 27.0 – 32.0 |
| C.H.C.M. | 33.4 g/dL | 32.0 – 36.0 |
| RDW | 15.1 % | 11.0 – 15.8 |
| Leucócitos | 2.50×10^9 | 4.10 – 11.10 |
| Plaquetas | 63×10^9 | 150 – 500 |
|  | Macrocitose. Macrócitos ovais. Anisocitose. Poiquilocitose marcada com numerosos dacriócitos e alguns esquizócitos. Neutrófilos hipersegmentados. | |
| LDH | 1910 U/L | 120 – 246 |
| Haptoglobina | >6.62 mg/dL | 30.0 – 200 |
| Bilirrubina total | 1.70 mg/dL | >1.10 |
| Vitamina B12 | 76 ng/mL | 210 – 910 |
| Ácido Fólico | 7.69 ng/mL | >5.38 |

Diagnóstico: Anemia Megaloblástica – Relativamente ao hemograma, este revela a existência de pancitopenia com anemia macrocítica grave (\uparrow VGM e Hb 4,2 g/dL). O esfregaço confirmou a presença de macrócitos e demonstrou também a presença de neutrófilos hipersegmentados, muito característicos da Anemia Megaloblástica. O aumento de LDH e bilirrubina total juntamente com a diminuição da haptoglobina funcionam como marcadores de uma eritropoiese ineficaz. A confirmação do diagnóstico prende-se no doseamento de ácido fólico e vitamina B12. Neste caso, há uma diminuição de vitamina B12, sendo esta a causa da Anemia Megaloblástica.

C. Caso 3 – Homem, 56 anos

| | | |
|---------------------|-------------------------|---|
| Hemograma | | |
| Eritrócitos | $3.82 \times 10^{12}/L$ | 4.50 – 6.50 |
| Hemoglobina | 12.1 g/dL | 13.0 – 18.0 |
| Hematócrito | 36.9 % | 41.0 – 55.0 |
| Leucócitos | $2.60 \times 10^9/L$ | 4.10 – 11.10 |
| Plaquetas | $19 \times 10^9/L$ | 150 - 500 |
| Pesquisa Plasmodium | Positivo |  |
| AST | 52 U/L | <34 |
| ALT | 32 U/L | 10 – 49 |
| LDH | 389 U/L | 120 - 246 |
| Bilirrubina total | 1.50 mg/dL | <1.10 |

Diagnóstico: Malária – a confirmação do diagnóstico de malária tem por base a análise microscópica do esfregaço sanguíneo. Neste caso foram visualizados trofozoítos de *Plasmodium sp.* No Serviço de Patologia Clínica o resultado da Pesquisa de *Plasmodium* é dado como positivo ou negativo, não se determina o grau de parasitemia nem a espécie de *Plasmodium sp.* O hemograma realizado indicou a existência de uma ligeira anemia (Hb 12,1 g/dL), leucopenia ($2.60 \times 10^9/L$) e uma severa trombocitopenia ($19 \times 10^9/L$).

A Hemólise provocada pelos parasitas é responsável pela anemia, pelo aumento da LDH e também da bilirrubina total (↑ bilirrubina indireta). O ligeiro aumento da AST ocorre devido ao facto de os parasitas lesarem e destruírem os hepatócitos, durante o seu ciclo de vida. A Leucopenia e a trombocitopenia também são consideradas achados hematológicos comuns no caso de Malária.

D. Caso 4 – Mulher, 66 anos

| | | | |
|---------------|-----------|---------------------------|-------------|
| Hemograma | | | |
| Eritrócitos | | 2.78 x10 ¹² /L | 3.90 – 5.90 |
| Hemoglobina | | 7.6 g/dL | 11.5 – 16.5 |
| Hematócrito | | 23.2 % | 37.0 – 47.0 |
| V.G.M. | | 83.0 fL | 76.0 – 96.0 |
| H.G.M. | | 27.4 pg | 27.0 – 32.0 |
| C.H.C.M. | | 32.9 g/dL | 32.0 – 36.0 |
| Reticulócitos | | 1.00 % | 0.50 – 2.00 |
| LDH | | 1039 U/L | 120 - 246 |
| Haptoglobina | | <6.62 mg/dL | 30 - 200 |
| Bilirrubina | total | 6.70 mg/dL | <1.10 |
| | directa | 2.90 mg/dL | < 0.26 |
| | indirecta | 3.80 mg/dL | 0.10 – 1.00 |

Diagnóstico: Anemia Hemolítica – O hemograma demonstra que se trata de uma anemia (Hb 7.6 g/dL) normocítica (VGM 83 fL) normocrômica (HGM 27.4 pg), o que é comum nas Anemias Hemolíticas. Contudo, os parâmetros que sustentam o diagnóstico são a Haptoglobina e a Bilirrubina (principalmente a indireta). A hemoglobina libertada dos GV lisados forma um complexo com a Haptoglobina que se traduz na diminuição da Haptoglobina sérica (<6.62 mg/dL). A hemoglobina ao ser catabolizada também provoca um aumento de bilirrubina, em especial, da bilirrubina indireta (ligada à albumina). Relativamente ao aumento dos níveis de LDH (1039 U/L), é explicado pela ocorrência de hemólise e pelo fato da LDH ser uma enzima que se encontra no interior dos GV.

E. Caso 5 – Mulher, 85 anos

| | | |
|-------------|---------------------------|-------------|
| Hemograma | | |
| Eritrócitos | 3.23 x10 ¹² /L | 3.90 – 5.90 |
| Hemoglobina | 10.0 g/dL | 11.5 – 16.5 |
| Hematócrito | 30.8 % | 37.0 – 47.0 |
| V.G.M. | 95.0 fL | 76.0 – 96.0 |
| H.G.M. | 30.9 pg | 27.0 – 32.0 |
| C.H.C.M. | 32.3 g/dL | 32.0 – 36.0 |
| Ureia | 144.2 mg/dL | 10.0 – 50.0 |
| Creatinina | 2.63 mg/dL | 0.60 – 1.10 |

Diagnóstico: IRC + Anemia - O hemograma revela uma anemia normocítica normocrômica. A doente também apresenta a função renal afetada, como podemos verificar pelos valores de Ureia (144.2 mg/dL) e Creatinina (2.63 mg/dL). Uma possível causa da Anemia será o déficit de produção de Eritropoetina (EPO), uma hormona responsável pela estimulação e regulação da Eritropoese e que é produzida a nível renal.

F. Caso 6 – Mulher, 82 anos

| | | |
|-------------|------------|-------------|
| CPK | 2154 U/L | 33 - 211 |
| Mioglobina | 4306 ng/mL | 3.90 – 5.90 |
| Troponina I | 5.29 ng/mL | <0.04 |

Diagnóstico: Enfarte Agudo do Miocárdio – Após os sintomas e suspeitas de enfarte agudo do miocárdio (EAM) realizaram-se as determinações dos marcadores cardíacos à doente. A mioglobina é uma proteína do músculo-esquelético e cardíaco, não tendo especificidade cardíaca, mas apesar da sua inespecificidade, após a necrose do miocárdio a proteína pode ser detetada em apenas 2 horas, o que se torna útil num diagnóstico precoce. A Troponina I é uma proteína que tem uma isoforma cardioespecífica, sendo desta forma um dos melhores marcadores de EAM (juntamente com a Troponina T). Uma desvantagem da Troponina I é a sua pouca sensibilidade nas primeiras 6 horas. A CPK é uma proteína com uma distribuição muito mais ampla, mas que juntamente com os outros 2 parâmetros reforça a ideia de lesão muscular. Os valores elevadíssimos de Mioglobina, Troponina I e CPK indicam que houve lesão do miocárdio.

G. Caso 7 – Mulher, 42 anos

| | | |
|------------------------|------------|-------------|
| T3 livre | 2.3 pg/mL | 2.3 – 4.2 |
| T4 livre | 0.56 ng/dL | 0.80 – 1.80 |
| TSH | 28.40 mU/L | 0.35 – 5.50 |
| Ac. Anti Tiroglobulina | 47 U/mL | <60 |
| Ac. Anti Peroxidase | >1300 U/mL | <60 |

Diagnóstico: Hipotireoidismo – A explicação para o aumento da TSH (28,40 mU/L) e a diminuição da T4 livre (0.56 ng/dL) é a deficiente produção de hormonas pela tiroide (↓T4 e T3), o que resulta no aumento da estimulação da tiroide pela hipófise (↑TSH). O valor de Ac. Anti Peroxidase (> 1300 U/mL) aponta para um caso de Hipotireoidismo autoimune, podendo tratar-se de uma Tireoidite de Hashimoto.

H. Caso 8 – Homem, 84 anos

| | <u>03-2015</u> | <u>01-2015</u> | <u>10-2014</u> | |
|------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| Glicose | 174 mg/dL | 197 mg/dL | 126 mg/dL | 74 -106 |
| Hb A1c | 9.20 % | | 8.60 % | 4.00 – 6.00 |
| Ureia | 59.9 mg/dL | 77.2 mg/dL | 69.2 mg/dL | 10.0 – 50.0 |
| Creatinina | 1.62 mg/dL | 2.00 mg/dL | 1.90 mg/dL | 0.60 – 1.30 |

Diagnóstico: Diabetes Mellitus + Nefropatia diabética – o valor de glicose (174 mg/dL) aponta para um caso de diabetes mellitus (Glicemia de jejum \geq 126 mg/dl), mas como podemos verificar, nas análises anteriores, já se trata de um caso conhecido. O doseamento da hemoglobina A1c assume particular interesse no diagnóstico e classificação de diabetes mellitus, bem como, na monitorização do índice de glicose em indivíduos já diagnosticados. Neste caso, o valor de Hb A1c (9.20 %) traduz que, nos 2 a 3 meses anteriores à análise, o doente apresentou hiperglicemia e que a terapêutica diabética, ou se está a revelar ineficaz ou o doente não a está a cumprir devidamente. Uma complicação frequente da hiperglicemia persistente é a Nefropatia diabética, os elevados níveis de glicose causam lesão a nível renal. Os valores de Ureia (59.9 mg/dL) e creatinina (1.62 mg/dL) comprovam a lesão renal e como já são valores recorrentes permitem-nos suspeitar que se trate de IRC.

I. Caso 9 – Homem, 83 anos

| | | | |
|---|----------|-------------|-------------|
| ALT | | 404 U/L | 10-49 |
| Bilirrubina | Total | 13.30 mg/dL | <1.10 |
| | Direta | 11.20 mg/dL | <0.26 |
| | Indireta | 2.10 mg/dL | 0.10 – 1.00 |
| ALP | | 550 U/L | 45 – 129 |
| Gama-GT | | 935 U/L | <73 |
| Exame sumário de urina - Pigmentos biliares | | | +3 |

Diagnóstico: Colestase extra-hepática – Analisando os valores dos parâmetros realizados é possível suspeitar que se trata de uma colestase. O valor das bilirrubinas é característico de uma colestase, um grande aumento de bilirrubina total e direta (13.30 mg/dL e 11.20 mg/dL) e um ligeiro aumento da bilirrubina indireta (2.10 mg/dL). O valor das enzimas ALP e Gama-GT também indicam a existência de lesão biliar. Os elevados valores das Bilirrubinas (total e conjugada), da Gama-GT e ALP sugerem que se trata de uma Colestase extra-hepática. Em relação aos pigmentos biliares, eles aparecem na urina devido à elevada concentração de bilirrubina direta no soro, em situações normais isto não ocorre.

J. Caso 10 – Homem, 77 anos, dor epigástrica

| | | |
|---------------------|-------------|----------|
| CPK | 90 U/L | 32 – 294 |
| Troponina I | 0.01 ng/mL | <0.04 |
| Mioglobina | 104.2 ng/mL | <110.0 |
| Amilase | 1415 U/L | 25 – 115 |
| Lipase | 2936 U/L | 12 - 53 |
| Gama-GT | 332 U/L | <73 |
| ALP | 147 U/L | 45 – 129 |
| Bilirrubina directa | 0.40 mg/dL | <0.26 |
| ALT | 300 U/L | 10-49 |
| AST | 290 U/L | <34 |

Diagnóstico: Pancreatite Aguda – Para exclusão de uma possível lesão cardíaca foram requisitados marcadores cardíacos (CPK, Troponina I e Mioglobina). Uma vez que, todos os marcadores se encontravam dentro dos valores de referência excluiu-se essa hipótese. A outra suspeita recaiu numa pancreatite, o que acabou por se comprovar com os valores

elevados de Amilase (1415 U/L) e Lipase (2936 U/L). Podemos suspeitar que a causa da pancreatite aguda seja litíase biliar. Para além de ser uma das causas mais comuns, os valores dos restantes parâmetros são concordantes com a hipótese. O aumento de bilirrubina direta, da Gama-GT e da ALP indicam que há colestase, enquanto a AST e ALT mostram a existência de envolvimento hepático.

8. Caso II – Monitorização de fármacos – Homem, 37 anos, Epilepsia

| | 05-2015 | 02-2015 | 11-2014 | |
|-----------------|------------|------------|-------------|---|
| Acido Valpróico | 41.5 µg/mL | 79.4 µg/mL | 104.9 µg/mL | V. terapêuticos 50 – 100 V. tóxicos >100 |
| Fenobarbital | 23 µg/mL | 17 µg/mL | 27 µg/mL | V. terapêuticos 15-40 V. tóxicos >50 |

Justifica-se a Monitorização de fármacos a fármacos com margem terapêutica estreita e com elevada variabilidade farmacocinética.

Neste caso em concreto, um doente com epilepsia está a ser medicado com Ácido Valpróico e Fenobarbital (ambos antiepiléticos e anticonvulsivantes) e periodicamente é realizada a sua monitorização. Em relação ao fármaco fenobarbital verifica-se que ao longo de meio ano a sua concentração sérica tem estado dentro dos valores terapêuticos. Relativamente ao Ácido Valpróico observa-se que em 11-2014 estava com uma concentração superior aos valores terapêuticos, o médico responsável pelo doente, perante o valor obtido, diminuiu a dose do medicamento de modo a evitar efeitos tóxicos. O valor de 02-2015 reflete a diminuição da dose, porque a concentração do fármaco na corrente sanguínea diminuiu e já se encontra dentro dos valores terapêuticos. Na última determinação efetuada (05-2015), voltou-se a verificar que a concentração do fármaco se encontra fora dos valores terapêuticos, desta vez, está abaixo do ideal, o que pressupõe uma diminuição da eficácia do fármaco. Perante este último valor de concentração sérica de Ácido Valpróico o médico responsável terá, novamente, de aumentar a dose ao doente.

9. Caso 12 – Rastreo Pré-Natal 1º Trimestre (Combinado)

Idade: 30 anos

Idade gestacional: 12 semanas

| | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------|
| Fatores de Correção | Fetos | 1 |
| | Peso | 52 |
| | Fumadora | Não |
| | Diabetes | Não |
| | Etnia | Caucasiana |
| | FIV | Não |
| | Gravidezes anteriores com T21 | Não |
| Dados Bioquímicos | PAPP-A | 0.997 mIU/mL |
| | B-hCG livre | 136 ng/mL |
| Dados Ecográficos | CRL | 60.6 mm |
| | Ossó Nasal | Presente |
| | Translucência da nuca (TN) | 0.71 MoM |

Resultados:

| | |
|------------------------------|----------|
| Risco pela idade | 1:648 |
| Risco Bioquímico da T21 | >1:50 |
| Risco Combinado da T21 | 1:60 |
| Risco Combinado da T13 e T18 | <1:10000 |

Com base nos resultados obtidos, no rastreo combinado para T21, é de esperar que em 60 mulheres com idênticos dados, haja uma gravidez com T21 e as restantes 59 sem alterações. Neste contexto, o risco calculado não tem valor de diagnóstico e perante o elevado risco de T21, a grávida foi encaminhada para a consulta de DPN.

IX. Controlo de Qualidade Interno e Manutenção

O controlo de qualidade interno consiste na análise diária de uma amostra controlo, cujos valores analíticos são conhecidos, que permite avaliar a precisão, variabilidade e reprodutibilidade dos métodos utilizados. A aceitação dos controlos é baseada na interpretação das cartas controlo e quando um resultado se encontra fora do estipulado (no caso do Sector de Química Clínica e Imunoquímica são utilizadas a regras de Westgard), procede-se à ação corretiva, como por exemplo uma calibração. A execução periódica da manutenção e calibração dos equipamentos permite que os aparelhos estejam sempre em boas condições de funcionamento.

Desta forma, o laboratório garante que os resultados obtidos possam ser utilizados com confiança no diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica.

Tabela II - Controlo de qualidade interno e Manutenção relativa ao Sector de Hematologia

| Sector de Hematologia | | |
|------------------------------|---|---|
| Equipamento | Controlo Qualidade Interno | Manutenção |
| ABX Pentra DX Nexus | - Hemograma – 3 níveis (baixo, normal e alto) – diariamente no início do dia; - Reticulócitos – 3 níveis – diariamente no início do dia (apenas num aparelho); | - Manutenção diária; - Manutenção semanal; - Calibração é executada pela casa comercial; |
| D-10 | Antes da análise das amostras - Modo A1c – 2 níveis (baixo e alto); - Modo A2 e F – 2 níveis | - Descontaminação na mudança de <i>kit</i> de reagentes; - Calibração é realizada na mudança de <i>kit</i> de reagentes ou na evidência de erros no controlo interno |
| BCS | - TP, INR, APTT, Fibrinogénio derivado, Fibrinogénio de Clauss e D-dímeros – 2 níveis (normal e patológico) – diariamente no início do dia; - Proteína C, Proteína S e ATIII – 2 níveis – geralmente à quarta-feira antes da análise das amostras; | - Manutenção diária; - Manutenção semanal - Calibração é realizada quando se utiliza um novo lote de reagente ou na evidência de erros no controlo interno; |

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12 - Controlo de qualidade interno e Manutenção relativa ao Sector de Química Clínica e Imunoquímica

| Sector de Química Clínica e Imunoquímica | | |
|--|---|---|
| Equipamento | Controlo Qualidade Interno | Manutenção |
| ADVIA Labcell | | - Manutenção semanal; |
| ADVIA Centaur | Diariamente no início do dia - <i>Liquichek Cardiac Markers Plus Control</i> – 3níveis - <i>Liquichek Tumor Marker Control</i> – 3 níveis - <i>Liquichek immunoassay Plus Control</i> – 3 níveis | - Calibração é realizada na mudança de lote de reagentes ou na evidência de erros no controlo interno; - Manutenção diária; - Manutenção semanal; - Manutenção mensal; |
| ADVIA I800 | Diariamente no início do dia - <i>QC Ethanol</i> – 2 níveis - <i>QC Immunology</i> – 2 níveis - <i>QC IA</i> – 3 níveis - <i>QC Multiqual</i> – 2 níveis - <i>QC Urine Chem</i> – 2 níveis | Calibração é realizada na mudança de lote de reagentes ou na evidência de erros no controlo interno; - Manutenção diária; - Manutenção semanal; - Manutenção mensal; |
| RapidLab I265 | O sistema tem incorporado um cartucho de QC e analisa automaticamente os controlos. | - Calibrações e lavagens automáticas realizadas de forma pré-definida; - Manutenção diária; - Manutenção semanal; |
| IMMULITE 2000 | Antes da análise das amostras - Controlo específico para cada parâmetro - 1 nível | Calibração é realizada na mudança de lote de reagentes ou na evidência de erros no controlo interno; - Manutenção diária; - Manutenção semanal; |

Fonte: Elaborado pelo autor

X. Controlo de Qualidade Externo

Por fim, resta-me mencionar que, além do controlo de qualidade interno (controlo diário), existe também o externo, que consiste numa entidade externa, devidamente credenciada, que envia ao laboratório uma amostra para ser analisada a determinados parâmetros (bioquímicos, imunológicos, hematológicos, entre outros), cujas concentrações já são conhecidas, no entanto, para o laboratório são uma incógnita. Seguidamente, o laboratório, tratando-a da mesma forma que trata as outras amostras, analisa-a e envia os resultados à entidade externa, que compara os valores de referência com os resultados da análise e conclui relativamente à qualidade desta, emitindo de seguida um relatório ao laboratório a cerca da qualidade das suas determinações e da avaliação efetuada. É de salientar que o laboratório participa nos seguintes programas de Controlo de Qualidade Externo (tabela 13).

Tabela 13 - Participação do laboratório nos Programas de Avaliação Externa da Qualidade

| | | |
|--------------------------------|-------|---|
| Hematologia | RIQAS | - Mensal – (Hemograma, Coagulação e A1c) |
| | PNAEQ | - 2 x ano – 4 níveis – Reticulócitos (contagem automática) - 4 x ano – 2 níveis – Contagem celular - 6 x ano – 2 níveis - Coagulação |
| Química Clínica e Imunoquímica | RIQAS | - Mensal (Química clínica, Imunológico, Cardíaco e Gasimetria) |
| Rastreio Pré-natal | NEQAS | - Mensal - 3 amostras – 1º trimestre (PAPP-A e β -hCG livre) - Mensal – 3 amostras – 2º trimestre DTN (AFP) - Mensal – 3 amostras – 2º trimestre T21 (AFP, β -hCG total, uE3) |

Fonte: Elaborado pelo autor, *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), *National External Quality Assessment Service* (NEQAS)

XI. Conclusão

Além de ter contactado e aprendido a trabalhar com os diferentes analisadores, realço, ainda, o facto de ter compreendido a dinâmica dos produtos biológicos que entram na zona de triagem e, sobretudo, a dinâmica do próprio laboratório. No entanto, considero, ainda, de enorme importância ter conhecido e compreendido as análises efetuadas e, acima de tudo, o funcionamento dos analisadores e os respetivos princípios das determinações, já que este é um passo fulcral para conseguir detetar erros de análise e permitir um estável funcionamento dos analisadores. Contudo, num Laboratório de Patologia Clínica é ainda indispensável uma correta preparação das amostras e uma boa manutenção dos analisadores, a fim de garantir, a obtenção de resultados verdadeiros para as análises pedidas pelo clínico, pelo que a resposta e decisão deste, está muitas vezes na base do trabalho desenvolvido pelos Técnicos Superiores de Saúde.

Tal como salientado no corrente relatório, posso destacar que aprendi a realizar calibrações e controlos de qualidade, e sobretudo assimilei a importância que estes dois parâmetros têm na determinação de análises válidas para qualquer tipo de parâmetro, seja em que área for.

Relativamente à validação de resultados, apesar de não ser uma função do estagiário, em determinadas situações fui acompanhando e percebendo quando é que se podia aceitar ou não, determinados resultados analíticos, o que foi extremamente interessante, pois pude exprimir conhecimentos prévios, adquiridos do percurso académico.

Após finalização do estágio, a sensação de realização está presente, na medida em que, contactei com uma grande variedade de produtos biológicos e por ter vivido o ambiente de trabalho de um Técnico Superior de Saúde. Por tudo o que foi dito nas linhas anteriores, agradeço ao orientador de estágio, bem como a todo o pessoal do serviço, toda a disponibilidade para a minha integração e para a transmissão de conhecimentos, a fim de tornar lucrativo para todos, o curto período de tempo em que convivi com todo o pessoal do laboratório. Penso que desta forma, posso dar como cumprido o objetivo do desenvolvimento de relações interpessoais, como a comunicação e o trabalho de equipa, bem como a iniciativa e o espírito crítico.

Neste estágio, de certa forma, apercebi-me, também, do quão é importante uma boa gestão laboratorial, nomeadamente, a nível financeiro e não só, como é o caso da organização de *stocks* de reagentes e dos consumíveis utilizados nos diferentes analisadores.

Em relação à expectativa centrada, na adequabilidade da formação académica adquirida, para a realização de um bom desempenho ao longo do estágio, penso que foi mais um objetivo cumprido, pois auto-refletindo, posso destacar que muitos conceitos teóricos anteriores foram aplicados na rotina diária, quer ao nível dos parâmetros analisados e princípio das suas determinações, quer ao nível da aprendizagem na validação dos resultados analíticos. Assim, após este estágio, compreendo a importância das cadeiras que integram o meu plano de curso.

Concluindo, resta destacar a enorme oportunidade que me foi dada pelo orientador de estágio, nomeadamente, ao nível da autonomia adquirida no laboratório em todas as áreas que passei. É ainda de salientar, a tecnologia de topo que faz do laboratório um *Core Lab*, pelo que, o contacto com este tipo de tecnologia, permite-me num futuro próximo, uma melhor integração num laboratório do mesmo género. Assim, considero-me um privilegiado por ter realizado o estágio no laboratório do Serviço de Patologia Clínica do CHBV.

Bibliografia

- 1- GUIMARÃES, A. C. et al. - **O laboratório clínico e os erros pré-analíticos**. Rev HCPA. 31, 1 (2011) 66-72
- 2- JURY, C.; NAGAI, Y.; TATSUMI, N. – **Collection and handling of blood**. In: BAIN, B. J. et al. - *Dacie And Lewis Practical Haematology*. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 1-9
- 3- BAIN, B. J. et al. - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 70
- 4- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – **Eritropoese e aspectos gerais da anemia**. In: HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - *Fundamentos em Hematologia*. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013, ISBN: 978-1405198905, p. 15-32
- 5- MATHUR, S. C.; SCHEXNEIDER, K. I.; HUTCHISON, R. E. – **Hematopoiesis**. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 536-556
- 6- MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 528
- 7- MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 549
- 8- THEML, H.; DIEM, H; HAFERLACH, T. - **Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis**. 2nd Ed. New York: Thieme, 2004, ISBN: 978-1588901934, p.48

- 9- BAIN, B. J. et al. - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 95
- 10- VAJPAYEE, N.; GRAHAM, S. S.; BEM, S.– **Basic examination of blood and bone marrow**. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 507-535
- 11- MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 524
- 12- BAIN, B. J. – **Quantitative changes in blood cells**. In: BAIN, B. J. - **Blood Cells: a Practical Guide**. 4th Ed. Oxford: UK: Blackwell, 2006, ISBN: 978-1-4051-4265-6, p. 217-262
- 13- **Pentra DX Nexus – Manual do Utilizador**. Horiba Medical
- 14- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - **Fundamentos em Hematologia**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013, ISBN: 978-1405198905, p. 16
- 15- WILD, B. J.; BAIN, B. J. – **Investigation of abnormal haemoglobins and thalassemia**. In: BAIN, B. J. et al. - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 301-332
- 16- MIRANDA, A. - **Hemoglobinopatias em Portugal e estratégias de prevenção: Contributo do laboratório de Hematologia e Bioquímica**. 18th SPGH Annual Reunion. Lisboa, 2014
- 17- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – **Distúrbios genéticos da hemoglobina**. In: HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - **Fundamentos em Hematologia**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013, ISBN: 978-1405198905, p. 88-107

- 18- ELGHETANY, M. T.; BANKI, K.– **Erythrocytic disorders**. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 557-600
- 19- BAIN, B. J. et al. - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 84
- 20- SACKS, D. B. et al. – **Diabetes**. In: BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. - Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7th Ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2015, ISBN: 978-1455741656, p. 608-631
- 21- NETTO, A.P. et al. - **Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais**. J Bras Patol Med Lab. 45, 1 (2009) 31-48
- 22- **D-10, Dual Program – Manual do Utilizador**. Bio-Rad Laboratories
- 23- SANTOS, V.; CUNHA, S.; CUNHA, D. - **Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações**. Rev Ass Med Brasil. 46, 3 (2000) 232-236
- 24- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – **Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia**. In: HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013, ISBN: 978-1405198905, p. 314-329
- 25- LORENZI, T. F. – **Hemostasia**. In: LORENZI, T. F. - Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, ISBN: 978-8527717915, p.145-195
- 26- SCHMAIER A. H.; MILLER, J. L.– **Coagulation and fibrinolysis**. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 787-800

- 27- LAFFAN, M.; MANNING, R. – **Investigation of haemostasis**. In: BAIN, B. J. et al. - Dacie And Lewis Practical Haematology. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 393-445
- 28- LAFFAN, M.; MANNING, R. – **Laboratory control of anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet therapy**. In: BAIN, B. J. et al. - Dacie And Lewis Practical Haematology. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 467-481
- 29- FISCHBACH, F.; DUNNING, M. – **Overview of basic blood hematology and coagulation testes**. In: FISCHBACH, F.; DUNNING, M. - A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. 8th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009, ISBN: 978-0781771948, p. 57-182
- 30- LAFFAN, M.; MANNING, R. – **Investigation of a thrombotic tendency**. In: BAIN, B. J. et al. - Dacie And Lewis Practical Haematology. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 446-465
- 31- **BCS XP System – Guia do Operador**. Siemens Medical Solutions Diagnostics
- 32- BARNETT, D.; DENNY, T. N. – **Lymphocyte immunophenotyping in human immunodeficiency virus infection**. In: CAREY, J.; MCCOY, J.; KEREN, D. - Flow Cytometry in Clinical Diagnosis. 4th Ed. ASCP Press, 2007, ISBN: 978-0891896258, p. 259-274
- 33- CAQUET, R. - **Guia Prático de Análises Clínicas**. 1ª Edição. Lisboa : Climepsi Editores, 2004, ISBN: 972-7960243, p.326-327
- 34- FRITSCHER, T. R.; SELVARANGAN, R.– **Medical Parasitology**. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2, p. 1187-128

- 35- PALMA DOS REIS, I. et al. - **Malária Grave Importada em Doentes Críticos**, Acta Med Port. 25, 5 (2012) 271-276
- 36- BAIN, B. J. et al. - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 10th Ed. Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier, 2006, ISBN: 978-0702034084. p. 110
- 37- **ADVIA Centaur XP Immunoassay System – Guia do Operador** – Siemens Medical Solutions Diagnostics
- 38- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6th Ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2008, ISBN: 978-0721638652
- 39- MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. - Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2
- 40- **ADVIA 1800 Chemistry System – Guia do Operador** – Siemens Medical Solutions Diagnostics
- 41- OCHEI, J.; KOLHATKAR, A. - **Medical Laboratory Science. Theory and Practice**. 2nd Ed. New Delhi: Tata Mcgraw-Hill Publishing Company Limited, 2000, ISBN: 978-0074632239, p. 73-76
- 42- HALL, A.; YATES, C. - **Immunology (Fundamentals of Biomedical Science)**. 1st Ed. New York: Oxford University Press, 2010, ISBN: 978-0199534968, p. 16
- 43- **Rapidlab 1200 System – Guia do Operador** - Siemens Medical Solutions Diagnostics
- 44- **IMMULITE 2000/2500 – Operator’s Manual** - Siemens Medical Solutions Diagnostics

45-RAMALHO, C - **Rastreio de cromossomopatias: novas teorias e velhos conceitos II.** Acta Obstet Ginecol Port. 1, 3 (2007) 134-148

Anexos

Anexo A – Valores de referência do Hemograma com plaquetas

| Parâmetro | Valores de referência | | | | Unidade |
|-------------|-----------------------|-----------|------------|---------------|--------------------|
| | Homem | Mulher | Criança | Recém-nascido | |
| Eritrócitos | 4.50-6.50 | 3.90-5.90 | | 4.50-6.50 | $\times 10^{12}/L$ |
| Hemoglobina | 13.0-18.0 | 11.5-16.5 | | 13.0-18.0 | g/dL |
| Hematócrito | 41.0-55.0 | 37.0-47.0 | | 41.0-55.0 | % |
| M.C.V. | 76.0-96.0 | | 77.0-91.0 | 85.0-105.0 | fL |
| M.C.H. | 27.0-32.0 | | | | pg |
| C.H.C.M. | 32.0-36.0 | | | | g/dL |
| RDW | 11.0-15.8 | | | | % |
| Leucócitos | 4.10-11.10 | | 4.50-13.50 | 10.00-26.00 | $\times 10^9/L$ |
| Neutrófilos | 2.0-7.5 | | | 5.00-13.00 | $\times 10^9/L$ |
| Eosinófilos | 0.04-0.40 | | | 0.10-2.50 | $\times 10^9/L$ |
| Basófilos | 0.00-0.40 | | | 0.00-0.10 | $\times 10^9/L$ |
| Linfócitos | 1.5-4.0 | | | 3.50-8.50 | $\times 10^9/L$ |
| Monócitos | 0.20-0.80 | | | 0.50-1.50 | $\times 10^9/L$ |
| Plaquetas | 150-500 | | | | $\times 10^9/L$ |

Anexo B – Valores de referência dos parâmetros analisados no estudo da coagulação

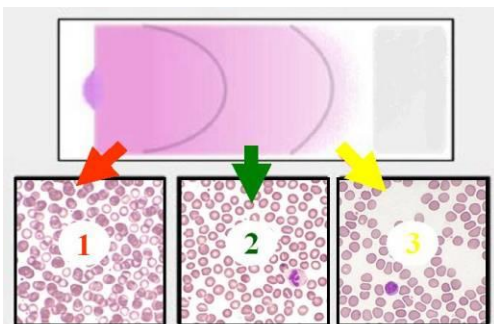
| Parâmetro | Valores de referência | Unidade |
|--|-----------------------|--------------|
| Tempo de Protrombina (TP) | 11.0-13.0 | Segundos (s) |
| Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aTTP) | 22.0-30.0 | Segundos (s) |
| Fibrinogénio | 200-400 | mg/dL |
| D-Dímeros | <500 | mg/dL |
| Proteína C | 70.0-140.0 | % da norma |
| Proteína S | 55.0-160.0 | % da norma |
| Antitrombina III | 87.0-126.0 | % da norma |

Anexo C - Esfregaço de Sangue Periférico (SP)

O princípio da técnica baseia-se no espalhamento de uma fina camada de sangue sobre uma lâmina de vidro, que depois de corada por uma coloração adequada (geralmente coloração de Wright), é observada ao microscópio.

Na generalidade, um esfregaço de características perfeitas deve ser: fino, para que as células estejam espalhadas; regular, para que haja uma correta distribuição celular; ter margens paralelas aos bordos da lâmina; extremidade em franja e não deve apresentar espaços com falhas ou estrias.

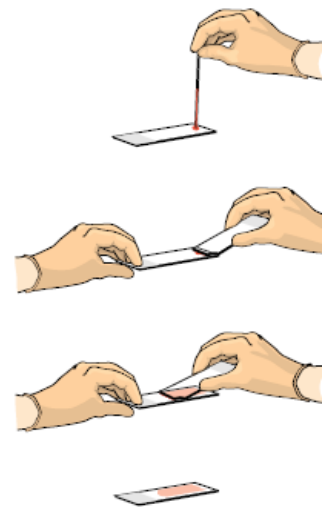
Relativamente à distribuição celular no esfregaço, as células posicionam-se de forma especial consoante o seu tamanho e peso. Desta forma, os linfócitos por serem pequenos situam-se no centro do esfregaço, os granulócitos por serem maiores e com granulações têm tendência a migrar para os bordos, e os monócitos, apesar de serem células grandes, como são mais leves que os granulócitos são arrastados para a franja.



Na visualização microscópica do esfregaço, a zona ideal de observação é a representada pelo número 2 na ilustração, zona que apresenta uma correta distribuição celular.

Procedimento para a execução de um esfregaço de SP:

- 1 – Identificar a lâmina com o número do tubo;
- 2 – Depositar uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina com a ajuda de um capilar;
- 3 – Colocar o bordo do espalhador (limpo e sem irregularidades) sobre a lâmina e fazê-la deslizar até encontrar a gota, mantendo entre as duas um ângulo de $\pm 35^\circ$ (o sangue espalha-se, por capilaridade, ao longo do ângulo definido);
- 4 – Com um movimento firme e regular estender a gota de sangue por arrastamento;
- 5 – Deixar secar.



Anexo D – Coloração de Wright

A coloração de Wright baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky e, rotineiramente, é aplicada na coloração de esfregaços de sangue periférico (SP).

Quanto ao princípio, a coloração de Wright utiliza os corante azul-de-metileno e eosina (corante de Wright) e também o metanol (como fixador). Estes corantes apresentam propriedades específicas que permitem a diferenciação dos subtipos de leucócitos, nomeadamente pelas características do citoplasma e das granulações.

O azul-de-metileno sendo um corante com propriedades de pH básico tem afinidade para as estruturas básicas, como as granulações dos basófilos, o núcleo dos linfócitos e os monócitos. Contrariamente, a eosina é um corante com características ácidas, pelo que, cora todas as estruturas ácidas, neste caso, as granulações dos eosinófilos. Em relação aos neutrófilos, como o próprio nome indica, são estruturas neutras com afinidade para ambos os corantes daí que a coloração das suas granulações variam de violeta-rosa a lilás. Os eritrócitos apresentam uma coloração rosada (acidófilos) e as plaquetas cores rosas violáceas (estruturas neutras).

Procedimento para a preparação do reagente de Wright:

- 1 – Pesar 6 g de Wright (comercial) e diluir em 2500 mL de metanol (comercial);
- 2 – Agitar bem até à dissolução total do pó;
- 3 – Colocar numa estufa a 37°C durante cerca de 30 dias e agitar diariamente.

Procedimento para a coloração de Wright:

- 1 – Colocar corante de Wright sobre o esfregaço de SP cobrindo-o completamente;
- 2 – Deixar atuar durante 5 minutos;
- 3 – Colocar “tampão” (água desionizada) sem retirar o corante e deixar atuar durante 10 minutos;
- 4 – Lavar com água corrente e secar;
- 5 – Observar ao microscópio ótico em objetiva de imersão.

Anexo E – Coloração de May-Grunwald Giemsa

Apesar de muito utilizada na coloração de esfregaços de SP, no Sector da Hematologia, a coloração de May-Grunwald Giemsa foi usada maioritariamente na preparação de esfregaços de Medula Óssea (MO).

Relativamente ao princípio de reação, o método de May-Grunwald, analogamente à coloração de Wright, segue o estabelecido por Romanowsky para a coloração hematológica. Neste contexto, os corantes May Grunwald e Giemsa apresentam as soluções de eosina, azul-de-metileno e eosinato de azur, levando à coloração das células sanguíneas de forma semelhante ao que anteriormente foi descrito para a coloração de Wright.

Procedimento para a preparação dos reagentes May-Grunwald Giemsa:

- 1 – May-Grunwald: diluir em partes iguais, com água destilada (exemplo: 50 mL de água destilada com 50 mL de reagente May-Grunwald);
- 2 – Giemsa: diluir 1/10 em água destilada (exemplo: 10 mL de Giemsa em 90 mL de água destilada)

Procedimento para a coloração de May-Grunwald Giemsa:

- 1 – Fixar os esfregaços de SP numa tina contendo metanol durante 10 minutos (para esfregaços de MO deixar cerca de 20 minutos);
- 2 – Transferir os esfregaços para outra tina contendo May-Grunwald (diluído) e deixar atuar durante 10 minutos;
- 3 – Transferir os esfregaços para uma terceira tina contendo Giemsa (diluído) e deixar durante 20 minutos;
- 4 – Lavar com água corrente e secar;
- 5 – Montagem final da lâmina pela aplicação da lamela com reagente Entellan para a colagem.

Anexo F – Coloração de Perl's

Em Hematologia, a coloração de Perl's é utilizada, rotineiramente, na preparação de esfregaços de Medula Óssea (MO), permitindo por microscopia ótica, a identificação de depósitos de ferro e ferro sideroblástico. Neste contexto, esta coloração assume especial importância no apoio ao diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas, destacando-se a Anemia Refratária com Sideroblastos em anel.

Quanto ao princípio da reação, os íons de ferrocianeto de potássio, presentes na solução de Perl's, reagem com os cátions férricos, resultando ferrocianeto férrico, um produto reacional de coloração azul.

Procedimento para a preparação de reagentes:

✓ Solução de Perl's (é preparada de novo para cada ciclo de coloração)

Misturar em partes iguais Ferrocianeto de potássio e HCL 0,2 N (exemplo: 35 mL de cada);

✓ Ferrocianeto de potássio

Reconstituir 20 g em 1 L de água destilada;

✓ Safranina (solução stock)

Reconstituir 0,1 mg em 100 mL de água destilada;

✓ Safranina diluída (reutilizável)

Diluir 10 mL de solução stock em 190 mL de água destilada.

Procedimento da Coloração de Perl's:

1- Ligar o banho-maria a 56°C (verificar a temperatura);

2- Preparar a "Solução de Perl's";

3- Fixar os esfregaços de MO em metanol durante 10 minutos (Nota: fixar também o esfregaço de controlo positivo);

4- Deixar secar;

5- Colocar a "Solução de Perl's" numa tina de coloração;

6- Mergulhar os esfregaços e o controlo positivo na tina de coloração e tapar;

7- Colocar a tina no banho-maria, desligá-lo e deixar 5 minutos;

8- Retirar as lâminas e lavar com água destilada;

9- Secar as lâminas com papel absorvente para não diluir posteriormente a safranina;

10- Corar com safranina diluída durante 20 minutos;

11- Lavar bem com água destilada e deixar secar;

12- Montagem final da lâmina pela aplicação da lamela com reagente Entellan para a colagem.