



Ana Isabel Mendes Frias

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Paulo João Soares e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Isabel Mendes Frias

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Paulo João Soares e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Índice

Índice de Tabelas .....	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Agradecimentos.....	xiii
1. Introdução .....	1
2. Caracterização do Laboratório S. José.....	3
<b>2.1. Amostras</b> .....	3
<b>2.2. Recursos humanos</b> .....	4
<b>2.3. Funcionamento</b> .....	4
2.3.1. Fase pré-analítica.....	4
2.3.2. Fase analítica.....	6
2.3.3. Fase pós-analítica.....	7
<b>2.4. Controlo de qualidade</b> .....	8
2.4.1. Avaliação interna da qualidade.....	8
2.4.2. Avaliação externa da qualidade.....	8
3. Hematologia.....	9
<b>3.1. Introdução teórica</b> .....	9
3.1.1. Hematopoiese.....	9
3.1.2. Hemostase.....	12
<b>3.2. Determinações analíticas</b> .....	13
3.2.1. Hemograma.....	13
3.2.2. Contagens em câmara de Neubauer.....	15
3.2.3. Quantificação de reticulócitos.....	15
3.2.4. Esfregaço de sangue periférico (ESP).....	16
3.2.5. Parâmetros da coagulação .....	17
<b>3.2.5.1. Tempos de coagulação</b> .....	18
<b>3.2.5.2. Fibrinogénio</b> .....	19
3.2.6. Velocidade de Sedimentação.....	20
<b>3.3. Casos Clínicos</b> .....	20
3.3.1. Caso Clínico 1 .....	20
3.3.2. Caso Clínico 2 .....	22
3.3.3. Caso Clínico 3 .....	23

4. Imunologia .....	25
<b>4.1. Introdução teórica</b> .....	25
4.1.1. Sistema imunitário .....	25
4.1.2. Detecção de infeção através da avaliação serológica.....	27
<b>4.1.2.1 Vírus</b> .....	28
<b>4.1.2.2. Bactérias</b> .....	35
<b>4.1.2.3. Parasitas</b> .....	37
4.1.3. Desequilíbrios do sistema imune .....	38
<b>4.1.3.1. Alergias</b> .....	39
<b>4.1.3.2. Doenças autoimunes</b> .....	39
<b>4.2. Determinações analíticas</b> .....	40
4.2.1. Sistemas automáticos.....	41
<b>4.2.1.1. ARCHITECT</b> .....	41
<b>4.2.1.2. ImmunoCAP</b> .....	41
4.2.2. Técnicas manuais.....	42
<b>4.2.2.1. Enzyme-Linked Imunosorbent Assay (ELISA)</b> .....	42
<b>4.2.2.2. Immunoblot</b> .....	43
<b>4.2.2.3. Aglutinação</b> .....	44
<b>4.2.2.4. Imunocromatografia</b> .....	45
<b>4.3. Casos Clínicos</b> .....	46
4.3.1. Caso clínico 4 .....	46
4.3.2. Caso Clínico 5 .....	47
4.3.3. Caso Clínico 6 .....	47
4.3.4. Caso Clínico 7 .....	48
4.3.5. Caso Clínico 8 .....	49
4.3.6. Caso Clínico 9 .....	50
4.3.7. Caso Clínico 10.....	50
5. Microbiologia .....	51
6. Bioquímica .....	55
7. Endocrinologia.....	58
8. Conclusão.....	60
9. Referências .....	62

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Recursos Humanos do Laboratório S. José.....	4
Tabela 2: Tipos de tubos utilizados nas colheitas.....	5
Tabela 3: Critérios de rejeição de amostras.....	6
Tabela 4: Equipamentos automáticos utilizados nas diferentes valências.....	7
Tabela 5: Caracterização das células sanguíneas.....	11
Tabela 6: Resultados laboratoriais do caso clínico 1.....	21
Tabela 7: Resultados laboratoriais do caso clínico 2.....	22
Tabela 8: Resultados Laboratoriais do caso clínico 3.....	23
Tabela 9: Características das diferentes classes de anticorpos.....	27
Tabela 10: Relação entre o estado da Hepatite B e os dados laboratoriais.....	31
Tabela 11: Perfis serológicos possíveis para <i>Toxoplasma gondii</i> .....	38
Tabela 12: Tipos de Hipersensibilidade.....	38
Tabela 13: Diagnóstico e prevalência de doenças autoimunes.....	40
Tabela 14: Resultados laboratoriais do caso clínico 4.....	46
Tabela 15: Resultados laboratoriais do caso clínico 5.....	47
Tabela 16: Resultados laboratoriais do caso clínico 6.....	47
Tabela 17: Resultados laboratoriais do caso clínico 7.....	48
Tabela 18: Resultados laboratoriais do caso clínico 8.....	49
Tabela 19: Resultados laboratoriais do caso clínico 9.....	50
Tabela 20: Resultados laboratoriais do caso clínico 10.....	50
Tabela 21: Interpretação das Uroculturas.....	52
Tabela 22: Parâmetros Bioquímicos determinados no Laboratório S. José.....	55
Tabela 23: Hormonas doseadas no Laboratório S. José.....	58



## Lista de Abreviaturas

AIAT	Alfa-I Antitripsina
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica, do inglês <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
ANAs	Anticorpos Anti-Nucleares, do inglês <i>Antinuclear Antibodies</i>
AgHBc	Antigénio da cápside do Vírus da Hepatite B
AgHBe	Antigénio HBe do Vírus da Hepatite B
AgHBs	Antigénio de superfície do Vírus da Hepatite B
Anti-dsDNA	Anticorpos contra a cadeia dupla do DNA
Anti-HBc	Anticorpo contra o antigénio HBc
Anti-HBe	Anticorpo contra o antigénio HBe
Anti-HBs	Anticorpo contra o antigénio HBs
Anti-TG	Anticorpo contra a Tiroglobulina
Anti-TPO	Anticorpos contra a Peroxidase
AP	Fosfatase Alcalina, do inglês <i>Alkaline Phosphatase</i>
APCs	Células Apresentadoras de Antigénios, do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada, do inglês <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
BNP	Péptido Natriurético Tipo B, do inglês <i>B-type Natriuretic Peptide</i>
CK	Creatina Cinase, do inglês <i>Creatine Kinase</i>
CMHC	Concentração Média de Hemoglobina Globular
CMV	Citomegalovírus
CRP	Proteína C Reativa, do inglês <i>C-Reactive Protein</i>
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona Sulfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DT	Diretor Técnico
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA K3	Ácido Etilenodiaminotetracético Tri-Potássico, do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid K3</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> .
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
EUCAST	Comité Europeu de Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FSH	Hormona Folículo-Estimulante, do inglês <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GGT	Gama-Glutamil Transferase
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicada
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HGM	Hemoglobina Globular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>



HSV	Vírus Herpes Simplex, do inglês <i>Herpes Simplex Virus</i>
Ht	Hematócrito
HTLV	Vírus Linfotrópico das Células T, do inglês <i>Human T Lymphotropic Virus</i>
Ig	Imunoglobulina
INR	Razão Internacional Normalizada, do inglês <i>International Normalized Ratio</i>
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional, do inglês <i>International Sensitivity Index</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	Hormona Luteinizante, do inglês <i>Luteinizing Hormone</i>
MAPSS	Separação por Dispersão Multiangular Polarizada, do inglês <i>Multiangle Polarized Scatter Separation</i>
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTH	Hormona Paratiroideia, do inglês <i>Parathyroid hormone</i>
RBC	Eritrócitos, do inglês <i>Red Blood Cells</i>
RDW	Índice de Anisocitose (avaliação do tamanho dos eritrócitos), do inglês <i>Red-cells Distribution Width</i>
RIA	Radioimunoensaio, do inglês <i>Radioimmunoassay</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RPR	Reaginas Rápidas do Plasma, do inglês <i>Rapid Plasma Reagin</i>
SHBG	Globulina Transportadora de Hormonas Sexuais, do inglês <i>Sex Hormone-Binding Globulin</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
TP	Tempo de Protrombina
TPHA	Hemaglutinação de <i>Treponema pallidum</i> , do inglês <i>Treponema pallidum Hemagglutination</i>
TRABs	Anticorpos contra o recetor da TSH, do inglês <i>Thyrotropin Receptor Antibodies</i>
TSA	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos
TSH	Hormona Estimuladora da Tireoide, do inglês <i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TT	Tempo de Trombina
VDRL	Pesquisa Laboratorial de Doença Vénere, do inglês <i>Veneral Disease Research Laboratory</i>
VGM	Volume Globular Médio
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D
VHE	Vírus da Hepatite E
VS	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

## Resumo

As Análises Clínicas representam uma importante ferramenta para o diagnóstico e seguimento de muitas patologias. Vários estudos internacionais apontam que setenta por cento (70%) da tomada da decisão clínica médica está dependente de, ou é confirmada por, resultados de testes médicos laboratoriais.

Apesar de toda a componente teórica inerente a este tema, a aplicação dos conceitos a nível prático tem extrema importância.

O objetivo deste relatório é documentar o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas. Este estágio foi realizado no Laboratório S. José, durante um período de seis meses. Os objetivos do estágio curricular são não só aprofundar os conceitos teóricos adquiridos ao longo do primeiro ano do mestrado como também adquirir novas competências a nível prático.

As Análises Clínicas podem ser divididas em quatro valências *major*: Hematologia, Imunologia, Bioquímica e Microbiologia. Durante o estágio, tomei contacto com todas as quatro, ainda que se tenham evidenciado os trabalhos realizados na Hematologia e na Imunologia durante a elaboração deste relatório.

As principais partes constituintes deste documento são uma breve introdução, a descrição do funcionamento do Laboratório S. José, a apresentação das duas valências escolhidas e uma breve conclusão.



## Abstract

Clinical Analysis represent an important tool to diagnose and follow-up many diseases. Several international studies indicate that seventy percent (70%) of medical decision is dependente or confirmed by laboratory results.

Although all the theoretical inherent to this topic, the application of concepts at practical level have extreme importance.

The purpose of this report is document the traineeship of the Master degree in Clinical Analysis. This traineeship was performed in *Laboratório S. José*, during six months. The traineeship's aims were not only deepen the theoretical concepts acquired at the first year of the Master degree, but also acquire new skills at practical level.

Clinical Analysis can be divided into four general valences: Hematology, Immunology, Biochemistry and Microbiology. During the traineeship, they were worked all the four, even if only the work realized on Hematology and Immunology has been discussed in this report.

The main parts constituents of this document are a brief introduction, the description of the operation of the *Laboratório S. José*, the presentation of the two chosen valences and a brief conclusion.



# Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Dr. Paulo João Soares por me ter recebido no seu laboratório para a realização deste estágio, por toda a disponibilidade, orientação e conhecimento partilhado ao longo destes seis meses.

Agradeço, ainda, ao Dr. José Paulo Soares, por todos os ensinamentos, histórias e boa disposição.

A todos os membros do Laboratório S. José: Milene, José Luís, Magda, Tânia, Rita, Joana, Conceição, Graça, Anabela, Patrícia, Rosana e Fernanda por me terem acolhido na sua grande família, por todos os ensinamentos, bons momentos e gargalhadas partilhadas ao longo destes seis meses. Queria deixar um agradecimento especial à Milene, por toda a paciência, dedicação e empenho em ensinar-me tudo o que era necessário.

À professora Doutora Ana Miguel Matos por toda a disponibilidade, apoio e orientação na elaboração deste relatório.

Aos meus pais. Sem eles nada disto era possível. Por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, por todo o apoio e paciência sempre demonstrados para comigo.

E por último, mas não menos importantes, aos meus amigos (especialmente Solange, Beatriz, Catarina, Mariana, Pedro e André) por todo o apoio, ajuda, troca de ideias e paciência para ouvir as minhas histórias.

A todos, o meu sincero muito Obrigada!



# I. Introdução

O termo Análises Clínicas designa uma vasta área de procedimentos utilizados não só no diagnóstico, como também na monitorização das mais diversas patologias. Geralmente, são consideradas quatro valências *major*: a Hematologia, a Microbiologia, a Imunologia e a Bioquímica. No entanto, dada a fisiologia do organismo humano, torna-se difícil fazer uma separação rigorosa destas valências, uma vez que todas se complementam aquando de um diagnóstico clínico.

O primeiro ano do Mestrado em Análises Clínicas oferece uma componente teórica muito completa que abrange a fisiologia do organismo humano e as patologias associadas à sua perturbação. No segundo ano, os estudantes têm a oportunidade de fazer um estágio curricular num laboratório de análises clínicas, com o objetivo de aplicar os conhecimentos adquiridos nas aulas e integrar a rotina diária desse laboratório.

O estágio curricular foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas S. José, orientado pelo Dr. Paulo João Soares, Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas e Diretor Técnico (DT) deste laboratório, e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, professora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e teve a duração de seis meses, de dezembro de 2015 a maio de 2016.

O objetivo inicial era dividir o período de estágio pelas quatro valências (um mês em cada uma) e os restantes dois meses serem divididos por duas valências escolhidas pelo aluno. O Laboratório S. José não é dividido em setores – funciona como um todo, estando as diferentes valências interligadas – e torna-se impossível aplicar essa divisão.

Este relatório será constituído por três partes. Inicia-se com a descrição do Laboratório S. José: funcionários, amostras analisadas e descrição geral do funcionamento do laboratório. As outras duas partes dizem respeito às valências escolhidas para aprofundar (Hematologia e Imunologia). Nestas, será feita uma breve introdução teórica, a descrição das técnicas realizadas no Laboratório S. José e a análise de alguns casos clínicos ilustrativos de cada valência.





## 2. Caracterização do Laboratório S. José

O Laboratório S. José localiza-se no edifício da IDEALMED – Unidade Hospitalar de Coimbra (IDEALMED-UHC), possuindo postos de colheita em Coimbra (Rua dos Combatentes, Pedrulha, CLIMAG, Ceira), Semide e Louriçal.

O Laboratório exerce a sua atividade prestando serviços de análise de produtos biológicos nas seguintes valências técnicas:

- Bioquímica,
- Hematologia,
- Microbiologia,
- Imunologia,
- Endocrinologia laboratorial e Estudo Funcional dos Metabolismos, Órgãos e Sistemas,
- Monitorização de Fármacos e Toxicologia Clínica,
- Genética,
- Patologia Molecular.

### 2.1. Amostras

O número de amostras diárias varia entre 100 e 200.

A maioria das amostras é colhida por enfermeiros ou técnicos de laboratório. As amostras externas recebidas pelo laboratório provêm essencialmente da IDEALMED-UHC e são divididas pelo:

- Internamento,
- Atendimento Médico Permanente,
- Maternidade,
- Oncologia da IDEALMED-UHC,

bem como da Ferticentro, unidade de Medicina da Reprodução sediada na IDEALMED-UHC.

O Laboratório S. José recebe ainda amostras de outros Laboratórios, como o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e outros Laboratórios da região Centro.

## 2.2. Recursos humanos

Na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** estão apresentados os funcionários do laboratório e os respetivos cargos.

**Tabela I: Recursos Humanos do Laboratório S. José.**

<b>Cargo</b>	<b>Nome</b>
<b>Rececionista</b>	Fernanda Castro
	Tânia Gonçalves
	Rita Casaca
	Joana Curado
	Ricardo Nogueira
	Anabela Barros
<b>Enfermeiros</b>	Rosana Silva
	Patrícia Baptista
	Graça Santos
	Anabela Rodrigues
	Vanessa Colaço
	Ana Pinto
	Eduardo Pocinho
<b>Técnico Superior de Análises Clínicas</b>	José Pereira
	Milene Gonçalves
	Magda Lemos
	Paulo Santos
<b>Técnico de Análises sem curso</b>	Conceição Faina
<b>Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas</b>	Dra. Maria de Lourdes Soares
	Dr. José Paulo Soares
	Dr. Paulo João Soares (DT)

## 2.3. Funcionamento

### 2.3.1. Fase pré-analítica

A receção, quer do Laboratório quer dos postos de colheita, é o primeiro ponto de contacto com o utente. É neste local que é feita a inscrição do utente, bem como a explicação e verificação das condições necessárias à realização das análises (jejum, hora de colheita, duração do procedimento e outras restrições). É importante perceber se o utente compreende todas estas condições para garantir a obtenção de amostras adequadas. Igualmente, é na receção que é atribuída a cada inscrição um código de barras com uma referência interna específica.

Após a inscrição, o utente é encaminhado para uma sala de colheita onde se procede à obtenção das amostras necessárias às análises requeridas. A colheita é feita por um enfermeiro, por um técnico ou por um Especialista em Análises Clínicas. Antes de proceder à colheita, é verificada a identidade do utente e o estado de preparação para a colheita consoante as análises presentes na requisição. Se o utente cumprir todos os requisitos, o enfermeiro/técnico/especialista seleciona os tubos/contentores necessários, identifica-os com o número da inscrição e procede à colheita das mesmas. As amostras de sangue são colhidas para tubos que possuem um sistema universal de cores, explicado na Tabela 2. Amostras de fezes e urina são colhidas pelo utente, enquanto exsudados e outros tipos de amostras de material biológico mais específicas são colhidas pelos técnicos ou pelos Especialistas em Análises Clínicas.

**Tabela 2: Tipos de tubos utilizados nas colheitas.**

<b>Tubo</b>	<b>Composição</b>	<b>Amostra obtida</b>	<b>Análises feitas</b>
<b>Tampa vermelha</b>	Esferas ativadoras da coagulação	Soro	Imunologia Bioquímica
<b>Tampa roxa</b>	EDTA K3	Sangue total	Hematologia
<b>Tampa azul</b>	Citrato de sódio (1:9)	Plasma	Coagulação
<b>Tampa preta</b>	Citrato de sódio (1:4)	Sangue total	Velocidade de Sedimentação (VS)
<b>Tampa verde</b>	Heparina-lítio	Plasma	Bioquímica Imunologia

Quando a colheita das amostras é efetuada num posto de colheita ou por uma entidade externa ao laboratório, as amostras são identificadas de forma diferente: a cada utente é atribuído um número associado ao código do local da colheita. Por exemplo, se a colheita for realizada no posto de Semide o código será SXXXX; por outro lado, se for uma colheita da Ferticentro o código será, por exemplo, FERTXXXX. Nestes casos, quando as amostras chegam ao laboratório, as respetivas análises são introduzidas no sistema informático pelas rececionistas e é atribuída às amostras um código de barras com uma referência interna específica.

### 2.3.2. Fase analítica

Ao entrarem no laboratório, as amostras passam por um processo de triagem onde se avalia se reúnem as condições necessárias para a análise. As amostras são rejeitadas segundo critérios estabelecidos pelo DT, apresentados na Tabela 3. Quando uma amostra é rejeitada é solicitada uma nova colheita, a qual mantém a identificação da primeira amostra.

**Tabela 3: Critérios de rejeição de amostras.**

<b>Critérios</b>	<b>Condições para rejeição</b>
<b>Físico-Químicos</b>	<u>Sangue total</u> : Evidência de hemólise, existência de coágulos ou volume incorreto no tubo.
	<u>Soro/plasma</u> : Evidência de hemólise ou quantidade insuficiente para as análises requeridas.
	<u>Urina</u> : Volume inferior 2mL para urinas tipo II; evidência de deterioração e/ou contaminação; urinas de 24h cuja colheita não tenha sido efetuada segundo o especificado no folheto de instruções de colheita; urinas colhidas em frascos impróprios.
	<u>Expetoração</u> : Evidência de deterioração e/ou contaminação; presença de restos de comida; excesso de saliva; quantidade insuficiente; recipiente não estéril.
	<u>Fezes</u> : Fezes para exames culturais que não tenham sido recolhidas em recipientes esterilizados ou que não sejam entregues no próprio dia da colheita; amostras com sinais de contaminação por fungos.
<b>Administrativos</b>	Rejeição de amostras não identificadas ou identificadas de forma que levante dúvida quanto à identificação do utente e processo.
<b>Fase Pré-analítica</b>	Tubo não adequado à análise requerida; amostra coagulada; amostra destruída/extraviada.
<b>Fase analítica</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Produtos não conformes que podem ser detetados antes ou depois da realização de um doseamento e que são identificados pelos diferentes técnicos.</li><li>- Amostra pode ser rejeitada porque o utente não respeitou os requisitos da análise ou a amostra recolhida não é representativa.</li><li>- Pode ser pedida nova amostra para confirmação em determinados casos, nomeadamente resultados positivos para HIV ou VHB ou outros casos considerados graves, nos quais não se verifique correlação intraparamétrica e/ou o estado fisiopatológico do utente o justifique.</li></ul>

Após o tratamento inicial, as amostras são distribuídas pelos equipamentos de acordo com as análises requeridas (Tabela 4).

Além das análises gerais, o Laboratório S. José oferece aos seus utentes algumas análises no âmbito da Biologia Molecular.

O Laboratório S. José tem ainda parcerias com Laboratórios externos (Ambar, CAGT, CGC, outros) para proporcionar aos seus utentes um leque mais alargado de análises.

**Tabela 4: Equipamentos automáticos utilizados nas diferentes valências.**

Equipamento		Valência analisada	Amostra utilizada	Método
Architect	<b>ARCHITECT c8000</b>	Bioquímica	Sangue total (EDTA ou heparina);	Espetrofotometria ou Imunoturbidimetria dependendo do parâmetro.
	<b>ARCHITECT i2000</b>	Imunologia	Plasma (EDTA, Citrato de sódio ou Heparina);	Quimioluminescência
	<b>ARCHITECT i1000</b>	Imunologia	Soro; Urina.	Quimioluminescência
<b>Cell-dyn 3700</b>		Hematologia	Sangue total (EDTA, Citrato ou Heparina)	Impedância combinada e fluxo citométrico. Fluxo celular hidrodinâmico. Canal elétrico de impedância. Espectrofotometria.
<b>LENA</b>		Hematologia	Sangue total (Citrato)	Método de Westergren Modificado.
<b>Sysmex CA 1500</b>		Hematologia	Plasma (Citrato)	Coagulometria ótica
<b>ImmunoCap</b>		Imunologia	Soro	Fluoroimunoensaio
<b>SEBYA HYDRASIS</b>		Bioquímica	Soro	Eletroforese

### 2.3.3. Fase pós-analítica

Os resultados são validados pelos Farmacêuticos Especialistas em Análises Clínicas do Laboratório. Ocorre numa primeira fase uma validação técnica, ao nível dos equipamentos, que é feita com base nas calibrações, controlos internos e externos efetuados periodicamente. Posteriormente, é feita uma validação fisiopatológica dos resultados, na qual se verifica a concordância entre os resultados obtidos nas diferentes valências.

## **2.4. Controlo de qualidade**

### **2.4.1. Avaliação interna da qualidade**

Na avaliação interna da qualidade preferem-se amostras de casas comerciais diferentes das que fornecem os reagentes/equipamentos, inclusivamente podem ser utilizadas amostras internas. A seleção dos programas de controlo da qualidade é feita segundo critérios previamente estabelecidos pelo DT, tais como a experiência anterior do laboratório ou de outros laboratórios, o preço e/ou a referência em revistas técnico-científicas.

Cada controlo é fornecido pela casa comercial acompanhado por uma carta de Levey-Jennings. Esta carta é otimizada pelo DT com base em resultados anteriores e ajustes necessários devidos ao equipamento/técnica utilizada. Posteriormente, os novos intervalos de aceitação são introduzidos no equipamento. Quando um controlo ultrapassa os valores limite do intervalo, o equipamento emite um alerta. Cabe ao DT decidir a medida corretiva a implementar (utilização de outro nível de controlo, calibração ou, em casos extremos, rejeição do reagente).

Há parâmetros que são controlados diariamente e outros que o são semanalmente, dependendo da frequência com que são solicitados e da estabilidade do reagente.

### **2.4.2. Avaliação externa da qualidade**

O Laboratório S. José participa em vários programas: AEFA (microbiologia), PROBIOQUAL (bioquímica, coagulação, hematologia, imunologia, HbA1c, marcadores tumorais, serologia), SEHH (hematologia e coagulação), INSTAND (HLA), EQAS (hematologia) e NEQAS (bacteriologia). Há parâmetros que são avaliados semanalmente e outros mensalmente. Os resultados destes controlos ajudam o DT a avaliar a exatidão (transferibilidade) dos seus resultados, permitindo fazer os devidos ajustes nas curvas de calibração quando os seus valores não coincidem com o valor real (valor de consenso).

A avaliação externa da qualidade ajuda o DT a fazer uma avaliação crítica da técnica utilizada nos diferentes ensaios, uma vez que as entidades responsáveis pelos controlos externos comparam o resultado obtido pelo laboratório com o valor real (valor de consenso), comparam o resultado com os valores obtidos por outros laboratórios que utilizam o mesmo equipamento e a mesma técnica (*peers*) ou mesma técnica em equipamentos distintos.

## 3. Hematologia

A Hematologia é a especialidade médica que se encarrega do estudo dos elementos figurados (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e não figurados (plasma) do sangue. Além de permitir uma avaliação sanguínea permite identificar alterações sistêmicas, uma vez que o sangue tem a função de transporte, tanto de nutrientes como de metabolitos celulares.

### 3.1. Introdução teórica

#### 3.1.1. Hematopoiese

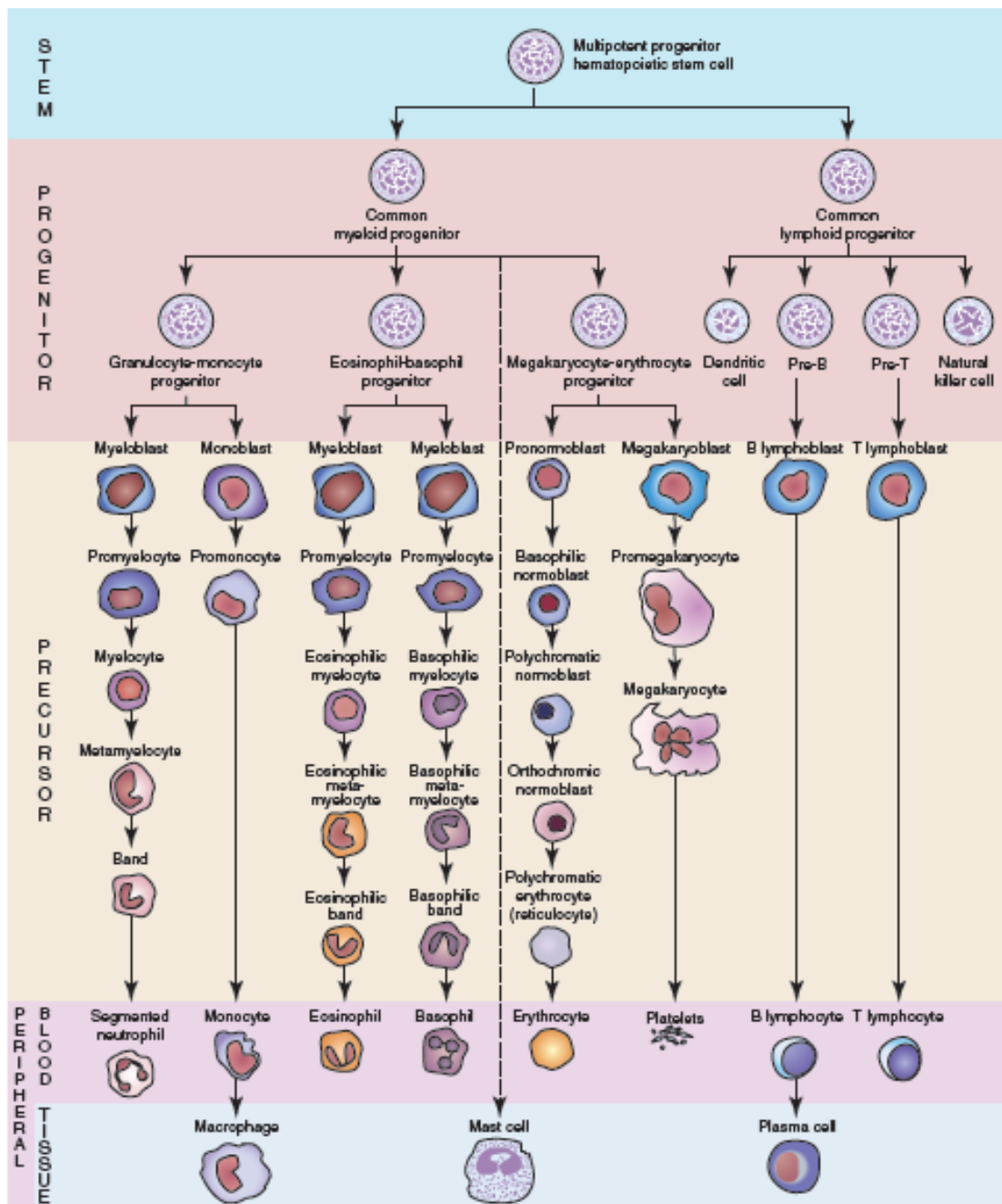
A Hematopoiese é o processo dinâmico e contínuo que leva à formação das células (Figura 1). Todo o processo é regulado por citoquinas e fatores de crescimento, cuja produção é modulada consoante as necessidades do organismo. Há sempre uma produção basal para compensar o constante *turnover* celular, permitindo manter os níveis das células sanguíneas em valores normais.

As células estaminais hematopoiéticas representam o início do processo. Estas células têm características muito especiais, tais como: capacidade de autorrenovação e diferenciação, produção ativa de telomerases (repõem os telómeros, impedindo a apoptose) e ativação de vias anti-apoptóticas.(1) Estas podem diferenciar-se em dois tipos de células: células precursoras da linha mieloide ou células precursoras da linha linfoide. A linha mieloide leva à formação de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, eritrócitos e plaquetas. A linha linfoide, como o próprio nome indica, é responsável para formação dos linfócitos. (1)

Toda a diferenciação da linha mieloide ocorre na medula óssea. Relativamente à linha linfoide, a diferenciação ocorre de forma diferente. O pro-lyfoblasto B completa a sua maturação na medula óssea, originando os linfócitos B (do inglês, *Bone*). Os linfócitos B entram na corrente sanguínea, podendo alojar-se em gânglios linfáticos, onde aguardam a estimulação que desencadeia a sua diferenciação em plasmócitos. O pro-lyfoblasto T entra na corrente sanguínea e encaminha-se para o timo, onde completa a sua maturação. É neste local que os linfócitos T (do inglês, *Thymus*) se diferenciam em T-auxiliares ou T-citotóxicos e passam por uma seleção apertada, onde são eliminadas as células com apetência para destruição do próprio. Erros nesta seleção podem desencadear inúmeras patologias, genericamente designadas por reações de hipersensibilidade. No que respeita à linha



eritroide, além os eritrócitos, é comum encontrar uma quantidade basal de reticulócitos (células precursoras dos eritrócitos) na corrente sanguínea.



**Figura 1:** Diagrama representativo da hematopoiese.(1)

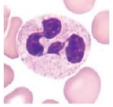
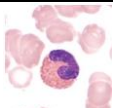
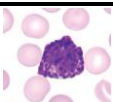
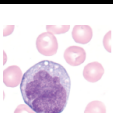
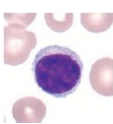
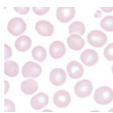
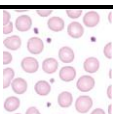
Em situações normais, apenas as células diferenciadas são encontradas na corrente sanguínea. Entendem-se por células diferenciadas as seguintes: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos, eritrócitos e plaquetas (fragmentos de células anucleadas). As características e funções destas células encontram-se sintetizadas na Tabela 5.

A maioria das patologias hematológicas está associada a uma alteração do número e/ou tipo de células presentes no sangue periférico. As leucemias são exemplos dessas patologias: tanto pode ser uma leucemia aguda, onde ocorre um aumento anormal de células imaturas

no sangue periférico, como pode ser uma leucemia crônica em que há um aumento do número das células diferenciadas no sangue periférico. As anemias constituem outro exemplo de patologias associadas à alteração de eritrócitos (quer do número quer da morfologia), sendo estas associadas à linha eritroide.

Tal como acontece noutros processos, para que a formação de eritrócitos decorra com normalidade, é necessário que sejam reunidas determinadas condições. É essencial a presença de alguns metais, principalmente o ferro, que é parte integrante da hemoglobina (proteína maioritária dos eritrócitos). Algumas vitaminas, como a vitamina B12 e o folato, são imprescindíveis à diferenciação da linha eritroide. A insuficiência destes nutrientes pode desencadear anemias graves.(1)

**Tabela 5: Caracterização das células sanguíneas. Adaptada de (2).**

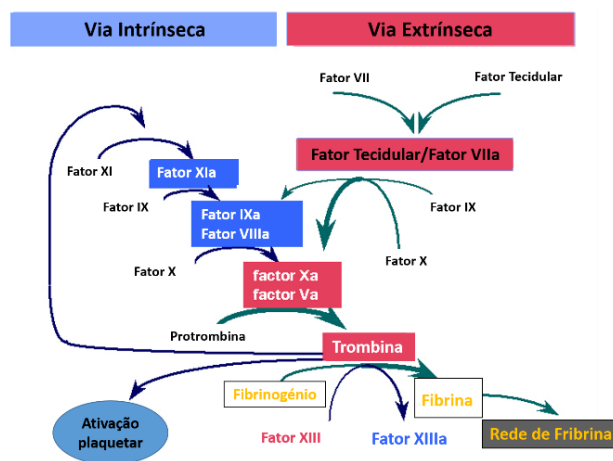
	<b>NOME</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>PRINCIPAIS FUNÇÕES</b>
<b>LEUCÓCITOS</b>	Neutrófilos	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo lobulado (3-5 lóbulos).</li> <li>- Grânulos primários e secundários.</li> </ul>	- Resposta a bactérias.
	Eosinófilos	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo lobulado (inferior a 3 lóbulos).</li> <li>- Grânulos eosinófilos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reações alérgicas.</li> <li>- Resposta a parasitas.</li> <li>- Remoção de fibrina.</li> </ul>
	Basófilos	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo lobulado.</li> <li>- Grânulos basófilos (contêm heparina e histamina).</li> </ul>	- Implicados em reações alérgicas.
	Monócitos	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maiores células do sangue periférico.</li> <li>- Núcleo reniforme.</li> <li>- Grânulos raros.</li> </ul>	- Diferenciam-se em macrófago nos tecidos e têm função fagocítica.
	Linfócitos	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Células pequenas.</li> <li>- Núcleo ocupa a maior parte da célula.</li> <li>- Citoplasma reduzido e basófilo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfócitos B: diferenciam-se em plasmócitos.</li> <li>- Linfócitos T: auxiliares ou citotóxicas.</li> <li>- NK: imunidade inata.</li> </ul>
	<b>ERITRÓCITOS</b>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ausência de núcleo.</li> <li>- Citoplasma acidófilo.</li> </ul>	- Responsáveis pelas trocas gasosas (transporte de oxigénio e dióxido de carbono).
	<b>PLAQUETAS</b>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pequenos fragmentos celulares granulados.</li> </ul>	- Papel fundamental na coagulação.

### 3.1.2. Hemostase

A hemostase é um conjunto de mecanismos biológicos que, de modo integrado, permitem parar uma hemorragia, atuando localmente e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo.(3) Permite assim proteger o sistema vascular de lesões, com reparação de tecidos e restabelecimento de funções. São intervenientes neste processo as plaquetas, as células endoteliais e as proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico).

Em condições normais, as células endoteliais dos vasos sanguíneos inibem a coagulação, uma vez que produzem prostaglandinas e óxido nítrico que inibem a agregação plaquetar e induzem a vasodilatação, respetivamente. Além disso, algumas proteínas plasmáticas, como a proteína S, a proteína C e a antitrombina, têm função anticoagulante, uma vez que inibem a cascata de coagulação.

Quando ocorre uma lesão, o primeiro passo é a vasoconstrição, ocorrendo uma diminuição do fluxo sanguíneo na área da lesão, prevenindo a hemorragia e ativando as plaquetas por contato. O tecido lesado produz várias substâncias pró-coagulantes, nomeadamente o fator tecidual que desencadeia a cascata de coagulação (Figura 2). A cascata de coagulação é constituída por três etapas: a via intrínseca e a via extrínseca, que culminam na via comum. A via extrínseca é iniciada pelo fator tecidual, que desencadeia a produção de trombina a partir da protrombina. Por sua vez, a trombina vai ativar a via intrínseca, aumentando a conversão de protrombina em trombina através da ação encadeada dos fatores de coagulação. A trombina tem duas funções principais: promover a agregação plaquetar e converter o fibrinogénio em fibrina, que juntos constituem o “rolhão” hemostático. O rolhão origina então um coágulo definitivo por compactação das plaquetas.(3)



**Figura 2:** Esquema da cascata de coagulação. Adaptado (4)

Quando a reparação dos tecidos termina, o coágulo é removido através de um processo designado por fibrinólise. Neste processo, o plasminogénio (enzima plasmática) é convertido em plasmina – protease serínica que dissolve o coágulo.

Todo este processo de formação e degradação de coágulos tem de ser finamente regulado para evitar distúrbios hemostáticos. Quando ocorre um desequilíbrio na regulação da cascata de coagulação podem ocorrer hemorragias severas ou formação de trombos/coágulos, que podem ter consequências a nível sistémico (nomeadamente enfartes do miocárdio ou Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC)).

## 3.2. Determinações analíticas

No Laboratório S. José são realizados vários tipos de determinações que auxiliam o médico no diagnóstico de alterações hematológicas. Entre elas, destacam-se as seguintes: o hemograma, a quantificação de reticulócitos, observação do esfregaço de sangue periférico, a determinação dos parâmetros de coagulação (tempos de coagulação, quantificação de fibrinogénio e D-Dímeros) e a determinação da velocidade de sedimentação eritrócitária. Quando requerido, é ainda possível realizar outro tipo de análises, nomeadamente, a avaliação da proteína S da coagulação (antigénica) e da proteína C da coagulação (funcional), bem como a quantificação de fatores de coagulação.

### 3.2.1. Hemograma

A amostra utilizada no hemograma é sangue total, utilizando como anticoagulante EDTA K3. O EDTA é o anticoagulante de eleição para este tipo de determinação porque não só forma complexos irreversíveis com o cálcio (ião essencial ao processo de coagulação), como

também inibe a agregação plaquetar, por inibição da desgranulação.(3) Além disso, o EDTA não altera a morfologia das células sanguíneas. Considerando que a técnica é baseada no tamanho e morfologia das células, esta característica do anticoagulante torna-se indispensável.

O hemograma permite quantificar e caracterizar as várias populações de células sanguíneas, através de mecanismos de impedância e dispersão da luz. Além desta contagem, o CELL-DYN 3700 permite determinar parâmetros que ajudam a caracterizar as alterações dos eritrócitos, nomeadamente a quantificação da hemoglobina, a determinação do volume globular médio e a determinação do índice de anisocitose (RDW - Red-cells Distribution Width).

### **3.2.1.1. Eritrócitos (RBC)**

A quantificação de eritrócitos é feita por impedância: o equipamento aproveita a baixa capacidade de condução elétrica destas células para fazer a sua quantificação. Ao sangue é adicionado um eletrólito altamente condutor, sendo a mistura encaminhada por um canal elétrico. Quando um eritrócito passa pelos eletrodos, há uma variação do potencial que permite a quantificação.(3)

A quantificação da hemoglobina (Hb) é realizada por hemoglobinometria. Ao sangue total é adicionado ferricianeto de potássio que oxida o ferro (II) a ferro (III), formando a metahemoglobina. Por sua vez, a metahemoglobina combina-se com o cianeto de potássio, formando a cianometahemoglobina (molécula estável). A concentração de hemoglobina é proporcional à densidade ótica da cianometahemoglobina a 540nm.

Os outros parâmetros relacionados com os eritrócitos são determinados por cálculo. O volume globular médio (VGM) é determinado dividindo o volume ocupado pelos eritrócitos pelo número total de eritrócitos. O hematócrito (Ht) representa a percentagem de eritrócitos na massa de sangue após centrifugação e é determinado multiplicando o número total de RBC pelo VGM. A hemoglobina globular média (HGM) é determinada pela razão entre a Hb total e o número total de RBC. A concentração média de hemoglobina globular (CMHG) representa a quantidade de hemoglobina por eritrócito e é determinada pela razão entre HGM e VGM. A distribuição do diâmetro do eritrócito (RDW) corresponde à percentagem de variação do volume de RBC, representando um índice de anisocitose. Este índice é relevante no diagnóstico diferencial de anemias.

### **3.2.1.2. Leucócitos**

A quantificação de leucócitos é feita por um mecanismo de impedância combinada e fluxo citométrico - MAPSS (Multiangle Polarized Scatter Separation). Com este método é possível diferenciar os leucócitos por tamanho e por complexidade, permitindo quantificar cada uma das populações leucocitárias (neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos). O CELL-DYN 3700 fornece estes dados sob a forma de número absoluto e sob a forma de percentagem, permitindo fazer interpretações diferentes dos resultados. Podemos ter um aumento de uma subpopulação de leucócitos sem que ocorra leucocitose tendo este resultado um significado quando há leucocitose.

### **3.2.1.3. Plaquetas**

A quantificação de plaquetas é realizada pelo mecanismo de impedância utilizado na quantificação de eritrócitos. Plaquetas e eritrócitos são diferenciados através da diferença de tamanho.

### **3.2.2. Contagens em câmara de Neubauer**

A amostra utilizada é a mesma do hemograma. No entanto, é-lhe adicionado um diluente específico de acordo com as células a contar (eritrócitos, plaquetas ou leucócitos).

Este tipo de contagem é utilizado para confirmar resultados pouco coerentes dados pelo aparelho automático, nomeadamente reduzido número de plaquetas e/ou eritrócitos na ausência de um coágulo visível à vista desarmada.

### **3.2.3. Quantificação de reticulócitos**

Os reticulócitos podem definir-se como eritrócitos de transição, em estado de diferenciação superior ao eritroblasto (que ainda possui núcleo). A diferença entre estas células e os eritrócitos é a presença de RNA, a qual pode ser identificada recorrendo a corantes específicos. Neste caso, o corante utilizado é o azul de metileno.

A quantificação de reticulócitos é feita no CELL-DYN 3700. Ao sangue total é adicionado o azul de metileno que durante um período de incubação (15 minutos, aproximadamente) se liga especificamente ao RNA destas células. A mistura é analisada pelo CELL-DYN 3700 e o

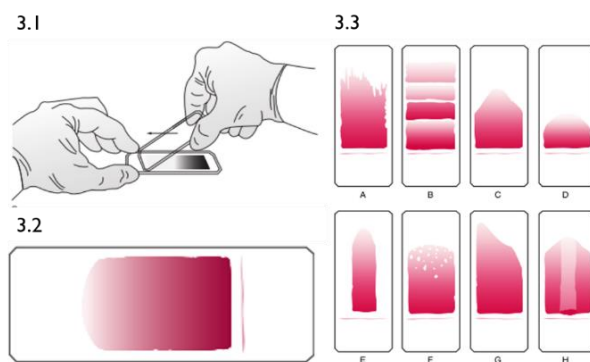
resultado é dado em número absoluto, acompanhado da percentagem de reticulócitos, obtida através do quociente entre o número total de reticulócitos e do número de RBC, previamente determinado no hemograma. Em caso de dúvida é feita uma contagem de reticulócitos num esfregaço de sangue periférico corado pelo azul de metileno Novo.

### 3.2.4. Esfregaço de sangue periférico (ESP)

O ESP é realizado quando é expressamente pedido na requisição ou quando as contagens do aparelho automático suscitam dúvidas.

A amostra utilizada no ESP é a mesma do hemograma (sangue total em EDTA K3). Para a realização de um ESP, coloca-se uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina e faz-se deslizar sobre esta outra lâmina num movimento único e contínuo segundo um ângulo de 45° (Figura 3.1).

É necessário que o ESP tenha determinadas características para uma boa observação e distinção das células sanguíneas. Na figura seguinte estão representados um exemplo de um bom ESP (Figura 3.2) e vários exemplos de ESP mal executados (Figura 3.3).



**Figura 3** - 3.1- Técnica para a realização do ESP. 3.2- Esquema de ESP bem executado. 3.3. Esquemas de ESP mal executados. A) Extremidades irregulares; B) Hesitação no deslizamento da lâmina; C) ESP muito curto; D) Pouca quantidade de sangue; E) Gotas de sangue não se espalharam na extremidade da lâmina superior; F) Gordura na lâmina inferior; G) pressão sobre a lâmina não foi homogênea; H) Demorou muito tempo e a

No Laboratório S. José, a coloração utilizada para os ESP é a coloração de Wright. O corante de Wright é composto por azul de metileno, eosina e metanol. O metanol tem como função fixar o ESP à lâmina. O corante é adicionado ao ESP e passados 3 minutos é

adicionado um tampão fosfato de pH 6,4 que modula a coloração: o azul-de-metileno é básico e vai corar de azul os componentes ácidos da célula (ácidos nucleicos, por exemplo); a eosina é ácida e vai corar de vermelho os componentes básicos (hemoglobina e grânulos dos eosinófilos, por exemplo); os neutrófilos, como o próprio nome indica, possuem grânulos neutros e, por isso, aceitam características dos dois corantes.(2)

Depois de seco, o ESP é observado ao microscópio. Para cada ampliação é importante ter alguns aspetos em atenção. Com uma objetiva de 10x, avaliamos a qualidade do ESP, a presença de *rouleaux* (eritrócitos empilhados), quantificação global de células nucleadas e a presença de células grandes e anormais (blastos, linfócitos reativos e parasitas).(2) Com uma objetiva de 40x, escolhemos o local do ESP onde os eritrócitos não estão sobrepostos e ligeiramente afastados (mal se tocam); é nesta zona que melhor se observam agregados e anomalias estruturais. Com uma objetiva de 100x (imersão em óleo), faz-se a contagem diferencial de leucócitos, na qual se contam 100 leucócitos consecutivos e se fazem as percentagens de cada classe. É ainda com esta ampliação que é possível identificar anomalias morfológicas das células, nomeadamente alterações tóxicas e linfócitos reativos, as quais devem ser reportadas quando observadas.

Algumas discrepâncias entre a contagem do CELL-DYN 3700 e da contagem manual estão associadas, essencialmente, à presença de aglomerados (quer de plaquetas, RBC ou leucócitos), mas também à presença de cadeias de fibrina, plaquetas gigantes ou de outras estruturas anormais que tenham tamanho semelhante a células sanguíneas (por exemplo, sombras de Grumprecht).(2)

### 3.2.5. Parâmetros da coagulação

O estado da hemostase do organismo é avaliado através de tempos de coagulação. No entanto, sendo a cascata de coagulação um mecanismo tão complexo, torna-se importante perceber qual a fase do processo que está afetada. Assim, foram desenvolvidos vários ensaios para avaliar cada uma das fases da cascata de coagulação: o tempo de protrombina (TP) avalia a via extrínseca; o tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) avalia a via intrínseca e o tempo de trombina (TT) avalia a via comum. Além da determinação dos tempos de coagulação, podemos ainda quantificar proteínas plasmáticas envolvidas no processo, como fatores de coagulação (por exemplo, fibrinogénio) ou produtos de degradação do fibrinogénio (D-Dímero). Um aumento destas proteínas está associado a um maior risco trombótico.



A amostra utilizada para estas determinações é plasma obtido com citrato de sódio na proporção 1:9 (uma parte de anticoagulante para nove partes de sangue). A razão anticoagulante-sangue é crítica neste tipo de testes por efeitos osmóticos: a concentração de cálcio livre no plasma afeta os resultados. Neste caso, a alteração da morfologia celular não é relevante porque todos os ensaios são feitos a partir do plasma. Todas as determinações desta secção são feitas pelo SYSMEX CA-1500, à exceção da quantificação do D-Dímero que é feita no ARCHITECT c8000.

### **3.2.5.1. Tempos de coagulação**

Os tempos de coagulação são determinados por coagulometria ótica. Nesta técnica, à amostra (plasma obtido com citrato de sódio 1:9) é adicionado um reagente (o reagente adicionado determina a fase da coagulação que estamos a analisar). A mistura é exposta a um feixe luminoso com comprimento de onda de 660 nm. O processo de coagulação, mais propriamente a conversão do fibrinogénio em fibrina, é determinado pela turvação da suspensão que é detetada através da alteração da dispersão da luz incidente. A luz dispersa é recebida por um fotodíodo, que converte a luz em sinais eléctricos. Estes sinais eléctricos são analisados pelo equipamento e convertidos em tempo de coagulação.

#### **3.2.5.1.1. Tempo de Protrombina (TP)**

O TP é a análise mais pedida para monitorizar o tratamento com anticoagulantes orais. Cada laboratório utilizava os seus reagentes, nomeadamente tromboplastinas diferentes das de outros laboratórios. Assim, surgiu a necessidade de uniformizar os resultados deste parâmetro, a fim de permitir a comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios.

Para determinar o TP são adicionados sequencialmente tromboplastina de origem humana (funciona como fator tecidual, promovendo a via extrínseca da coagulação descrita na Secção 3.1.2) e cálcio à amostra e o tempo de coagulação é determinado pelo método descrito na Secção 3.2.5.1.

Uma vez determinados os tempos de coagulação, podem ser feitos outros cálculos, nomeadamente a razão de TP e o cálculo do *International Normalized Ratio* (INR), que dão informações mais facilmente interpretáveis pelo clínico. A razão TP é dada pelo quociente entre o tempo de coagulação da amostra a analisar e um valor de TP normal. Esta razão é dada em percentagem e para indivíduos saudáveis é próxima de 100%. O INR é calculado

elevando a razão de TP ao *International Sensitivity Index* (ISI). O ISI é um fator de correção estabelecido pelas casas comerciais para cada lote de reagente, a fim de uniformizar resultados.(3) Tanto o valor de TP normal como o ISI têm de ser atualizados aquando da mudança de lote, caso contrário os cálculos feitos pelo aparelho não corresponderão à realidade.

#### **3.2.5.1.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (APTT)**

O APTT permite avaliar a fase intrínseca da cascata de coagulação (Figura 2). Como tal, é independente do fator tecidual mas precisa de um ativador da coagulação externo.

Ao plasma do utente são adicionados uma quantidade otimizada de fosfolípidos e um ativador superficial que provoca a ativação dos fatores da via intrínseca. O processo de coagulação é desencadeado pela adição de cálcio. Determina-se o tempo de coagulação por coagulometria ótica. O resultado é dado em segundos.

#### **3.2.5.1.3. Tempo de Trombina (TT)**

O TT permite-nos avaliar a fase comum da cascata de coagulação (Figura 2). No entanto, não é um parâmetro muito solicitado, uma vez que apenas permite avaliar o tempo de conversão do fibrinogénio a fibrina. Assim, é mais comum ser requerida a quantificação do fibrinogénio, porque fornece uma informação mais completa.

O tempo de trombina é determinado através da adição do plasma do utente a uma solução de protrombina: o fibrinogénio presente na amostra vai ser convertido a fibrina e forma-se o coágulo, sendo o tempo de trombina inversamente proporcional à quantidade de fibrinogénio presente na amostra.

#### **3.2.5.2. Fibrinogénio**

O fibrinogénio é um fator coagulação essencial à formação do coágulo, sendo o último interveniente na cascata de coagulação (Figura 2). Deste modo, a quantificação do fibrinogénio permite-nos avaliar a eficácia da fase comum da cascata de coagulação.

A quantificação do fibrinogénio é feita pelo método de *Clauss* modificado. É promovido o processo de coagulação adicionando um excesso de trombina ao plasma do doente. Neste caso, o tempo de coagulação depende largamente do teor de fibrinogénio da amostra.

O fibrinogénio é um importante marcador trombótico, ou seja, a um aumento do fibrinogénio está associado um maior risco de formação de coágulos.

Além da quantificação do fibrinogénio, no Laboratório S. José também se quantifica os D-Dímeros. O D-Dímero é um antigénio contido nos produtos de degradação do coágulo insolúvel, não estando presente na molécula de fibrinogénio nem no complexo de fibrina. O doseamento é realizado a partir da mesma amostra (plasma obtido por citrato na proporção 1:9). É quantificado por imunoturbidimetria no ARCHITECT c8000.

### **3.2.6. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária**

A velocidade de sedimentação eritrocitária define-se como a velocidade a que os eritrócitos sedimentam no período de uma hora. É um parâmetro pouco específico, uma vez que é alterado em diversas patologias, nomeadamente gripes, anemias, inflamações ou doenças malignas. Geralmente, é pedida em conjunto com outras análises, como hemograma e/ou proteína C reativa (marcador de inflamação), e funciona como análise complementar ao diagnóstico, uma vez que só por si não permite tirar conclusões.

Para esta análise, é utilizado sangue total obtido com o anticoagulante citrato de sódio na proporção 1:4. O equipamento utilizado para determinar a velocidade de sedimentação é o LENA. O LENA utiliza o método de *Westergren* modificado, no qual são utilizados tubos específicos para ao equipamento.(5) O processo demora aproximadamente 20 minutos e o resultado é dado em milímetros, determinados por um sensor.

## **3.3. Casos Clínicos**

De forma a ilustrar melhor os conceitos de hematologia, serão apresentados nesta secção alguns casos clínicos observados no laboratório ao longo do estágio. Para cada caso, serão apresentados os resultados obtidos para os diferentes parâmetros, bem como a interpretação dos mesmos através de uma breve discussão.

### **3.3.1. Caso Clínico I**

Uma utente de 54 anos dirigiu-se ao laboratório para realizar as análises que o seu médico de família tinha prescrito. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 6.

**Tabela 6: Resultados laboratoriais do caso clínico I.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Unidades</b>	<b>Intervalo de referência</b>
Eritrócitos	<b>3,590</b>	$\times 10^6/\mu\text{L}$	3,900 - 5,200
Hemoglobina	<b>8,8</b>	g/L	12,1 - 15,1
Hematócrito	<b>28,1</b>	%	36,1 - 44,3
VGM	<b>78,3</b>	fL	80 - 95
HGM	<b>24,5</b>	pg	27 - 33
CHGM	<b>31,3</b>	g/dL	32 - 36
RDW	15,1	%	11,8 - 15,6
Leucócitos	4,96	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4 - 10,5
Plaquetas	401	$\times 10^9/\text{L}$	130 - 425
Ferritina	<b>18,1</b>	ng/mL	20 - 300
Ferro	<b>14</b>	$\mu\text{g}/\text{dL}$	25 - 156
Capacidade total de fixação do ferro	<b>200</b>	$\mu\text{g}/\text{dL}$	250 - 425

Avaliando os resultados obtidos, podemos concluir que a utente tem uma anemia, uma vez que as quantidades de eritrócitos e de hemoglobina está abaixo dos valores normais. Os restantes parâmetros associados aos eritrócitos (hematócrito, VGM, HGM E CHGM) estão diminuídos por consequência do baixo número de eritrócitos e hemoglobina, uma vez que são obtidos por cálculo utilizando esses valores. O RDW encontra-se dentro dos valores normais, o que é explicado pelo facto de ser independente dos outros parâmetros. As restantes células sanguíneas (leucócitos e plaquetas) estão dentro dos valores considerados normais.

Em situações como esta é importante perceber a etiologia da anemia, para assim poder tomar as devidas precauções e iniciar um tratamento adequado. Para tal, foi feita a quantificação do ferro sérico bem como o doseamento da ferritina (proteína que armazena ferro). Verifica-se que ambos os resultados se encontram abaixo dos níveis de referência, o que sugere uma anemia por deficiência de ferro. O baixo valor da capacidade de fixação do ferro corrobora a suspeita de anemia por falta de ferro.

O ferro é essencial à produção adequada de eritrócitos: este não faz parte do centro ativo da hemoglobina, proteína maioritária dos eritrócitos, responsável pelo transporte de oxigénio. A diminuição do ferro pode estar relacionada com um défice dietético ou com uma perda de sangue oculta (através de uma úlcera gástrica ou hemorragias intestinais, por exemplo). Se este défice for devido à absorção diminuída, a anemia é facilmente resolvida pela administração oral de ferro (durante um período mínimo de 6 meses: 2 meses após o tratamento já são notáveis as melhorias, no entanto a terapia tem de ser continuada para

repor as reservas). Se a situação não for resolvida com esta terapia, significa que a diminuição do ferro sérico pode estar relacionada com uma perda de sangue, que deve ser identificada.

### 3.3.2. Caso Clínico 2

Uma utente de 67 anos dirigiu-se ao laboratório para fazer análises, apresentando um aspeto pálido e queixas de fadiga. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 7: Resultados laboratoriais do caso clínico 2.**

Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
Eritrócitos	<b>3,700</b>	$\times 10^6/\mu\text{L}$	3,900 - 5,200
Hemoglobina	<b>5,8</b>	g/L	12,1 - 15,1
VGM	<b>112</b>	fL	80 - 95
Ferritina	<b>30</b>	ng/mL	20 - 300
Ferro	<b>80</b>	$\mu\text{g/dL}$	25 - 156
Capacidade total de fixação do ferro	262	$\mu\text{g/dL}$	250 - 425
Vitamina B12	<b>40</b>	pg/ml	200 - 1000
Folato	4,5	ng/mL	>3,5

Os valores de hemoglobina e eritrócitos abaixo dos valores de referência evidenciam a presença de uma anemia severa. O valor aumentado do VGM pode ajudar a esclarecer a etiologia da anemia, sugerindo uma anemia megaloblástica. No entanto, este parâmetro é afetado por diferentes variáveis (nomeadamente o consumo de álcool), pelo que são necessários outras determinações que ajudam no diagnóstico diferencial.

Foram doseados o ferro, a ferritina, a vitamina B12 e o folato no soro do doente. Foi também determinada a capacidade total de fixação do ferro. De todos estes parâmetros, apenas a vitamina B12 estava alterada: encontra-se abaixo dos valores de referência, corroborando a hipótese de uma anemia megaloblástica.

Mais uma vez, tal como na anemia por falta de ferro, é importante determinar a etiologia do défice de vitamina B12. Esta diminuição pode ocorrer por ingestão insuficiente ou por inibição da absorção desta vitamina. Importa salientar que a absorção da vitamina B12 ocorre a nível do íleo intestinal por combinação com o fator intrínseco, glicoproteína produzida pelas células parietais gástricas. Em situações de desequilíbrio do sistema imunitário, podem ser produzidos anticorpos anti-fator intrínseco e/ou anti-células parietais gástricas. Foram doseados estes dois tipos de anticorpos, tendo-se obtido um resultado positivo. Conclui-se assim que este é um caso de anemia perniciosa (etiologia autoimune).

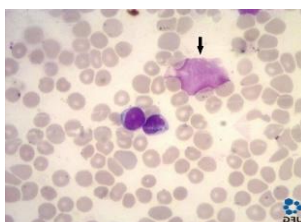
### 3.3.3. Caso Clínico 3

Uma utente de 68 anos veio ao laboratório fazer análises. Parte do hemograma é apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8: Resultados Laboratoriais do caso clínico 3.**

Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
Leucócitos	<b>140</b>	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4 - 10,5
Neutrófilos	<b>4 (5,6)</b>	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	40 - 74
Eosinófilos	0	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0 - 7
Basófilos	0	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0 - 1,5
Monócitos	0	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	3,4 - 9,0
Linfócitos	<b>96 (134,4)</b>	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	19 - 48

Perante estes resultados, corou-se um ESP e fez-se uma contagem diferencial de leucócitos ao microscópio. Era evidente um aumento de leucócitos, observando-se um elevado número de sombras de Grumprecht. A contagem ótica obtida foi semelhante à do aparelho, havendo uma ligeira redução do número de linfócitos contados. Esta diferença pode ser explicada pela elevada quantidade de sombras de Grumprecht: como o aparelho faz a contagem através do tamanho e complexidade das células, pode ter contabilizado estes fragmentos celulares como linfócitos.



**Figura 4:** Sombras de Grumprecht.

**Fonte:** <https://hematologia.farmacacia.ufg.br/p/7144-manchas-de-grumprecht>

Uma linfocitose tão acentuada é sugestiva de uma leucemia Linfocítica crónica (LLC). A presença das sombras de Grumprecht (Figura 4) no ESP corrobora a suspeita de LLC. Nesta doença, há uma proliferação exagerada de linfócitos, que vêm para a corrente sanguínea. No ESP, como o número de linfócitos é elevado, observaram-se muitas células esmagadas (sombras de Grumprecht). Sugeriu-se ao doente uma consulta de hematologia.



## 4. Imunologia

### 4.1. Introdução teórica

#### 4.1.1. Sistema imunitário

O sistema imunitário é visto como o “exército” biológico para o combate de agentes estranhos ao organismo. No entanto, não é apenas esta a sua função: este sistema tem também um importante papel na eliminação de células tumorais e células com afinidade para o próprio. (6)

Podemos dividir a resposta imune contra agentes estranhos ao organismo em três linhas de defesa. A primeira linha de defesa é constituída pelas barreiras físicas como a pele, mucosas, secreções (urina, suor e suco gástrico) e células ciliadas (no aparelho respiratório, o movimento dos cílios juntamente com o muco, ajudam a remover os agentes patogénicos). A segunda linha de defesa corresponde à Imunidade Inata. Este tipo de imunidade é composta por células e substâncias químicas localizadas nos locais mais comuns de invasão microbianas que controlam o crescimento e disseminação de agentes patogénicos, inespecificamente. Os fagócitos, células *natural killer* (NK) e o sistema de complemento fazem parte desta linha de defesa. Por último, a terceira linha de defesa é acionada quando as outras barreiras não são capazes de impedir a invasão. Esta é designada por imunidade adquirida, capaz de reconhecer, destruir e criar memória para os invasores. A memória imunológica permite que, aquando de um segundo contacto com aquele agente patogénico, a resposta imune seja mais rápida e eficaz, recorrendo a células previamente sensibilizadas para este agente.(7)

Uma resposta de imunidade adquirida envolve duas fases: uma resposta específica a um dado antigénio e uma fase de amplificação não específica dessa resposta. A resposta adquirida pode ainda ser dividida em duas partes: resposta humoral (mediada por anticorpos) e resposta celular (mediada por células). As principais células efetoras responsáveis por todo o processo são os linfócitos, estando estes divididos em linfócitos B e T, como visto anteriormente. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos. Os linfócitos T são divididos em células efetoras (T citotóxicos) e células moduladoras (T auxiliares), cuja ação é dependente do estímulo da célula apresentadora de antígenos (APCs: células dendríticas, linfócitos B e fagócitos).(7)



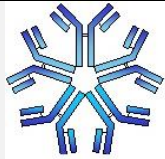
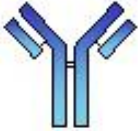
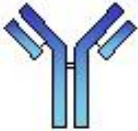
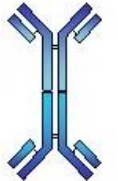
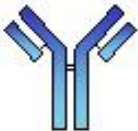
Qualquer tipo de resposta adquirida é iniciada com a apresentação do antígeno através do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Existem dois tipos de MHC: MHC I, presente na maioria das células nucleadas do organismo, e MHC II, presente nas células do sistema imunitário (APCs). Este complexo possui seletividade na apresentação de antígenos: MHC I ativa linfócitos T citotóxicos, desencadeando uma resposta celular; MHC II ativa linfócitos T auxiliares que através de um processo encadeado iniciam a resposta humoral.(7)

A resposta celular é desencadeada pela apresentação de antígenos em contexto de MHC I. Como referido anteriormente, esta molécula é reconhecida especificamente pelos linfócitos T citotóxicos, que produzem enzimas que desencadeiam a lise celular. Este tipo de resposta é muito comum em infecções virais e na destruição de células tumorais ou células com reatividade para o próprio.(6)

A resposta humoral é iniciada através da modificação e apresentação do antígeno pelas APCs. O antígeno é apresentado a linfócitos T auxiliares em contexto de MHC II, ativando-os. Por sua vez, o linfócito T auxiliar ativa o linfócito B (através da libertação de citocinas) que se diferencia em plasmócito e inicia a produção de anticorpos (ou imunoglobulinas), maioritariamente IgM. A produção de anticorpos é modulada pelo agente patogénico e pelo local onde decorre a infeção, havendo uma alteração de classe de anticorpos de acordo com esses parâmetros (Tabela 9). Os anticorpos ligam-se ao agente patogénico, facilitando a sua eliminação pelos fagócitos (neutrófilos e macrófagos) ou pelo sistema do complemento (ativação de vários fatores que culmina no recrutamento de fagócitos e eliminação dos agentes patogénicos).(6) Este tipo de respostas está envolvido na resolução de infeções por bactérias, parasitas e alguns vírus.

**Tabela 9: Características das diferentes classes de anticorpos.**

Fonte: <http://www.cenapro.com.br/noticias-detalhes.asp?codigo=441>

Imunoglobulina		Características
IgM		Primeira imunoglobulina a ser produzida – respostas primárias. Envolvida na neutralização de organismos externos. Cinco locais de ligação – facilita a neutralização. Baixa afinidade para o antígeno.
IgG		Imunoglobulina monomérica de menor tamanho – penetra facilmente nos tecidos. Resposta secundária: produzida em maior quantidade e tem maior tempo de vida. Liga-se ao antígeno com maior afinidade – maior eficiência na eliminação de antígenos. Única que atravessa a placenta, conferindo imunidade ao feto.
IgD		Monomérico. Presente à superfície de linfócitos B maduros.
IgA		Maioritariamente presente nas mucosas (ocular, intestinal e urinária). Dímero acompanhado de uma proteína que inibe a sua degradação enzimática.
IgE		Monomérica. Capacidade de se ligar a mastócitos e basófilos, desencadeando a sua desgranulação (libertação de histamina e outras substâncias inflamatórias). Associada a reações alérgicas.

#### 4.1.2. Deteção de infecção através da avaliação serológica

Em algumas infecções (bacterianas, virais ou parasitárias) é difícil isolar e identificar o agente patogénico, quer devido à sua localização (por exemplo, em casos de hepatite viral, nos quais o órgão afetado é o fígado, onde se torna difícil recolher uma amostra) quer devido à quantidade presente (por vezes, a quantidade de agente patogénico necessária à infecção é muito baixa, sendo difícil de detetar). As técnicas de diagnóstico serológico, no qual são detetados antígenos ou anticorpos na corrente sanguínea, constituem uma importante ferramenta na identificação de agentes patogénicos. Este tipo de técnica é baseada na resposta do sistema imunitário ao agente patogénico, sendo independente da quantidade de patogénico presente, uma resposta que a resposta é sempre amplificada.

Além da detecção da infecção, através da quantificação de anticorpos IgM e IgG é possível avaliar a cronicidade da infecção, uma vez que são produzidos em respostas primárias e secundárias, respetivamente.

#### **4.1.2.1 Vírus**

Grande parte das infecções virais são subclínicas: ocorre uma linfocitose e a infecção é resolvida. No entanto, em certos casos, é acompanhada de sintomas, sendo importante identificar o agente patogénico. Além disso, há situações em que é importante verificar o estado de imunidade relativo a um determinado vírus, ou seja, a presença de IgG capaz de neutralizar o agente patogénico aquando de uma nova infecção. Esta verificação do estado de imunidade é especialmente importante em grávidas (no primeiro trimestre de gravidez), uma vez que uma primoinfecção (infecção primária) por determinados vírus/parasitas pode ter consequências nefastas para o feto, como será descrito pormenorizadamente nas secções que se seguem.

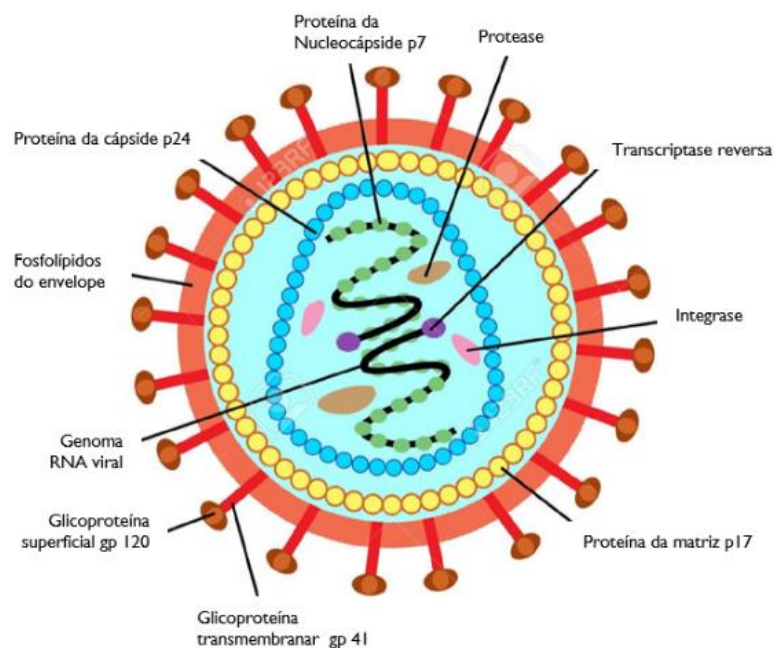
##### **4.1.2.1.1. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**

Apesar de todos os avanços ao nível da detecção e tratamento, a infecção por HIV é ainda um importante problema de saúde pública.

O HIV é um vírus envelopado que infecta linfócitos T auxiliares (T CD4). É um vírus de RNA que possui uma transcriptase reversa, capaz de sintetizar DNA a partir do RNA viral. A utilização de uma enzima viral neste processo, aumenta a probabilidade de mutações, que se fazem sentir ao nível das proteínas do envelope e são responsáveis pela fuga do vírus ao sistema imunitário. Um dos grandes problemas para o combate desta infecção é a capacidade do vírus incorporar o seu DNA no DNA da célula infetada. Após a integração do DNA viral, a célula começa a produzir as proteínas virais involuntariamente, aumentando a replicação viral e transmitindo a infecção a novas células.(6) Outro problema associado a esta integração do genoma, reside na latência do vírus em células de memória, que permanecem estáveis a longo prazo, retomando a produção viral quando ocorre nova ativação.(8)

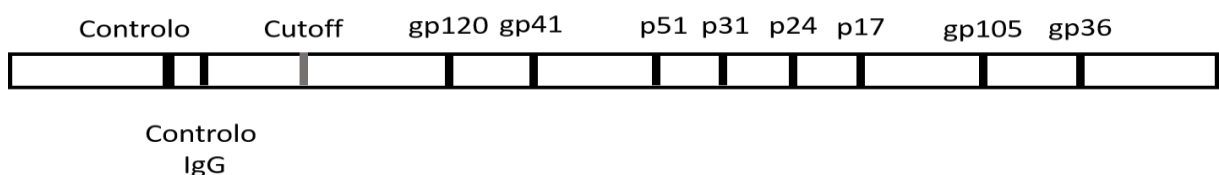
Após o contacto com o HIV (via sexual, parenteral ou vertical), existe uma fase aguda ou primária, que dura 2-6 semanas. Nesta fase, o indivíduo tem sintomas semelhantes a uma gripe e a taxa de replicação viral é muito elevada. Inicia-se a resposta imune, havendo a produção de anticorpos contra as proteínas do envelope (GP 210 e GP41) e da cápside (p24), representadas esquematicamente na Figura 5. Segue-se a fase de latência clínica ou

assintomática. Esta fase é caracterizada por uma diminuição gradual de linfócitos T CD4. Apesar da ausência de manifestações clínicas, não ocorre latência viral, mantendo-se replicação viral ativa. A duração desta fase é variável, pois depende da carga viral e da diminuição dos linfócitos T CD4. A última fase da infecção por este vírus é designada por Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Esta fase resulta da perda em número e eficácia de linfócitos T CD4, que se traduz numa imunodeficiência clínica. Geralmente, desenvolve-se após 8 a 10 anos de um período assintomático, na ausência de tratamento. A SIDA é caracterizada pela presença de anticorpos anti-HIV, contagem de linfócitos T CD4 inferior a 200 linfócitos/ $\mu$ L de sangue e a presença de infeções bacterianas severas (infeções oportunistas).(8)



**Figura 5:** Esquema do HIV. Adaptado. Fonte: [http://pt.123rf.com/photo\\_18649988\\_structure-of-human-immunodeficiency-virus-hiv-illustration-for-basic-medical-education-for-clinics.html](http://pt.123rf.com/photo_18649988_structure-of-human-immunodeficiency-virus-hiv-illustration-for-basic-medical-education-for-clinics.html)

No Laboratório S. José, faz-se uma análise automática para deteção, em simultâneo, da proteína da cápside (p24) e de anticorpos para o HIV. Quando solicitado, é feito um teste confirmatório por *immunoblot* (Figura 6). Este teste permite identificar se o vírus presente é o HIV-1 ou HIV-2. Faz-se igualmente a pesquisa e/ou quantificação de carga viral para o HIV-1 e HIV-2 por métodos moleculares.



**Figura 6:** Esquema da tira de *immunoblot* confirmatório para o HIV.

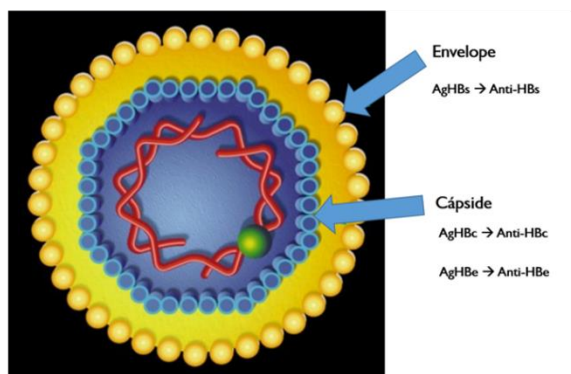
#### 4.1.2.1.2. Hepatites Virais

Existem 5 tipos de hepatites virais, sendo designadas pelas letras de A a E. Hepatite, como o próprio nome indica, diz respeito a uma infeção do fígado: todos estes vírus precisam de entrar no hepatócito para se replicarem.

Os vírus das hepatites A e E (VHA e VHE, respetivamente) são transmitidos por via fecal-oral. A entrada do vírus ocorre pelo trato gastrointestinal, sendo absorvido ao nível do intestino para a circulação entero-hepática. No fígado, o vírus inicia a sua replicação. A replicação viral está geralmente associada a um aumento das transaminases (principalmente da alanina amino-transferase - ALT). Existe um período de virémia transitória, que é responsável pela indução da resposta imune, e consequente produção de anticorpos. Estes tipos de hepatites raramente evoluem para doença crónica. Em casos assintomáticos (sem icterícia, descoloramento das fezes, urina escura), esta infeção é detetada pela permanência dos anticorpos IgG na corrente sanguínea.(8)

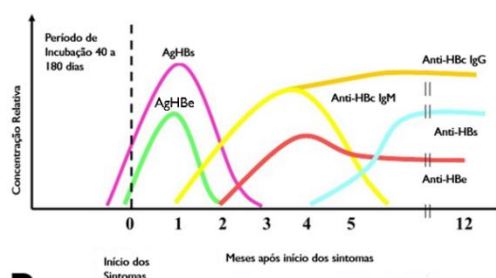
O vírus da hepatite C (VHC) é, geralmente, transmitido por via parenteral. Possui uma fase aguda, na qual podem ou não ocorrer sintomas hepáticos. A infeção aguda pode ser resolvida ou evoluir para uma fase crónica. A fase crónica desenvolve-se de forma lenta. Numa primeira fase, ocorre insuficiência hepática que pode evoluir para carcinoma hepatocelular, levando à morte.(8)

O vírus da hepatite B (VHB) é, normalmente, transmitido por via sexual ou parenteral. Na maioria dos casos, a infeção fica resolvida após uma fase aguda; raramente evolui para a fase crónica. O prognóstico piora quando se dá a co-infeção com outros vírus (HIV ou vírus da hepatite D) ou na presença de doença hepática pré-existente. A estrutura do vírus (Figura 7A) faz com que o diagnóstico serológico seja muito complexo (Figura 7B). O antígeno HBs (AgHBs) faz parte do envelope do vírus; o antígeno HBc (AgHBc) pertence à cápside; o antígeno HBe (AgHBe) apenas é detetado quando a replicação viral se encontra ativa. Na presença destes antígenos, o sistema imunitário produz anticorpos anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe, respetivamente. No entanto, o antígeno e o anticorpo correspondente não coexistem na corrente sanguínea, permitindo que a deteção de antígenos e anticorpos no soro seja uma importante ferramenta na identificação da fase da infeção (Tabela 10).(8)



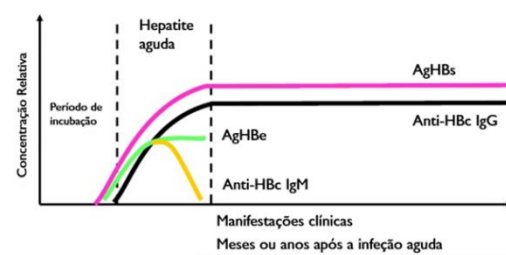
A

### Perfil Serológico da Hepatite B aguda



B

### Perfil Serológico da Hepatite B crônica



**Figura 7:** A) Esquema do Vírus da Hepatite B. B) Perfil serológico de uma Hepatite B aguda (em cima) e de uma hepatite B crônica (em baixo).

Fontes: [http://images.slideplayer.com.br/1/68457/slides/slide\\_7.jpg](http://images.slideplayer.com.br/1/68457/slides/slide_7.jpg) e <http://pt.slideshare.net/tvf/tv-das-hepatites>.

Estado	Vírus infeccioso	AgHBs	AgHBe	Anti-HBs	Anti-HBe	Anti-HBc (IgM)	Anti-HBc (IgG)
<b>Hepatite B aguda</b>	+	+	+	-	-	+	+
<b>Hepatite B crônica</b>	+	+	+/-	-	+/-	+/-	+++
<b>Infeção passada recente</b>	-	-	-	++	+/-	-	++
<b>Infeção passada distante</b>	-	-	-	+/-	-	-	+/-
<b>Vacinação recente</b>	-	-	-	++	-	-	-

**Tabela 10:** Relação entre o estado da Hepatite B e os dados laboratoriais.

O vírus da hepatite D (VHD) é transmitido por via parenteral. É um vírus defetivo, isto é, só é capaz de se replicar na presença de VHB. Assim, pode ocorrer uma co-infecção (infecção pelos dois vírus em simultâneo) ou uma superinfecção (infecção pelo vírus da hepatite D após uma infecção por VHB). As duas situações têm prognósticos diferentes: na primeira situação,

ocorre uma infeção pelo VHB muito mais severa; no segundo caso, a infeção pelo VHD aumenta o risco da hepatite B se tornar crónica.(8)

No Laboratório S. José, são determinados os anticorpos IgM e IgG para avaliar a presença de VHA (HAVAB IgM e HAVAB IgG, respetivamente). Para o VHC são determinados os anticorpos anti-HCV (IgG e IgM). Por fim, para avaliar a presença de VHB são quantificados AgHBs, AgHBe e AgHBc e os respetivos anticorpos anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc. Todas estas determinações são feitas recorrendo aos equipamentos automáticos. Faz-se igualmente a pesquisa e/ou quantificação de carga viral para o vírus da Hepatite B por métodos moleculares.

#### **4.1.2.1.3. Citomegalovírus (CMV)**

O CMV é um vírus ubíquo, cujas infeções são geralmente assintomáticas e benignas.(9) Este vírus infecta monócitos e linfócitos, nos quais pode ficar latente e ser reativado. Geralmente é eliminado nas secreções, nomeadamente saliva e urina. Desta forma, cerca de 77% dos adultos já tiveram contacto com o vírus, mostrando que a infeção é altamente prevalente, principalmente nos primeiros anos de vida.(9)

A avaliação do estado de imunidade relativamente ao CMV é especialmente importante em grávidas, uma vez que uma primoinfeção por este vírus durante a gravidez pode provocar a doença das inclusões citomegálicas (Em Portugal estima-se que a prevalência da infeção congénita por CMV seja de 1,05%).(10) Nesta doença há envolvimento de múltiplos órgãos: hepatoesplenomegalia, icterícia, microcefalia, calcificações intracranianas, petéquias ou púrpura.(10) Em casos de ausência de imunidade, devem ser tomadas as devidas precauções para prevenir a infeção por CMV durante a gravidez.

No Laboratório S. José são determinados os anticorpos IgM e IgG para o CMV nos equipamentos automáticos.

#### **4.1.2.1.4. Rubéola**

A infeção pelo vírus da rubéola é, geralmente, benigna. Este vírus é transmitido pelas secreções respiratórias, como saliva, sendo normalmente contraída em crianças e jovens adultos. Relativamente aos sintomas, o quadro pode ser bastante variável, tornando difícil o diagnóstico meramente clínico.

Quando a infeção primária ocorre durante a gravidez, principalmente no primeiro trimestre, pode ter consequências graves para o feto. Estas consequências vão desde o aborto a malformações do feto, como alterações oculares, cardíacas ou até do sistema nervoso central.(8) Desta forma, a inclusão da determinação dos anticorpos IgG e IgM para a rubéola torna-se indispensável no diagnóstico pré-natal.

No Laboratório S. José, são determinados os anticorpos IgG e IgM nos equipamentos automáticos, bem como a pesquisa e/ou quantificação do vírus da rubéola por métodos moleculares.

#### **4.1.2.1.5. Vírus Epstein Barr (EBV)**

O EBV é conhecido por provocar a “doença do beijinho”. É uma infeção típica da infância, uma vez que o vírus é transmitido por contacto íntimo de secreções orais. Assim sendo, 90% dos adultos já teve contacto com o vírus. Durante a infância, a infeção é normalmente autolimitada e assintomática, havendo uma linfocitose silenciosa. Quando a infeção ocorre na adolescência ou na idade adulta, pode ter complicações, sendo a mais comum a mononucleose infecciosa. Nestas situações, ocorre linfocitose acompanhada de sintomas físicos (como mal estar, fadiga e febre).(8)

No Laboratório S. José é feita a determinação dos anticorpos IgM e IgG para o EBV no equipamento automático e dos anticorpos anti-antígenos nucleares por ELISA (EBNA IgG). Além disso, pode ainda ser determinada a presença de anticorpos heterófilos (característicos da mononucleose infecciosa) por imunocromatografia.

#### **4.1.2.1.6. Vírus Linfotrófico da Célula T (HTLV)**

O HTLV é um retrovírus que infeta linfócitos T auxiliares ativados. Sendo um retrovírus, produz DNA com as suas enzimas virais e integra-o no genoma dos linfócitos que infeta. Estes linfócitos proliferam de forma exagerada, desenvolvendo leucemias.

O HTLV pode ser transmitido por via parenteral, sexual ou vertical (principalmente durante a amamentação). Esta última esclarece o facto da pesquisa de HTLV ser incluída no diagnóstico pré-natal: permite o controlo da transmissão do vírus ao recém-nascido através da amamentação.(11)

No Laboratório S. José é feita a deteção de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2, não permitindo a distinção entre os dois tipos de vírus.



#### **4.1.2.1.7. Herpes Simplex (HSV)**

O HSV é um vírus que infecta células epiteliais e estabelece latência nos gânglios sensitivos neurotrópicos. O local da infecção depende do tipo de vírus: HSV-1 é responsável pelas infecções faciais e HSV-2 é responsável por infecções genitais. A infecção primária deste vírus é geralmente assintomática, ocorrendo reativações quando o sistema imunitário está comprometido ou em situações de *stress*. A reativação do vírus manifesta-se sob a forma de vesículas ulcerativas.

Além da observação das lesões, o diagnóstico pode ser feito por quantificação dos anticorpos IgM e IgG para cada um dos tipos de HSV. Importa ainda salientar que os anticorpos IgM se encontram aumentados mesmo nas reativações do vírus. No Laboratório S. José, os anticorpos IgM e IgG para HSV-1 e HSV-2 são quantificados por ELISA.

#### **4.1.2.1.8. Vírus Influenza**

O vírus influenza é responsável pela gripe. Existem três tipos: A, B e C, sendo mais agressivo e mais comum o tipo A. É um vírus com genoma de RNA fragmentado e, por isso, geneticamente instável. Devido às inúmeras mutações que advém da ação das enzimas virais (sem capacidade de corrigir os seus erros), ocorrem alterações ao nível das proteínas de superfície do vírus (Hemaglutinina e Neuraminidase) que levam ao aparecimento de novas estirpes, capazes de escapar ao sistema imunitário.

Como existe uma grande variabilidade viral pelas razões já referidas, torna-se difícil fazer um diagnóstico laboratorial, sendo este normalmente feito clinicamente (os sintomas resultam da lesão de células epiteliais do trato respiratório). Quando é necessário um diagnóstico laboratorial, é pouco recomendada a determinação de anticorpos para o vírus: numa infecção por influenza os anticorpos podem não ser produzidos, ou, por outro lado, podem estar presentes sem haver infecção. Assim, são geralmente escolhidos métodos diretos para deteção do vírus. No Laboratório S. José, o diagnóstico dos vírus Influenza tipo A (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) e A (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) é feito por imunocromatografia a partir de uma zaragatoa nasal. Faz-se igualmente a pesquisa e/ou quantificação de vírus Influenza por métodos moleculares.

#### **4.1.2.2. Bactérias**

As doenças infecciosas, incluindo infeções bacterianas e parasitárias, estão entre as causas mais comuns de morte na Europa no ano de 2014.(12) Assim, é importante uma identificação rápida e eficiente da bactéria envolvida na infeção. Para identificação destes microrganismos não é frequente utilizar o diagnóstico serológico: geralmente são feitas culturas em placa que, posteriormente, são identificadas recorrendo a provas bioquímicas e meios diferenciais. Recorre-se ao diagnóstico serológico para confirmação (testes de aglutinação em lâmina) ou quando a bactéria suspeita tem necessidades especiais e/ou não prolifera nos meios de cultura convencionais (nomeadamente bactérias intracelulares).

A primeira linha de defesa contra bactérias é representada pelos fagócitos (neutrófilos e macrófagos). No entanto, quando a ação destas células não é suficiente para controlar a infeção, é desencadeada uma resposta humoral. Os anticorpos resultantes desta resposta são importantes no processo de opsonização: ligam-se à superfície da bactéria, facilitando a fagocitose. Por outro lado, os anticorpos intervêm na ativação do sistema de complemento.

No Laboratório S. José, o diagnóstico serológico é feito para *Treponema pallidum* e para *Chlamydia trachomatis*. Os ensaios utilizados para cada uma das bactérias estão apresentados nas secções que se seguem.

##### **4.1.2.2.1. *Treponema pallidum***

*Treponema pallidum* é o agente etiológico da sífilis, doença de transmissão sexual e vertical. As manifestações clínicas da sífilis são polimorfas e incluem úlceras genitais, erupções cutâneas, linfadenopatias, lesão cardiovascular e neurológica.(13) A deteção desta infeção deve ser incluída no diagnóstico pré-natal, uma vez que quando ocorre a transmissão desta bactéria ao feto durante a gravidez ou aquando do nascimento, esta provoca lesões graves no recém-nascido, lesões estas que provocam morbilidade significativa, podendo levar à morte.

*Treponema pallidum* é uma espiroqueta que não cresce em meios de cultura. Desta forma, o diagnóstico tem de ser feito através de outras técnicas diretas (microscopia de fundo escuro, imunofluorescência ou deteção do genoma por PCR) ou indiretas (deteção de anticorpos). O diagnóstico serológico compreende dois tipos de testes: não treponémicos e treponémicos.

Nos testes não treponémicos utiliza-se um antigénio (cardiolipina, lecitina e colesterol) para a deteção de reaginas: anticorpos produzidos em situações de infeção por *Treponema pallidum*. Para esta determinação podemos utilizar dois tipos de testes: VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) e RPR (*Rapid Plasma Reagin*). A VDRL permite uma avaliação qualitativa e quantitativa das reaginas. O RPR possui o antigénio ligado a partículas de carvão, permitindo uma análise qualitativa e semi-quantitativa à vista desarmada. A desvantagem destes testes é que, além de só serem positivos 2-3 semanas após a infeção, dão muitos resultados falsamente positivos, devido ao facto de as reaginas não serem específicas da infeção por *Treponema pallidum* (também são produzidas em doenças autoimunes, em grávidas, em idosos e em outros tipos de infeção pelos vírus HIV e VHC). Desta forma, todos os resultados positivos devem ser confirmados por testes treponémicos.(14)

Os testes treponémicos permitem identificar e quantificar anticorpos específicos para o *Treponema pallidum*. Podem ser utilizadas técnicas de imunofluorescência, deteção de IgM e IGG por ELISA e TPHA (*Treponema Pallidum Hemagglutination*). No TPHA utilizam-se eritrócitos sensibilizados com *Treponema pallidum*. Quando ao reagente é adicionado o soro do doente, os anticorpos contra a bactéria ligam-se aos eritrócitos, desencadeando hemaglutinação visível. É um teste fiável e fácil de executar.(14)

No Laboratório S. José, são feitos testes de RPR, deteção de anticorpos para *Treponema pallidum* (IgG e IgM) no equipamento automático e por TPHA. Podem ainda ser quantificados os anticorpos IgM e IgG separadamente por ELISA. Faz-se igualmente a pesquisa e/ou quantificação de *Treponema pallidum* por métodos moleculares.

#### **4.1.2.2.2. *Chlamydia trachomatis***

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória responsável pela clamidiose genital, uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. Sendo intracelular, não cresce em meios de cultura: cresce em células, tendo especificidade para as células epiteliais. A infeção é geralmente assintomática em mulheres; nos homens provoca disúria e piúria, acompanha de exsudato purulento. Como os sintomas não são específicos, a infeção tem de ser confirmada através de resultados laboratoriais.(14)

A deteção da presença de *Chlamydia trachomatis* durante a gravidez é importante: como esta bactéria tem a capacidade de infetar células epiteliais pode provocar conjuntivite ou pneumonia no recém-nascido.

O diagnóstico da clamidiose pode ser feito por imunofluorescência, PCR, culturas de células ou por deteção de IgM e IgG para *Chlamydia trachomatis*. No Laboratório S. José pesquisam-se os ácidos nucleicos da bactéria por métodos moleculares na urina e quantificam-se os anticorpos IgM e IgG por ELISA.

#### **4.1.2.3. Parasitas**

Atualmente, as infeções por parasitas são pouco comuns. Este facto deve-se aos cuidados de higiene da população, que diminuem a probabilidade de infeção, uma vez que a maioria dos parasitas encontrados em Portugal são transmitidos por via fecal-oral. No entanto, a toxoplasmose é infeção por parasitas mais frequente, sendo uma infeção assintomática na maioria dos casos.

##### **4.1.2.3.1. *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que infecta aves e alguns mamíferos. A prevalência é alterada de acordo com os hábitos culturais e sociais, escolha de gatos para animais domésticos e com fatores geográficos. Os gatos domésticos são considerados a principal fonte de infeção.

Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose é, geralmente, assintomática; a situação complica-se em pessoas com condições especiais, nomeadamente em grávidas. Um estudo da zona centro de Portugal revelou que, em média, 20-29% das mulheres em idade fértil possuem imunidade para a toxoplasmose.<sup>(15)</sup> As grávidas que nunca estiveram em contacto com esta zoonose têm de ter cuidados especiais durante a gravidez para evitar o contacto com o parasita. Uma primoinfeção por *Toxoplasma gondii* no 1º ou no 2º trimestre de gravidez pode desencadear a toxoplasmose congénita (caracterizada por alterações oculares e neurológicas do feto). Assim, a deteção de anticorpos IgM e IgG para o *Toxoplasma gondii* fazem parte do diagnóstico pré-natal feito no Laboratório S. José, bem como a determinação da avidéz e a pesquisa e/ou quantificação de *Toxoplasma gondii* por métodos moleculares. Os perfis serológicos possíveis são apresentados na Tabela II.

**Tabela 11: Perfis serológicos possíveis para *Toxoplasma gondii*.**

Resultado Serológico	Interpretação	Procedimento recomendado	Desfecho
IgG - IgM -	Ausência de imunidade e de infecção.	Vigilância serológica na gravidez.	Deteção da infecção, se ocorrer.
IgG - IgM +	Início de uma infecção ou IgM não específica.	Repetir a análise após 3 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>IgG-/IgM+ → IgM não específica.</li> <li>IgG+/IgM+ → Primoinfecção → DPN<sup>1</sup>.</li> </ul>
IgG + IgM -	Infeção antiga ou primoinfecção sem IgM.	Repetir a análise após 3 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>IgG estável e IgM - → Imunidade.</li> <li>IgG aumenta e IgM - → Primoinfecção sem IgM → Teste da avides.</li> </ul>
IgG + IgM +	Infeção relativamente recente.	Teste da Avides (capacidade de ligação ao antigénio).	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forte: infecção ocorreu há mais de 4 meses.</li> <li>Fraca/intermédia: infecção recente → DPN<sup>1</sup></li> </ul>

#### 4.1.3. Desequilíbrios do sistema imune

A autoimunidade (resposta imune contra o próprio) é uma condição normal num sistema imune: durante o processo de formação de células do sistema imunitário (linfócitos) estas podem desenvolver reatividade contra antígenos do próprio. No entanto, estas células são identificadas (quer ao nível da produção, quer ao nível do sangue periférico) e eliminadas pelo próprio sistema imunitário. (6) Contudo, podem ocorrer falhas nesta vigilância imunológica, que desencadeiem reações de hipersensibilidade. Hipersensibilidade é definida como uma resposta inapropriada a um antígeno do próprio ou antígenos não patogénicos.(7) Existem vários tipos de hipersensibilidade (Tabela 12) dependendo da via através da qual é ativado o sistema imunitário.

**Tabela 12: Tipos de Hipersensibilidade.**

Tipo de Hipersensibilidade		Mecanismo	Exemplos
Imediata	Tipo I	Sobreprodução de IgE que se liga a basófilos e eosinófilos. Processos inflamatórios severos.	Alergias
	Tipo II	Destruição celular mediada por IgG.	Anemia hemolítica autoimune.
	Tipo III	Lesão tecidular por depósito de imunocomplexos.	Lúpus Eritematoso

<sup>1</sup> DPN (Diagnóstico Pré-Natal): compreende amniocentese e ecografia para pesquisa de *Toxoplasma gondii* e lesões no feto, respetivamente.

			Sistémico. Glomerulonefrite.
Tardia	Tipo IV	Destruição celular mediada por linfócitos T auxiliares. Ativação de linfócitos T citotóxicos e macrófagos para destruição celular.	Tiroidite de Hashimoto.

#### **4.1.3.1. Alergias**

Como visto anteriormente, uma alergia é uma reação de hipersensibilidade tipo I. Este tipo de patologia ocorre em indivíduos atópicos (pessoas predispostas a produzir IgE contra antígenos ambientais). As alergias podem ser detetadas através do doseamento dos níveis de IgE (em indivíduos normais e sem infeções por parasitas, a IgE é das imunoglobulinas menos abundantes no soro). A causa da alergia é ainda desconhecida. No entanto, estudos indicam que há uma componente genética subjacente.(7)

Todo o processo é desencadeado por antígenos (proteínas ou glicoproteínas) da natureza/alimentos. São produzidas grandes quantidades de IgE, que se ligam a eosinófilos e basófilos. Quando ocorre um segundo contacto com aquele antígeno, os eosinófilos e basófilos sensibilizados com IgE são ativados e libertam as substâncias inflamatórias contidas nos seus grânulos (como histamina e heparina). Surge uma reação inflamatória que, dependendo do antígeno e via de entrada, pode ser local (equizema) ou sistémica (choque anafilático).(7)

#### **4.1.3.2. Doenças autoimunes**

Uma doença autoimune é uma condição na qual há lesão de um tecido devido a uma situação de reatividade para com o próprio.(16) Desta forma, para ocorrer este tipo de patologia, tem de haver autoimunidade e vulnerabilidade do tecido alvo, simultaneamente. A doença pode ser desencadeada por fatores ambientais, genéticos ou infeções (é comum manifestarem-se como sequelas de infeções bacterianas).(16)

O diagnóstico de doenças autoimunes é feito com base nos sinais e sintomas apresentados pelo doente, acompanhados de determinações de anticorpos específicos para cada caso. Na Tabela 13 são apresentados alguns exemplos de doenças autoimunes, bem como a sua prevalência nos Estados Unidos da América em 1996 e os parâmetros laboratoriais que auxiliam o seu diagnóstico.

No Laboratório S. José determinam-se todos os anticorpos e antígenos indicados na Tabela 13. Os parâmetros indicados com <sup>a)</sup> são determinados no ARCHITECT i2000; com <sup>b)</sup> são determinados por ELISA; com <sup>c)</sup> são determinadas por *immunoblot*; com <sup>d)</sup> é quantificado

no ARCHITECT c8000 e avaliado qualitativa e semi-quantitativamente por testes de aglutinação (Waalser-Rose e RA-Teste), quando pedido.

**Tabela 13: Diagnóstico e prevalência de doenças autoimunes. Adaptado de (6).**

<sup>a)</sup>Equipamentos automáticos; <sup>b)</sup>ELISA; <sup>c)</sup>Immunoblot; <sup>d)</sup>Equipamento automático + Aglutinação.

	DOENÇA AUTOIMUNE	ÓRGÃOS AFECTADOS	PREVALÊNCIA (100 000 INDIVÍDUOS)	ANTICORPOS E ANTIGÉNIOS
<b>ÓRGÃO ESPECÍFICO</b>	Tiroidite de Hashimoto	Tiroide	982	Anti-Peroxidase (Anti-TPO) <sup>a)</sup> . Anti-Tiroglobulina (Anti-TG) <sup>a)</sup> .
	Doença de Graves	Tiroide	1152	Anti-recetor de TSH (TRABs) <sup>b)</sup> .
	Anemia Perniciosa	Células parietais gástricas.	151	Anti-células parietais <sup>b)</sup> . Anti-fator intrínseco <sup>b)</sup> .
	Hepatite autoimune	Fígado	0,4	Anti-antígenos do músculo liso (F-actin) <sup>c)</sup> .
	Doença Celíaca	Intestino	1:34 <sup>2</sup>	Anti-gliadina <sup>b)</sup> . Anti-transglutaminase <sup>b)</sup> . Anti-endomísio <sup>b)</sup> .
<b>SISTÉMICA</b>	Lúpus Eritematoso Sistémico	Articulações, pele, sistema nervoso central, rins, coração, pulmões e células sanguíneas.	24	Anti-dsDNA <sup>b)</sup> . Anti-Sm <sup>c)</sup> . Anti-Ribosomal P <sup>c)</sup> . Anti-Helicase <sup>c)</sup> .
	Artrite Reumatoide	Articulações, vasos sanguíneos e pulmões.	860	Anti peptídeos citrulinados (Anti-CCP) <sup>a)</sup> . Fator reumatoide <sup>d)</sup> .

## 4.2. Determinações analíticas

Em imunologia, todas as determinações se baseiam em ligações antígeno-anticorpo. O que diferencia as técnicas umas das outras é o método de deteção do imunocomplexo.

A amostra utilizada nestas determinações é, preferencialmente, soro. No entanto, pode ser utilizado plasma obtido com heparina, desde que venha referenciado na bula que não tem qualquer implicação nos resultados.

<sup>2</sup> Prevalência em Portugal atualmente Fonte: <http://www.celiacos.org.pt/doenca-celiaca/prevalencia.html>, consultado em 02/06/2016

## 4.2.1. Sistemas automáticos

### 4.2.1.1. **ARCHITECT**

Os sistemas automáticos que fazem determinações de parâmetros imunológicos são o ARCHITECT c8200 (principalmente o i2000) e o ARCHITECT i1000. Ambos utilizam a quimioluminescência para detetar o imunocomplexo. Ao soro do doente são adicionadas micropartículas paramagnéticas revestidas com antigénios ou anticorpos, dependendo da determinação a efetuar. Após incubação, ocorre um processo de lavagem: se tiver ocorrido a formação do imunocomplexo este fica ligado às micropartículas. É adicionado o conjugado que contém um anticorpo marcado com acridínio. Após outro ciclo de lavagens, é adicionada uma solução pré-ativadora e outra ativadora que desencadeiam a reação quimioluminescente. Esta reação é medida em unidades de luz relativas (RLUs). Existe uma relação direta entre a quantidade de antigénio/anticorpo presente na amostra e as RLUs detetadas pela ótica do equipamento.(17)

Os reagentes destes equipamentos estão sujeitos a uma calibração inicial. Neste processo, são utilizados calibradores, isto é, soluções com quantidades bem definidas do parâmetro a analisar. Cada parâmetro tem um número específico de calibradores (normalmente, para parâmetros imunológicos, são seis pontos), com os quais o equipamento consegue definir uma curva de calibração. Nesta curva, a cada concentração é atribuída um valor de RLUs, através da qual o equipamento é capaz de quantificar aquele parâmetro. Existem algumas circunstâncias nas quais é necessário repetir a calibração: quando os controlos ultrapassam determinados limites estabelecidos pelo DT e se depreende que o problema não está no controlo e reside na perda de estabilidade do reagente. Obviamente que a decisão de calibrar também tem em consideração o número de testes do reagente, a data da última calibração e o parâmetro em causa.

### 4.2.1.2. **ImmunoCAP**

Para a determinação de IgE específica em casos de alergias utiliza-se o ImmunoCAP. Em cada ensaio, é promovida a ligação entre os anticorpos presentes no soro do doente e alérgenos específicos. A deteção do imunocomplexo é conseguida através de um conjugado (anticorpo específico para a imunoglobulina humana ligado a um fluoróforo), cuja ligação ao imunocomplexo é detetada através fluorescência emitida pelo fluoróforo ligado ao anticorpo. Para deteção, o equipamento utiliza um fluorómetro.



Tal como em qualquer outro equipamento, também nestes ensaios é necessária uma curva de calibração. Neste caso, à concentração de cada calibrador é atribuído um valor de fluorescência. Esta curva é feita periodicamente, período este definido pelo DT. Em cada ensaio, são utilizados dois calibradores que ajustam a curva inicial àquele ensaio, permitindo a quantificação das amostras.

#### 4.2.2. Técnicas manuais

Todas as técnicas manuais possuem bulas com procedimentos bem definidos. É importante respeitar o procedimento de cada técnica para obter bons resultados. Para cada ensaio é necessário utilizar um controlo com o intuito de assegurar a fiabilidade dos resultados.

##### 4.2.2.1. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Nesta técnica, o imunocomplexo é detetado através de uma reação enzimática. Cada *kit* de ELISA possui uma placa de 96 poços revestidos com antigénios ou anticorpos específicos, de acordo com o que se pretende determinar. Além das amostras (preferencialmente soro), são utilizados um calibrador e um controlo em cada ensaio, que são adicionados a diferentes poços da placa. Após a incubação definida pelo fabricante, é removido o conteúdo do poço, ocorre um processo de lavagem e é adicionado um conjugado. O conjugado é um anticorpo específico (para o antigénio ou anticorpo que pretendemos determinar) associado a uma enzima (geralmente a Peroxidase). Após nova incubação, é removido o conjugado em excesso, ocorre um processo de lavagem e é adicionado o substrato da enzima (geralmente, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, vulgarmente designado por TMB). Aguarda-se o tempo suficiente para que ocorra a reação enzimática e adiciona-se solução Stop, que termina a reação, permitindo leitura da absorvância. A absorvância é lida a 450 nm utilizando um espectrofotómetro.

Cada *kit* possui um conjunto de calibradores que permite a obtenção de uma curva-padrão, curva esta que relaciona concentração e absorvância. É através da existência desta curva que é possível quantificar as amostras analisadas. A curva é estabelecida aquando da abertura do *kit*. Em cada ensaio é utilizado um dos calibradores ou controlo externo de concentração conhecida para controlar a técnica e poder ter confiança nos resultados.

O processo de lavagem é, sem dúvida, a fase crítica de toda a técnica. É importante lavar bem os poços antes da adição do reagente seguinte para garantir que todas as ligações se resumem ao imunocomplexo.

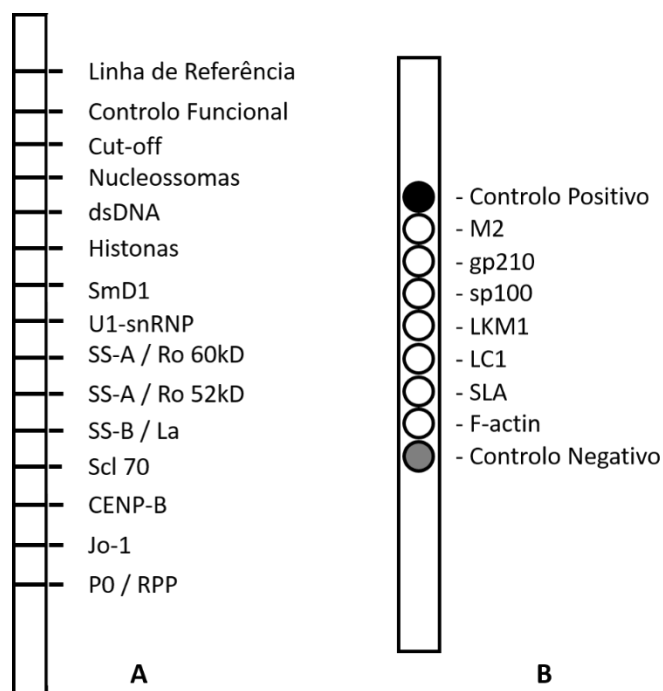
#### **4.2.2.2. Immunoblot**

O *immunoblot* é semelhante à ELISA: a diferença é que no *immunoblot* detetamos sempre anticorpos e podemos determinar a presença de vários anticorpos diferentes em simultâneo.

Os *kits* são compostos por tiras com antigénios imobilizados. Promove-se a ligação dos anticorpos presentes no soro do utente com os antigénios da tira. Ocorre um processo de lavagem e adiciona-se o conjugado (anticorpo ligado a uma enzima - geralmente a peroxidase) que se liga às imunoglobulinas humanas retidas na tira. Após incubação, é removido o conjugado e adiciona-se o substrato da enzima (normalmente TMB). Após nova incubação, termina-se a reação com solução Stop ou água, dependendo o *kit*. Nesta fase, a tira está pronta a ser analisada.

As tiras de *immunoblot* têm sempre um controlo e podem ou não ter um *cut-off* (intensidade abaixo da qual não se considera positivo) (Figura 8). Quando não aparece uma banda no sítio do controlo, significa que a técnica não funcionou e o resultado não é válido, sendo rejeitado.

No laboratório S. José é utilizado o *immunoblot* para determinar alguns ANAs, antigénios relacionados com a doença hepática (M2, LKM-I, LC-I, SLA, F-actina, gp210, sp100) e para testes confirmatórios de HIV e HCV.



**Figura 8:** Tiras de *Immunoblot* do Laboratório S. José. A- Diferenciação de ANAs. Esta tira possui um cut-off e um controlo funcional que permite avaliar a técnica. B- Diferenciação de anticorpos anti-músculo liso. Esta tira tem um controlo negativo e um controlo positivo, não apresentando um cut-off.

#### 4.2.2.3. Aglutinação

Os testes de aglutinação são testes rápidos que permitem detetar de forma semi-quantitativa a presença de antígenos ou anticorpos.

Para a deteção de anticorpos, são utilizados antígenos específicos associados a partículas que aglutinam quando estes estão presentes. Podem ser utilizadas partículas de latex (RA teste), partículas de carvão (RPR) ou eritrócitos de carneiro sensibilizados com o antígeno (Waalser-Rose).

Para a deteção de antígenos são utilizados antissoros contendo os anticorpos específicos para aquele antígeno. É exemplo deste tipo de técnica a determinação dos grupos sanguíneos e o Teste de Coombs.

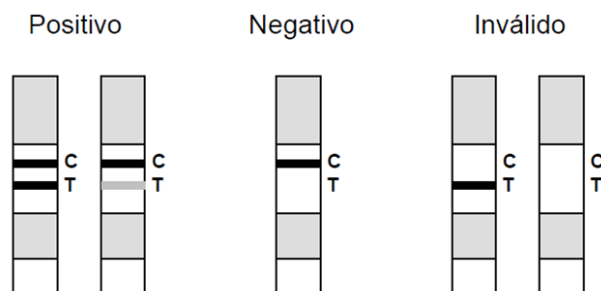
Na determinação de grupos sanguíneos, utiliza-se soros anti-A, anti-B e anti-D. Coloca-se uma gota de cada antissoro numa lâmina e adiciona-se uma gota de sangue total em EDTA a cada gota de antissoro. Se os eritrócitos do utente tiverem cada um dos antígenos, os anticorpos dos antissoros ligam-se, formando agregados de eritrócitos visíveis à vista desarmada.

O Teste de Coombs pode ser visto como dois testes diferentes: o Teste de Coombs Direto e o Teste de Coombs Indireto. No Teste de Coombs Direto, adiciona-se o uma gota Soro de Coombs (contém anticorpos anti-imunoglobulina humana) a uma gota de sangue total em EDTA: se ocorrer aglutinação de eritrócitos significa que existem anticorpos ligados a estas células. Este fenómeno acontece em situações de anemia hemolítica. No Teste de Coombs Indireto, promove-se a ligação de anticorpos presentes no soro do utente com uma suspensão de eritrócitos 0 positivos (ou seja, sem nenhum antigénio de superfície a não ser o D). Após incubação, é adicionado o Soro de Coombs à suspensão de eritrócitos: se ocorrer aglutinação, significa que o soro do doente possui anticorpos anti-D. O Teste de Coombs Indireto é pedido muitas vezes para grávidas que sejam Rhesus negativas, para avaliar se a mãe produziu anticorpos anti-D por estimulação dos eritrócitos do feto. Nestes casos, se o Teste de Coombs Indireto for positivo, aumenta a probabilidade de doença hemolítica do recém-nascido, na qual os anticorpos produzidos pela mãe desencadeiam a lise dos eritrócitos de recém-nascido.

#### 4.2.2.4. Imunocromatografia

A imunocromatografia permite detetar tanto antigénios como anticorpos; o princípio é o mesmo, o que muda é se o solvente tem um antigénio ou um anticorpo. Tome-se como exemplo a pesquisa de antigénio. Adiciona-se a amostra (soro ou solução obtida de uma zaragatoa) e inicia-se o movimento do anticorpo móvel (solução corada) sobre uma matriz de nitrocelulose que se encontra numa cassete. Se ocorrer formação do imunocomplexo, este fica imobilizado em T (Figura 9), ligado a um anticorpo específico para o antigénio a pesquisar.

Tal como todas as outras técnicas, também a imunocromatografia precisa de um controlo. Neste caso, em C encontram-se anticorpos para o anticorpo solúvel do teste. Se nenhuma banda aparecer na zona C não podemos validar o resultado (Figura 9).



**Figura 9:** Interpretação de uma imunocromatografia.

Fonte: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/06/imunocromatografia.html>

### 4.3. Casos Clínicos

De forma a ilustrar melhor todos estes conceitos sobre Imunologia, serão apresentados nesta secção alguns casos clínicos observados no laboratório ao longo do estágio. Para cada caso, serão apresentados os resultados obtidos para os diferentes parâmetros, bem como a interpretação dos mesmos através de uma breve discussão.

#### 4.3.1. Caso Clínico 4

Utente do sexo feminino com 45 anos dirigiu-se ao laboratório para fazer as análises apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 14: Resultados laboratoriais do caso clínico 4.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Unidades</b>	<b>Intervalo de Referência</b>
<b>AgHBs</b>	Negativo	UI/L	Negativo <1
<b>Anti-HBc (Total)</b>	Positivo	UI/L	Negativo <1
<b>Anti-HBs</b>	Imune (15)	UI/L	Imunidade $\geq$ 10

Dos resultados obtidos, podemos concluir que a utente foi infetada com o vírus HBV e que a infeção se encontra resolvida, uma vez que o AgHBs é negativo (Tabela 10). Pode ser descartada a hipótese de vacinação, uma vez que o anti-HBc é positivo, anticorpo que só é produzido após infeção pelo VHB.

Para ser possível retirar mais conclusões, seria necessário dosear o Anti-HBe: se for positivo, indica infeção recente; se for negativo implica uma infeção mais antiga.

### 4.3.2. Caso Clínico 5

Utente do sexo masculino com 54 anos veio pela primeira vez ao Laboratório S. José em 2011, tendo regressado em 2012 e 2016. Os resultados obtidos nas suas análises estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15: Resultados laboratoriais do caso clínico 5.**

Parâmetro	Resultados			Unidades	Intervalo de Referência
	2011	2012	2016		
<b>AgHBs</b>	Positivo (3447,00)	Positivo (4925,56)	Positivo (3105,10)	UI/L	Negativo <1
<b>AgHBe</b>	Positivo	Positivo	Negativo	UI/L	
<b>Anti-HBc (Total)</b>	Positivo	Positivo	Positivo	UI/L	Negativo <1
<b>Anti-HBe</b>	Negativo	Negativo	Positivo	UI/L	
<b>Anti-HBs</b>	Não imune	Não imune	Não imune	UI/L	Imunidade ≥ 10

Parece tratar-se de um caso de infeção crónica pelo VHB, dada a presença de AgHBs. Relativamente aos resultados obtidos para o AgHBe, podemos concluir que em 2011 e 2012 o vírus se encontrava ativo, com elevada taxa de replicação. Em 2016, já não existia replicação viral.

De acordo com os resultados obtidos para os anticorpos, anti-HBc, anti-HBe e anti-HBs, podemos concluir que foi iniciada a resposta humoral à infeção viral. No entanto, devido à negatividade do anticorpo anti-HBs, a infeção ainda não se encontra resolvida.

Como já foi referido anteriormente, a identificação da fase da hepatite B é feita através de marcadores serológicos (Tabela 10). Como o AgHBs está presente há mais de seis meses, podemos concluir que é um caso de Hepatite B crónica.

### 4.3.3. Caso Clínico 6

Um doente de 42 anos dirigiu-se ao Atendimento Médico Permanente da IDEALMED. Foram pedidas análises laboratoriais e os seus resultados estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16: Resultados laboratoriais do caso clínico 6.**

Parâmetro	Resultados	Unidades	Intervalo de Referência
<b>Leucócitos</b>	9,320	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4,00 - 10,500
<b>Neutrófilos</b>	30 (2,8)	%	40 - 74
<b>Eosinófilos</b>	2 (0,2)	%	0,0 - 7,0
<b>Basófilos</b>	1 (0,1)	%	0,0 - 1,5
<b>Monócitos</b>	9 (0,8)	%	3,4 - 9,0

<b>Linfócitos</b>	<b>58 (5,4)</b>	<b>%</b>	<b>19,0 - 48,0</b>
<b>Ferritina</b>	<b>1530,0</b>	<b>ng/mL</b>	<b>30,0 - 300,0</b>
<b>Gama-GT</b>	<b>99</b>	<b>U/L</b>	<b>12 - 64</b>
<b>AST</b>	<b>210</b>	<b>U/L</b>	<b>5 - 34</b>
<b>ALT</b>	<b>212</b>	<b>U/L</b>	<b>&lt;55</b>
<b>CRP</b>	<b>2,22</b>	<b>U/L</b>	<b>&lt;0,60</b>
<b>LDH</b>	<b>400</b>	<b>U/L</b>	<b>125 - 220</b>
<b>CMV IgG</b>	Positivo (91)	UA/mL	Negativo <10
<b>CMV IgM</b>	Positivo (3,1)	UA/mL	Negativo <0,8

Analisando o leucograma, verifica-se que há um aumento de linfócitos e uma diminuição de neutrófilos, sugerindo uma infeção viral. O aumento da ferritina e da CRP (proteínas de fase aguda, ou seja, produzidas pelo fígado em situações de inflamação), bem como o aumento significativo das enzimas hepáticas (AST, ALT e Gama-GT) sugerem envolvimento hepático. O aumento da LDH indica a ocorrência de destruição celular.

Face ao notório envolvimento hepático, suspeitou-se de uma hepatite viral. Foram pedidos vários marcadores virais, salientando-se o doseamento dos anticorpos IgG e IgM para o CMV, obtendo-se um resultado positivo para ambos.

Assim, o utente tinha uma hepatite viral provocada por CMV. Apesar da infeção por este vírus ser mais comum na infância, este caso demonstra que isso nem sempre acontece e é possível ter uma primoinfeção por CMV na idade adulta.

#### 4.3.4. Caso Clínico 7

Uma utente de 32 anos vinda da Ferticentro veio ao Laboratório S. José fazer as suas análises. Foi feito o seu seguimento durante 3 meses, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17: Resultados laboratoriais do caso clínico 7.**

Parâmetro	Resultados			Unidades	Intervalo de Referência
	15/03	05/04	09/05		
<b>Toxoplasma gondii IgG</b>	Positivo (143,4)	Positivo (481,2)	Positivo (981,0)	UI/mL	Negativo: <1,6
<b>Toxoplasma gondii IgM</b>	Positivo (3,29)	Positivo (4,27)	Positivo (3,05)	Index	Negativo: <0,5

No primeiro contacto com a utente, verificou-se que esta tinha uma infeção por *Toxoplasma gondii*. Atendendo ao baixo título de IgM, não era possível concluir se se tratava

de uma infecção antiga ou recente. Assim, sugeriu-se a confirmação do resultado após 3 semanas.

Os resultados obtidos a 05/04 demonstraram que se tratava de uma infecção recente em evolução, uma vez que os títulos de IgG e IgM aumentaram.

Passado um mês, repetiram-se as análises. Tendo em conta que ocorreu uma diminuição de IgM e um aumento de IgG, conclui-se que a infecção está em fase de resolução.

#### 4.3.5. Caso Clínico 8

Um indivíduo de 47 anos com suspeita de alergias dirigiu-se ao laboratório e fez as análises apresentadas na Tabela 18.

**Tabela 18: Resultados laboratoriais do caso clínico 8.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Unidades</b>	<b>Intervalo de Referência</b>
<b>IgE</b>	103,5	UI/mL	<150
<b>IgE <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (d1)</b>	Classe I (0,56)	KUA/L	
<b>IgE Oliveira (t9)</b>	Classe 0 (0,13)	KUA/L	
<b>IgE Caspa de Gato (e1)</b>	Classe 0 (<0,10)	KUA/L	
<b>IgE mix GRAMÍNEAS (gx1)</b>	Positivo		

Apesar do utente não apresentar um valor de IgE muito elevado (ainda dentro dos valores de referência), apresenta IgE específica para alguns alergénios, nomeadamente ácaros domésticos (d1) e gramíneas (plantas com flor). Gx1 é uma mistura de antigénios de gramíneas. Como se obteve um resultado positivo para esta mistura é importante fazer a determinação individual da IgE específica para cada um dos alergénios contidos na mistura.

A não ser que a pessoa tenha sintomas alérgicos em situações muito específicas (como a limpar o pó, por exemplo), é difícil identificar imediatamente o tipo de IgE específica a analisar. Assim, uma boa estratégia para este tipo de análise é começar pelas misturas de IgE, e, caso dê positivo, avaliar cada um dos componentes da mistura em separado.



#### 4.3.6. Caso Clínico 9

Uma utente de 82 anos veio ao Laboratório S. José fazer as suas análises e os resultados estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19: Resultados laboratoriais do caso clínico 9.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Intervalo de Referência</b>
<b>TSH</b>	<b>99,015</b>	$\mu$ UI/mL	0,350 - 4,940
<b>FT4</b>	<b>&lt;0,40</b>	ng/dL	0,70 - 1,48
<b>Anti-TPO</b>	<b>67.9</b>	UI/mL	<5,6
<b>Anti-TG</b>	<b>166,8</b>	UI/mL	<4,1

Os resultados obtidos representam um caso evidente de hipotireoidismo, caracterizado por uma baixa da produção de T4 pela tiroide, na presença de elevados níveis de TSH. Os anticorpos anti-TG e anti-TPO estão elevados, sugerindo um quadro típico de Tiroidite de Hashimoto. Neste tipo de patologia, há produção de anticorpos contra algumas estruturas da tiroide, havendo produção de imunocomplexos e consequente infiltração de células do sistema imunitário que leva à destruição da tiroide e consequente perda de função.(6)

#### 4.3.7. Caso Clínico 10

Uma utente de 46 dirigiu-se ao laboratório e fez as análises apresentadas na Tabela 20.

**Tabela 20: Resultados laboratoriais do caso clínico 10.**

Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
<b>Eritrócitos</b>	5,07	$\times 10^6/\mu\text{L}$	3,900 - 5,200
<b>Hemoglobina</b>	<b>10,8</b>	g/L	12,1-15,1
<b>Hematócrito</b>	<b>34,8</b>	%	36,1- 44,3
<b>VGM</b>	<b>68,6</b>	fL	80 - 95
<b>HGM</b>	<b>21,3</b>	Pg	27 - 33
<b>CHGM</b>	<b>31,0</b>	g/dL	32 - 36
<b>RDW</b>	15,5	%	11,8 -15,6
<b>Leucócitos</b>	8,270	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4 -10.5
<b>Neutrófilos</b>	58 (4,8)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	40 - 74
<b>Eosinófilos</b>	2 (0,2)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0 - 7
<b>Basófilos</b>	1 (0,1)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0 -1,5
<b>Monócitos</b>	7 (0,6)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	3,4 - 9,0
<b>Linfócitos</b>	32 (2,6 )	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	19 - 48
<b>Velocidade de sedimentação</b>	<b>30</b>	Mm	<20
<b>CRP</b>	<b>4,2</b>	U/L	<0,60
<b>Waalser-Rose</b>	<b>Aglutinou 1/2</b>		
<b>RA-teste</b>	<b>Aglutinou 1/2</b>		
<b>ANA</b>	Negativo		

Através da análise dos resultados do eritrograma podemos concluir que pessoa tem uma anemia microcítica, uma vez que há um déficit de hemoglobina, acompanhado de um baixo valor de VGM.

A CRP encontra-se bastante elevada. Como é acompanhada de uma velocidade de sedimentação acima dos valores de referência, poderia colocar-se a hipótese de infecção. No entanto, a ausência de leucocitose não sugere essa hipótese.

Os testes de aglutinação (Waalser-rose e RA-teste) evidenciam a presença do fator reumatoide, característico da artrite reumatoide.

Os resultados obtidos sugerem um quadro de Artrite Reumatoide. No entanto, este diagnóstico teria de ser complementado com um exame clínico, bem como o doseamento do fator reumatoide e do anti-CCP, marcadores específicos desta patologia.

## 5. Microbiologia

As amostras para análises microbiológicas têm de ser colhidas em recipientes estéreis e enviadas o mais rapidamente possível ao laboratório. Estas podem ser urina, fezes, exsudatos (vaginais, uretrais, purulentos), zaragatoas superficiais ou outros líquidos biológicos. Podemos ter análises bacteriológicas, micológicas ou parasitológicas.

Nas análises bacteriológicas, mediante as amostras obtidas e as análises pedidas, são inoculados os meios necessários. No Laboratório S. José são realizadas uroculturas, coproculturas e hemoculturas. Fazem-se ainda pesquisa de anaeróbios e pesquisa de *Streptococcus* do grupo B.

Quando é pedida uma urocultura, a amostra utilizada é urina. Esta análise é dividida em duas partes: um exame direto e um exame cultural. No exame direto, é observado ao microscópio o sedimento urinário. Nesta observação, procuram-se células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros, fungos ou parasitas no sedimento da urina centrifugada. No exame cultural, semeia-se a urina homogeneizada num meio BRILLIANCE UTI CLARITY utilizando uma ansa descartável de 1 µL. Quando indicado, podem ser inoculados outros meios, nomeadamente COLUMBIA AGAR + SHEEP BLOOD 'PLUS'. Os meios inoculados são incubados numa atmosfera de aerobiose 35/37°C durante 18-24h. Após incubação, é feita a quantificação do número de colónias. A interpretação é feita com base no número de colónias e nos resultados da análise do sedimento de acordo com a Tabela 21. Quando a urocultura é positiva, é identificada a bactéria patogénica e realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA).

Numa coprocultura, é pesquisada a presença de *Salmonella* spp, *Shigella* spp,, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter* nas fezes. Para tal, são inoculadas Geloses Hektoen, CIN *Yersinia*, CCDA *Campylobacter* e Chapman. Quando a coprocultura é positiva é necessário identificar a bactéria patogénica e realizar TSA.

Quando é pedida uma hemocultura, a amostra é sangue obtido por punção venosa. O sangue é armazenado num frasco de hemocultura e incubado a 35/37°C. Após incubação, é feita uma análise macroscópica diária do crescimento microbiano e é feita uma subcultura em meio sólido (geralmente gelose sangue) quando apresenta turvação, hemólise, formação de gás, formação de película ou colónias visíveis na transição entre o sedimento eritrocitário e o meio de cultura. As colónias isoladas nas subculturas devem ser identificadas e deve ser realizado o TSA.

**Tabela 21: Interpretação das Uroculturas.**(18)

UTI – Infecção do Trato Urinário.

WBC – Leucócitos

CFU – Unidades Formadoras de Colónias

Descrição clínica	Resultados laboratoriais
<b>UTI aguda não complicada em mulheres</b>	>10 WBC/mm <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup> cfu/mL

<b>Pielonefrite aguda não complicada</b>	>10 WBC/mm <sup>3</sup> >10 <sup>4</sup> cfu/mL
<b>UTI complicada</b>	>10 WBC/mm <sup>3</sup> >10 <sup>4</sup> cfu/mL em homens >10 <sup>5</sup> cfu/mL em mulheres
<b>Bacteriúria assintomática</b>	>10 WBC/mm <sup>3</sup> >10 <sup>5</sup> cfu/mL em duas culturas consecutivas (>24h)
<b>UTI recorrente</b>	>10 <sup>3</sup> cfu/mL

Quando é pedida a pesquisa de anaeróbios, faz-se um exame direto e um exame cultural. No exame direto, faz-se uma análise macroscópica e uma análise microscópica das fezes. Na análise macroscópica, procuram-se nas fezes sinais sugestivos de infecção por bactérias anaeróbias como sangue, aspeto purulento, cheiro fétido e/ou tecidos necrosados. Na análise microscópica, faz-se um esfregaço com as fezes, fixa-se com metanol e procede-se a uma coloração de Gram. Esta análise permite, entre outros parâmetros, analisar a qualidade da amostra, avaliar o número e tipo de microrganismos e sugerir a necessidade de utilização de meios adicionais. No exame cultural são inoculadas uma Gelose Sangue e uma Gelose Schaedler bifásica (Factores V e X) que são colocadas em jarro de Gaspak e incubadas em estufa a 35/37°C durante 18-24h. As colónias isoladas devem ser identificadas e deve ser realizado o TSA.

Para pesquisa de Estreptococos do grupo B é inoculado um meio GBS (meio seletivo e diferencial para estreptococos do grupo B) e é colocada a zaragatoa em caldo BHI (brain-heart infusion). Os meios são incubados a 37°C durante 18-24h. No dia seguinte é reinoculada a zaragatoa no meio GBS, seguindo-se nova incubação a 37°C durante 18-24h. O objetivo é isolar e identificar o agente patogénico. A confirmação é feita por aglutinação em latex.

No Laboratório S. José, a identificação de uma bactéria envolve duas fases. Primeiro é feita uma coloração de Gram para verificar se é uma bactéria de Gram-negativa ou de Gram-Positiva.(19) Mediante esta informação, a bactéria é submetida a várias provas bioquímicas que levam à sua identificação (presença de enzimas, capacidade de fermentar açúcares, adaptação a meios com elevadas concentrações de sal, entre outros).(19)

No Laboratório S. José é utilizada a técnica de Kirby-Bauer para avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos. Nesta técnica, faz-se uma suspensão bacteriana correspondente 0,5 McFarland (ou outra, se recomendado). Esta suspensão é inoculada numa Gelose Mueller-Hinton utilizando uma zaragatoa. Os discos de antibiótico a aplicar são escolhidos de acordo

com a bactéria isolada e o produto biológico em análise. O padrão de antimicrobianos para cada bactéria/família é estabelecido pelo DT. As placas são incubadas 18-24h a 37°C. Após incubação, é feita a avaliação das resistências a cada antimicrobiano com base nos halos de inibição estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) por defeito, ou outro comité internacional (CLSI, CA-SFM) se inexistente.

Quando é pedida uma análise micológica, é efetuado uma análise a fresco e com KOH ou Azul de Lactofenol. De seguida é inoculado um meio Sabouraud inclinado. Este meio é incubado 37°C por um período mínimo de 7 dias, até se verificar o crescimento de fungos.

Quando é pedida uma análise parasitológica é feito um exame direto e um exame após concentração. O exame direto é feito através da observação de um esfregaço de fezes ao microscópio utilizando o Solutio de Lugol. O exame após concentração é feito pelo método de Ritchie. Neste método, os quistos e trofozoítos dos parasitas são sedimentados utilizando éter e formol. O sedimento resultante é observado ao microscópio com Solutio de Lugol.

## 6. Bioquímica

Todos os parâmetros Bioquímicos são determinados no ARCHITECT. A amostra utilizada para estas determinações é, preferencialmente, soro (à exceção da Hemoglobina Glicada que é determinada a partir de sangue total obtido com EDTA). É ainda possível utilizar plasma obtido por heparina, após confirmação na bula do parâmetro. Na tabela 21 estão apresentados os diferentes parâmetros determinados nesta valência.

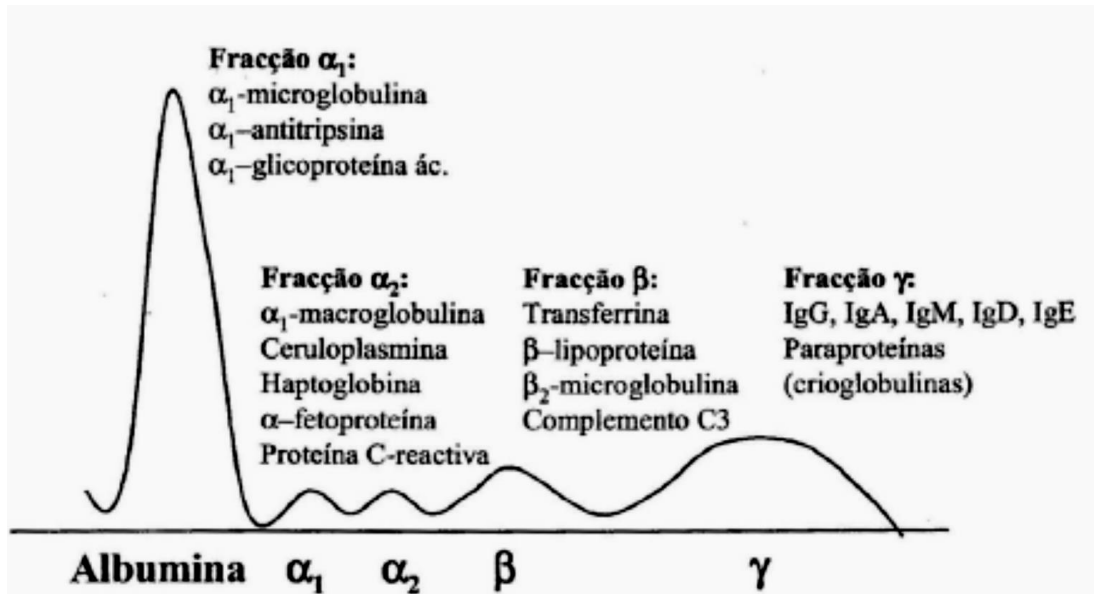
**Tabela 22: Parâmetros Bioquímicos determinados no Laboratório S. José.**

<b>Grupo</b>	<b>Parâmetro</b>
<b>Enzimas</b>	Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gama-Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase Alcalina (AP), Creatina Cinase Total (CK), Creatina Cinase B (CK-MB), Lactato Desidrogenase (LDH), Alfa 1-antitripsina (AIAT), Amilase, Lipase.
<b>Iões</b>	Cloreto, Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Fosfato, Ferro, Bicarbonato.
<b>Proteínas Transportadoras</b>	Albumina, Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Lipoproteína de alta densidade (HDL), Transferrina, Ferritina, Ceruloplasmina, Haptoglobina.
<b>Metabolitos</b>	Lactato, Amónia, Bilirrubina (Total e Direta), Triglicérideos, Colesterol, Ácido Úrico, Creatinina, Proteínas Totais, Ureia.
<b>Outros Marcadores Bioquímicos</b>	Hemoglobina Glicada (HbA1c), Glicose, Vitamina B12, Folato, Proteínas do Complemento (C3, C4), Apolipoproteínas, Fator Reumatóide, Mioglobina, Troponina de alta sensibilidade, Proteína C Reactiva (CRP), Beta-2-microglobulina, Vitamina D, Homocisteína, Péptido Natriurético tipo B (BNP), Imunoglobulinas.

Estes ensaios baseiam-se em métodos espectrofotométricos e imunoturbidimétricos. Os iões são determinados através da condutividade. Os métodos espectrofotométricos baseiam-se na absorção de radiação por parte do composto a analisar. Na imunoturbidimetria, promove-se a ligação de um anticorpo ao composto a quantificar, formando-se um imunocomplexo insolúvel. A diminuição do feixe de luz que atravessa a solução é inversamente proporcional à quantidade do imunocomplexo, e, conseqüentemente, à quantidade do parâmetro em análise. Por fim, a determinação dos iões baseia-se na capacidade dos iões conduzirem corrente elétrica, onde a corrente do soro é proporcional à sua concentração.

Além das determinações automáticas, o Laboratório S. José possibilita uma análise detalhada das proteínas totais séricas através de uma eletroforese das proteínas do soro. Para esta análise utiliza-se exclusivamente soro e o equipamento SEBYA HYDRASIS. Esta

análise permite a separação das várias frações proteicas do soro. A Figura 9 representa um esquema de uma eletroforese de proteínas normal. Num proteinograma normal, estão presentes cinco frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama, cuja constituição está esquematizada na Figura 9.



**Figura 9:** Proteinograma Eletroforético Normal.

Fonte: <https://www.estudaetal.com/thebox/theboxficheiros/3610afba971534ad3b069a12d1fbbd197>

## 7. Endocrinologia

O doseamento de hormonas é essencial ao diagnóstico das patologias endócrinas. No Laboratório S. José, o doseamento de hormonas é feito através de aparelhos automáticos ou por técnicas manuais (Radioimunoensaio – RIA). Na Tabela 22 estão apresentadas as hormonas determinadas no Laboratório S. José e a técnica utilizada nas suas determinações. Este tipo de determinações é feita preferencialmente em soro, podendo, em alguns ensaios, ser feita a partir de plasma obtido com heparina.

**Tabela 23: Hormonas doseadas no Laboratório S. José.**

<b>Grupo</b>	<b>Hormonas</b>	<b>Técnica</b>
<b>Sexuais e metabolitos</b>	Testosterona livre, 17-Hidroxiprogesterona, Delta-4-Androstenediona.	Radioimunoensaio (RIA)
	Testosterona total, Dehidroepiandrosterona Sulfato (DHEA-S), Estradiol, Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG), Progesterona, Globulina Transportadora de Hormonas Sexuais (SHBG).	Quimioluminescência
<b>Hipófise</b>	Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH).	Radioimunoensaio (RIA)
	Hormona Folículo-Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Prolactina, Hormona estimuladora da Tireoide (THS).	Quimioluminescência
<b>Rim</b>	Renina	Radioimunoensaio (RIA)
<b>Glândulas Adrenais</b>	Aldosterona	
	Cortisol	Quimioluminescência
<b>Pâncreas</b>	Insulina e Peptídeo C	
<b>Tireoide</b>	Tiroxina (T4) Livre, T4 Total, Triiodotironina (T3) Livre e T3 Total.	
<b>Paratiroide</b>	Hormona Paratiroideia (PTH)	

No Radioimunoensaio (RIA) podemos ter dois tipos de ensaios: por competição antigénio-antigénio ou por *sandwich*. Nos ensaios por competição, a molécula a quantificar e uma molécula análoga à molécula a analisar marcada com Iodo 125 competem pela ligação aos anticorpos imobilizados na parede dos tubos: a quantidade de molécula marcada ligada é inversamente proporcional à presente na amostra. Nos ensaios por *sandwich* utilizam-se tubos revestidos com anticorpos para a molécula a dosear. Adiciona-se a amostra e a molécula liga-se ao anticorpo. Segue-se um processo de lavagem, no qual é removida a amostra que não ligou ao anticorpo. Adiciona-se um anticorpo marcado com Iodo 125, que se liga às moléculas presentes na amostra que se encontram ligadas ao anticorpo do tubo. Segue-se um processo de lavagem para remover o anticorpo marcado não ligado. Nos dois



tipos de ensaios, a quantificação é feita por através da leitura das contagens por minuto (cpm) do Iodo 125 obtidas com uma camara gama (DPC GAMMA BHERTOLD). A correspondência entre os cpm do Iodo 125 e a concentração da molécula a quantificar é conseguida através do estabelecimento de uma curva de calibração, aquando da abertura do *kit*. Devido ao decaimento do Iodo 125, e conseqüente perda de cpm, em cada ensaio são feitos os dois calibradores dos extremos para ajustar a curva àquele ensaio. Além destes calibradores, é utilizado um controlo que pode ser o do *kit* ou um controlo externo, previamente quantificado.

As determinações por quimioluminescência são feitas nos ARCHITECT i2000 e i1000. O método já foi explicado anteriormente, na secção 4.2.1.1.

## 8. Conclusão

O Mestrado em Análises Clínicas fornece uma importante componente teórica relacionada com a fisiologia do organismo e com as suas patologias. No entanto, é uma formação maioritariamente teórica, tendo uma componente prática muito reduzida. O estágio curricular do segundo ano tinha como objetivo solucionar essa carência e permitir a sistematização dos conhecimentos teóricos previamente adquiridos.

Considero que este estágio foi muito enriquecedor, quer a nível profissional quer a nível pessoal. A nível profissional, ajudou-me a desenvolver capacidades de organização, coordenação de várias atividades em simultâneo, concentração e destreza laboratorial. A nível pessoal, permitiu-me aprimorar competências fundamentais, como a pontualidade, as relações interpessoais e o trabalho em grupo.

Apesar do Laboratório S. José não ser setorizado, não considero que isso seja um aspeto negativo. Desta forma, todos os técnicos têm contacto com todas as valências diariamente, enriquecendo a sua formação a cada dia.

Foi bastante evidente que a automação domina o ramo das análises clínicas. No entanto, e contrariamente à perceção que tinha antes da realização deste estágio, o técnico desempenha um papel fundamental. O espírito crítico, quer do técnico, quer do especialista em análises clínicas, que valida os resultados, é muito importante para impedir que resultados incorretos sejam transmitidos ao médico ou ao doente.

Por mais automatizado que seja o sistema, nunca pode ser esquecido que por trás daquele número está uma pessoa, e que a vida desta pode ser condicionada pelo resultado que sai do laboratório. Desta forma, é importantíssimo ter a certeza que o resultado dado está de acordo com a realidade.

Finalizada esta fase, não sei o que o futuro me reserva. Se o meu percurso passará pelas análises clínicas, o tempo dirá. Mas, sem dúvida, que a passagem pelo Laboratório S. José foi muito marcante para mim, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.



## 9. Referências

1. HOFFBRAND, A.; MOSS, P. - Essential Haematology. 6a Ed. WILEY-BLACKWELL, 2011. ISBN 978-1-4051-9890-5. P: 1-88, 314-362.
2. RODAK, B.; CARR, J. - Clinical Hematology Atlas. 4a Ed. 2013. Elsevier. ISBN: 978-1-4557-0830-7. P: 11-197.
3. BAIN B. et al. - Pratical Haematology. 4<sup>a</sup> Ed. 2011. Elsevier. ISBN-13: 9780702034084. P: 1-110; 393-465.
4. MACEDO, C. - Efeitos do implante de contraceptivo de etonogestrel sobre o sistema hemostático de mulheres híginas. Universidade de São Paulo; 2006.
5. SANTOS, V. et al. - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. Rev Assoc Med Bras. 2000.
6. ZABRISKIE, John - Essential Clinical Immunology. 1<sup>a</sup> Ed. 2009. Cambridge University Press. ISBN: 9780521516815. P: 1-118, 131-162.
7. OWEN, Judith et al. Kuby Immunology. 7a Ed. 2013. Journal of Chemical Information and Modeling. W.H. Freeman and Company. ISBN: 1-4641-3784-6. P: 1-26; 261-298: 485-552.
8. DIMMOCK, N. et al. - Introduction do Modern Virology, 7<sup>a</sup> Ed. 2016. WILEY-BLACKWELL. ISBN 978-1-119-97810-7 P: 293-361.
9. ESTEVES, Stéphanie - A INFECÇÃO PELO VÍRUS CITOMEGALO - ESTUDOS EM PORTUGAL. Universidade de Lisboa; 2010.
10. FERREIRA S. - Infecção Congénita por Citomegalovírus Prevenção e Tratamento. Universidade do Porto; 2014.
11. ROMANELLI Luiz et al. - O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? Rev Assoc Med Bras. 2010.
12. CARVALHO A. Boletim Mensal de Estatística - Abril 2016. Instituto Nacional de Estatística; 2016.
13. LOPES Leonor et al. - Sífilis: Prevalência num Hospital de Lisboa. Acta médica Portuguesa. 2016.
14. MAHON Connie et al. - Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>a</sup> Ed. 2014. Elsevier. P: 10-11.
15. SOUSA Maria et al. - Toxoplasma gondii infection in centre of Portugal: seroprevalence during 2000–2006. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
16. MACKAY I., ROSE N. - The Autoimmune Diseases. 5<sup>a</sup> ed. Inc. E, editor. 2014. P: 19-31.
17. ABBOTT. HBsAg Quantitativo Sistema ARCHITECT.

18. GRABE M, et al. - Guidelines on Urological Infections. Eur Assoc Urol. 2013.
19. FONSECA A. et al. - Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. 2004.