

Graça Maria Vicente Oliveira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Sílvia Malheiro e pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Graça Maria Vicente Oliveira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dr.^a Sílvia Malheiro e pela Professora Dr.^a Maria Celeste Fernandes Lopes, apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Ao Homem da minha vida, o meu pai, por me incentivar e apoiar na realização de todos os meus sonhos.

Ao meu namorado, Ângelo Cerqueira, por me ter pressionado a realizar o Mestrado em Análises Clínicas, sem dúvida uma mais-valia para o meu futuro profissional.

A todos os meus familiares e à minha segunda família, família Pêgo, que estiveram sempre por perto e me apoiaram em tudo.

Aos meus amigos, principalmente às irmãs Carvalho, que em momentos de desespero me conseguiam animar.

À cidade de Aveiro e às pessoas que conheci em Aveiro, obrigada pela serenidade transmitida.

Aos meus companheiros de mestrado, Alexandra, Ivo e Marta, por tudo aquilo que o mestrado nos proporcionou e que a amizade prevaleça para a vida toda.

À professora doutora Maria Celeste Lopes, por me ter incentivado e apoiado em todo este processo.

E a ti, Vanda, és como uma mãe, agradeço-te por tudo!

Índice

AGRADECIMENTOS.....	3
ÍNDICE.....	5
FIGURAS E TABELAS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	15
SETOR DE HEMATOLOGIA LABORATORIAL.....	17
HEMOGRAMA.....	18
<i>Sysmex NX-2000</i>	18
ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO.....	21
<i>Alterações da Série Rubra</i>	22
<i>Alterações da Série Branca</i>	24
<i>Alterações da Série Plaquetária</i>	26
FLUIDOS BIOLÓGICOS.....	26
<i>Líquido cefalorraquidiano</i>	27
<i>Líquido Pleural, Líquido Peritoneal e Líquido Sinovial</i>	28
ELETROFORESE DE HEMOGLOBINAS.....	31
HEMOGLOBINA GLICADA.....	32
<i>Adams A1c HA-8160</i>	32
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO.....	33
<i>Ves-Matic Cube 30</i>	34
GASIMETRIA.....	34
<i>Instrumentation Laboratory GEM 3500/4000</i>	37
CONTROLO DE QUALIDADE.....	38
SETOR DE IMUNOQUÍMICA LABORATORIAL.....	39

ARCHITECT.....	41
MAGO 4	43
MINICAP	44
IMUNOCAP 250	45
COBAS E411	45
SEROLOGIA INFECIOSA	46
<i>Toxoplasmose</i>	46
<i>Citomegalovírus</i>	50
<i>Rubéola</i>	53
CONTROLO DE QUALIDADE	54
CONCLUSÃO	57
BIBLIOGRAFIA.....	59

Figuras e Tabelas

Figura 1 - Fluxograma dos <i>softwares</i> utilizados pelos profissionais de saúde.....	16
Figura 2 - Equipamento automático Sysmex NX-2000.....	18
Figura 3 - Técnica utilizada para a execução de esfregaço de sangue periférico.	21
Figura 4 - A cor e forma dos cristais num microscópio de luz polarizada compensada com o eixo de polarização fixo.....	31
Figura 5 - Estrutura da hemoglobina.....	31
Figura 6 - Método manual de Westergren.....	34
Figura 7 - Equipamento modular Architect ci 8200.	41
Figura 8 - Esquema do imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.	42
Figura 9 - O equipamento Mago 4 realiza o método ELISA e imunofluorescência indireta em lâminas.....	43
Figura 10 - Figura representativa da reação de imunofluorescência indireta numa lâmina...	43
Figura 11 - Perfil eletroforético das proteínas, numa situação normal.	44
Figura 12 - Representação das fases do ciclo de vida do parasita <i>T. gondii</i>	46
Figura 13 - Quisto com o interior cheio de taquizoítos, uma fase do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	47
Figura 14 - Gráfico representativo da evolução dos diferentes títulos de anticorpos de IgM e IgG, numa infeção por <i>T. gondii</i>	48
Figura 15 - Inclusões em células provocadas pelo vírus Citomegalovírus.	50
Tabela 1 - Análises clínicas realizadas no setor de Hematologia.....	17
Tabela 2 - Algumas anomalias detetadas através da observação do esfregaço de sangue periférico.....	23
Tabela 3 - Células da série leucocitária e possíveis patologias associadas a alterações destas células.....	25
Tabela 4 - Anomalias detetadas na série plaquetária.....	26
Tabela 5 - Tubos identificados nas várias secções de colheita e triados automaticamente ou manualmente.....	39

Tabela 6 - Interpretação dos resultados obtidos a partir do título de IgM e IgG, e avidéz de IgG.....49

Tabela 7 - Interpretação dos resultados obtidos a partir do título de IgM e IgG, e avidéz de IgG.....52

Abreviaturas

Ca ²⁺	Cálcio
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CMIA	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência
CMV	Citomegalovírus
CO ₂	Dióxido de carbono
COHb	Carboxihemoglobina
CPPD	Pirofosfato de cálcio
ctO ₂	Concentração de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FEIA	Ensaio imunoenzimático de fluorescência
<i>flags</i>	Sinais de alerta
GV	Glóbulos vermelhos, hemácias, eritrócitos ou rubros
Hb	Hemoglobina
HbA1	Hemoglobina α-1
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HbA2	Hemoglobina α-2
HbF	Hemoglobina fetal
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCO ₃ ⁻	Ião bicarbonato
HHb	Desoxihemoglobina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Ht	Hematócrito
ICT	<i>Integrated chip technology</i>
IgA	Imunoglobolína A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobolína G
IgM	Imunoglobolína M

iQM	<i>Intelligent quality management</i>
K ⁺	Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPC	Luz polarizada compensada
LSS	Lauril sulfato de sódio
MetHb	Metahemoglobina
MSU	Urato monossódico
Na ⁺	Sódio
O ₂ Hb	Oxihemoglobina
PAPP-A	Proteína plasmática A associada à gravidez
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
pO ₂	Pressão parcial de oxigénio
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
RET	Reticulócitos
RIQAS	<i>Random international quality assessment scheme</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SO ₂	Saturação de oxigénio
tHb	Hemoglobina total
UK NEQAS	<i>External quality assesement services</i>
ULSAM	Unidade Local de Saúde do Alto Minho
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VS	Velocidade de sedimentação
β-HCG livre	Subunidade β livre da gonadotropina coriónica

Resumo

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas decorreu de dezembro de 2017 a maio de 2018, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Viana do Castelo, ULSAM. Este serviço está dividido em três setores, o setor de Hematologia, Imunoquímica e Microbiologia. Houve ainda oportunidade de passar brevemente por outros serviços, nomeadamente o Serviço de Imunohemoterapia e o Serviço de Saúde Pública.

O estágio possibilitou uma integração numa equipa de trabalho profissional e o aperfeiçoamento de conhecimentos teóricos e métodos analíticos executados, bem como o aprimorar do conhecimento sobre a implementação do Sistema de Gestão de Qualidade, para uma evolução contínua do laboratório.

Este relatório foca as duas valências previamente escolhidas, Hematologia e Imunologia, não deixando de referir que os restantes setores e serviços são de igual modo importantes para os profissionais da área de Análises Clínicas. Relativamente à valência de Imunologia, devido à sua extensa área, o documento aborda o tema de Serologia Infeciosa na Maternidade, nomeadamente na pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, Citomegalovírus e Rubéola.

Abstract

The curricular internship held in the scope of the Master in Clinical Analysis was held from December 2017 to May 2018 in the Clinical Pathology Service at Viana do Castelo Hospital, ULSAM. This service is divided into three sectors: Hematology, Immunochemistry and Microbiology. There was also an opportunity to briefly go through other services, namely the Immunohemotherapy Service and the Public Health Service.

The internship allowed for integration into a professional work team and the improvement of theoretical knowledge and analytical methods performed, as well the improve of knowledge about the implementation of the Quality Management System for the continuous evolution of the laboratory.

This document focuses on the two previously selected valencies, Hematology and Immunology, not forgetting to refer that the other sectors and services are equally important for the professionals in the area of Clinical Analyzes. Regarding the valency of Immunology, due to its extensive area, the document addresses the topic of Infectious

Serology in Maternity, namely in the search for the antibodies against *Toxoplasma gondii*, Cytomegalovirus and Rubella.

Introdução

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, realiza-se no último ano, um estágio curricular com os objetivos de solidificar os conhecimentos adquiridos ao longo dos dois anos de ensino, bem como:

- A obtenção de conhecimentos nas diferentes áreas de análises clínicas, graças à experiência profissional dos especialistas;
- A consciencialização da importância de um sistema de garantia de qualidade;
- A utilidade da aplicação de sistema de gestão da qualidade num laboratório;
- E ainda, a importância das análises clínicas como meio complementar do diagnóstico clínico.

Este estágio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Viana do Castelo, que pertence à Unidade Local de Saúde do Alto Minho (ULSAM). Este serviço é composto por três setores, nomeadamente Hematologia, Imunoquímica e Microbiologia. Durante a realização do estágio, tive a oportunidade de uma breve passagem pelo Serviço de Imunohemoterapia e o Serviço de Saúde Pública.

No decorrer do estágio realizei a rotina diária, integrando-me nas equipas de trabalho, obtendo o conhecimento básico de alguns equipamentos automatizados, bem como alguns métodos realizados manualmente.

O estágio teve a duração de cerca de seis meses, com início a 1 de dezembro de 2017 e terminou a 31 de maio de 2018, nos diferentes setores e serviços:

- Setor de Hematologia – 7 semanas;
- Setor de Imunoquímica – 7 semanas;
- Setor de Microbiologia – 4 semanas;
- Serviço de Imunohemoterapia – 1 semana;
- Serviço de Saúde Pública – 1 semana.

Ao longo do estágio desenvolvi este documento, referente ao relatório de estágio, para avaliação dos conhecimentos adquiridos durante este período. Para a realização do relatório, foi-me proposto a escolha de duas valências, nomeadamente Hematologia e Imunologia, sendo esta última direcionada, devido à sua diversidade dentro desta área, para Serologia Infeciosa na Maternidade.

Apesar de uma descrição mais detalhada destas duas valências, referencio os diferentes setores e serviços por onde passei, pois são igualmente importantes para os profissionais de Análises Clínicas.

O setor de Microbiologia realiza o estudo de potenciais microrganismos patogénicos, presentes nos doentes, e avalia a sua resistência a diferentes antimicrobianos. Neste setor existe uma grande variedade de amostras biológicas, por isso, existe um protocolo de processamento sequencial dessas amostras, consoante a análise prescrita, que visa uma obtenção de resultados no menor tempo possível com a garantia de qualidade necessária.

O Serviço de Imunohemoterapia é o serviço que gere as unidades de sangue do Hospital de Viana do Castelo, ou seja, efetua as colheitas aos doadores, separa os constituintes sanguíneos, identifica esses constituintes pelo fenótipo e genótipo protocolar e armazena-os. Quando necessários ou previamente solicitado, as unidades de sangue juntamente com a amostra do doente, são sujeitos a testes de compatibilidade. Após aceitação destes testes, as unidades de sangue prosseguem para uma possível transfusão sanguínea. Este processo é muito metucioso e tem um bom sistema de gestão, pois assegura de uma forma rápida as unidades necessárias a doentes em risco. Para além da gestão das dádivas de sangue, o laboratório é constituído por um espaço físico onde, para além da realização dos testes de compatibilidade, é um laboratório da hemostase e da biologia molecular, realizando estudos da coagulação e cargas virais, respetivamente.

Por último, mas não menos importante, o Serviço de Saúde Pública assegura a vigilância sanitária da ULSAM, nomeadamente os dois hospitais e centros de saúde do distrito de Viana do Castelo. Para além desta vigilância, analisa águas de piscinas municipais, escolas e particulares. Na época balnear, provêm amostras de rios, praias fluviais, entre outras... A vigilância sanitária baseia-se em provas físico-químicas e pesquisa de microrganismos patogénicos para identificação de possíveis águas contaminadas.

A seguir faço uma breve apresentação sobre a organização e funcionamento do laboratório onde realizei o estágio, seguido da descrição das duas valências, e finalizo com uma conclusão de todo este processo.

Caracterização do Laboratório de Estágio

A ULSAM, E.P.E, criada pelo Decreto-Lei 183/2008 de 4 de Setembro, é constituída por duas unidades hospitalares, uma localizada em Viana do Castelo e outra em Ponte de Lima, bem como 12 centros de saúde, uma unidade de saúde pública e duas unidades de convalescença, que cobre todos os habitantes do distrito de Viana do Castelo.

Na unidade hospitalar de Viana do Castelo, bem como no hospital Conde de Bertiandos, em Ponte de Lima, existem vários serviços que visam prestar diferenciados cuidados.

- ✓ Consulta externa;
- ✓ Urgência;
- ✓ Internamento;
- ✓ Cirurgia convencional ou cirurgia ambulatorio;
- ✓ Hospital dia;
- ✓ Meios complementares de diagnóstico e terapêutica.

Um dos meios complementares de diagnóstico e terapêutica é o Serviço de Patologia Clínica da ULSAM, da responsabilidade do Dr. Mota Freitas. Neste local são processadas amostras dos diferentes serviços anteriormente listados. Este serviço rege-se pela norma NP EN ISO 9001:2008, garantindo aos seus clientes e utentes um sistema de gestão de qualidade adequado ao laboratório de Análises Clínicas. No entanto encontra-se num processo de transição para a nova versão da norma portuguesa (NP EN ISO 9001:2015).

O processamento de uma amostra biológica tem início na requisição de análises pelo médico prescriptor através de uma plataforma *software*, o *SClinico* (restrito aos profissionais de medicina e enfermagem). A requisição das análises é inserida na plataforma do serviço de patologia clínica, ou seja, o *Clinidata XXI*, pelo pessoal administrativo e as amostras são separadas nos diferentes setores deste serviço para posteriormente serem processadas. Após obtenção dos resultados, estes são validados por profissionais especializados e disponibilizadas ao médico prescriptor (Figura 1).

No decorrer da validação podem surgir resultados críticos. O procedimento a seguir, nestas situações, para salvaguardar a segurança do utente, é a comunicação desses resultados ao médico prescriptor. Estes valores críticos estão ajustados quanto ao utente (consulta externa ou internamento/urgência e idade).

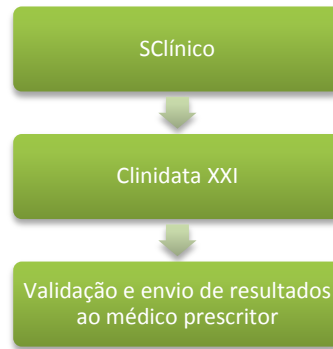


Figura 1 - Fluxograma dos *softwares* utilizados pelos profissionais de saúde.
Fonte: Elaborado pela autora.

No laboratório de Patologia Clínica da ULSAM a maior afluência de amostras ocorre durante a manhã, pois, para além das colheitas de urgência e Hospital Dia, ainda provêm amostras de doentes internados e utentes da consulta externa.

Para assegurar a qualidade dos resultados, os equipamentos automatizados dos diferentes setores do laboratório são controlados por um controlo interno, da mesma casa comercial ou outras, e um controlo externo de qualidade, que visa a verificação da exatidão dos resultados. Esta exatidão é conseguida através da comparação estatística dos resultados enviados de diferentes laboratórios que utilizam o mesmo método ou equipamento para realizar a análise. O controlo de qualidade externo é realizado numa calendarização própria por dois programas, nomeadamente o RIQAS e o UK NEQAS, nos diferentes setores do serviço de patologia clínica.

Os programas certificados do controlo de qualidade externo enviam amostras cegas que são processadas como uma amostra corrente. Após processamento das amostras, os resultados são enviados para esses laboratórios certificados que realizam uma estatística comparando esses resultados com os obtidos por outros laboratórios inscritos no programa. No final do processo é enviado um relatório quantificando o desempenho do laboratório e identifica desempenhos inadequados que necessitam de uma ação corretiva. Estes desempenhos inadequados deverão ser averiguados pelos profissionais de cada setor no sentido de corrigir possíveis erros ou implementar novas medidas que podem estar a comprometer a qualidade das análises efetuadas.

Setor de Hematologia Laboratorial

O setor de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Viana do Castelo é constituído por uma equipa formada por duas Técnicas Superiores de Ciências Farmacêuticas e duas Técnicas de Diagnóstico e Terapêutica. Este setor é composto por duas salas, uma de processamento de amostras e outra de visualização ao microscópio de esfregaços sanguíneos e de fluídos biológicos, oferecendo a realização das seguintes análises clínicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Análises clínicas realizadas no setor de Hematologia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Amostra biológica	Anticoagulante	Análise Clínica
Sangue total	Tubo com EDTA	Hemograma com eritroblastos Reticulócitos Esfregaço de sangue periférico Velocidade de sedimentação (VS) Eletroforese de hemoglobinas Hemoglobina glicada (HbA _{1c})
Líquido: <ul style="list-style-type: none"> • Pleural • Peritoneal • Sinovial 	Tubo com EDTA	Contagem total e diferencial de células (polimorfonucleares e mononucleares)
Sangue arterial	Seringas heparinizadas	Gasimetria arterial
Sangue venoso	Tubo com heparina lítio	Gasimetria venosa Cálcio ionizado
LCR	Tubo estéril	Contagem total e diferencial de células (polimorfonucleares e mononucleares)
Líquido: <ul style="list-style-type: none"> • Pleural • Peritoneal • Sinovial 	Tubo com heparina lítio	pH
Líquido seminal	Frasco estéril	Espermograma

Para tornar viável a determinação dos parâmetros realizados neste setor é necessário estabelecer um controlo de qualidade interno e externo. O controlo de qualidade interno é efetuado diariamente antes do processamento das amostras para a determinação da precisão dos resultados. Esta determinação é realizada a partir de uma matriz, com valores conhecidos, processada rotineiramente como um controlo e apresentando no *software* do equipamento automatizado, a sua *performance*. O controlo de qualidade externo assegura a *performance* inter-laboratorial, pois compara os resultados obtidos pelo laboratório de uma amostra cega com os resultados obtidos pelos laboratórios inscritos no mesmo programa de qualidade externa que utilizam o mesmo método ou equipamento. Este controlo de

qualidade externo é realizado em todos os equipamentos automatizados do setor de Hematologia, bem como os esfregaços de sangue periférico, pelos programas RIQAS e UK NEQAS.

Durante o estágio neste setor, com uma duração de 7 semanas, realizei o processamento de amostras nos diferentes equipamentos, bem como a execução de esfregaços sanguíneos. Tive a oportunidade de realizar a contagem diferencial de esfregaços de sangue periférico e de citoesfregaços, e ainda a observação de lâminas definitivas com o objetivo de aumentar a minha experiência na execução técnica, na observação ao microscópio e no diagnóstico laboratorial.

Hemograma

O hemograma é um exame laboratorial que abrange a contagem e morfologia dos constituintes do sangue que, anexado aos dados clínicos, fornece uma diversidade de informações, como o diagnóstico e evolução de doenças hematológicas, detecção de quadros infecciosos e monitorização terapêutica, desde que haja conhecimento das funções celulares e as bases fisiopatológicas das doenças.

No hemograma é realizado a contagem de células sanguíneas (leucócitos, plaquetas e eritrócitos, incluindo os índices hematimétricos) e a contagem diferencial dos leucócitos. Para além dos resultados quantitativos, poderá ser necessário avaliar a morfologia celular. Em situações de pós-cirurgia e pós-transfusão sanguínea, existem protocolos hospitalares de controlo do paciente, para a realização da contagem de células sanguíneas sem diferencial de leucócitos.

Sysmex NX-2000

O Sysmex NX-2000 é um sistema integrado de hematologia com dois módulos analíticos capazes de processar 200 amostras por hora (Figura 2). Fornece parâmetros avançados, para além dos comuns, incluindo eritroblastos, granulócitos imaturos e hemoglobina dos reticulócitos.

O dispositivo apresenta três métodos de análise para os diversos parâmetros calculados no hemograma, a focagem hidrodinâmica, a



Figura 2 - Equipamento automático Sysmex NX-2000.
Fonte: Site Sysmex.

citometria de fluxo com laser semiconductor e a determinação de hemoglobina (Hb) pelo surfactante, lauril sulfato de sódio (LSS). Para além da execução destes métodos, o equipamento ainda calcula os diferentes índices celulares.

A avaliação da contagem de eritrócitos e plaquetas, bem como do hematócrito (Ht) é realizada pelo método de focagem hidrodinâmica. Este processo ocorre dentro de um detetor formado por uma câmara cônica, onde a amostra, previamente diluída, é posicionada e alinhada de frente para o orifício (1). A amostra é então forçada a passar pela câmara, rodeada por reagente, e pelo orifício, na qual ocorre a contagem das células (1). Depois deste processo, a amostra retorna ao tubo coletor (1). Este método tem a vantagem de prevenir pulsos anormais, pois não ocorre retorno das células e o orifício permite a passagem linear da amostra. Os pulsos gerados pelos eritrócitos calculam o hematócrito. Os outros parâmetros relacionados com os rubros e as plaquetas são calculados por fórmulas matemáticas.

A apreciação física e química das células e outras partículas existentes na amostra é realizada pelo método de citometria de fluxo com laser semiconductor. Este processo consiste na passagem da amostra, diluída e corada, por uma célula de fluxo extremamente pequena, onde um laser semiconductor de uma única frequência (633 nm) é emitido. O *forward scatter light* é o detetor que está na linha do laser e mede o volume das partículas (1; 2). O *side scatter light* é o detetor que se encontra perpendicular ao laser e deteta a complexidade das células, como a granularidade, a forma do núcleo, entre outras características (1; 2). E finalmente existem detetores fluorescentes perpendiculares ao laser que fornecem informações sobre a estrutura física e química de cada partícula individual (1; 2).

O método para determinação de hemoglobina pelo surfactante LSS é efetuado pelo dispositivo automático. A amostra é aspirada e diluída, e na presença do reagente hemolítico ocorre a lise dos eritrócitos, alterando a conformação da proteína, bem como a oxidação do ferro e a formação do complexo hemoglobina-LSS (3). Este complexo é um composto colorido que é medido espectrofotometricamente, pela leitura da absorvância (3).

O Sysmex NX-2000 também fornece o cálculo de eritroblastos, ou seja, glóbulos vermelhos nucleados que são as células precursoras da linhagem dos eritrócitos. A presença destas células na corrente sanguínea em recém-nascidos é uma situação normal, mas quando surge em crianças mais velhas ou adultos são sugestivos de doença grave, como anemia, talassemias, doenças sistémicas hematológicas, entre outras...

Os índices hematimétricos são calculados automaticamente pelo autoanalisador a partir dos glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito, pelas seguintes fórmulas:

Volume corpuscular médio (VCM)

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Ht (\%)}}{\text{GV (10}^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

Hemoglobina corpuscular média (HCM)

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{GV (10}^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

Concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM)

$$\text{CHCM (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Ht (\%)}} \times 100$$

Para além do cálculo dos índices hematimétricos, existe um coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW, sigla em inglês) que traduz a variação de tamanhos das hemácias da amostra, verificando-se assim, a anisocitose das células. Este coeficiente é obtido pelo aparelho através do histograma do volume dos eritrócitos e expresso em percentagem.

Quanto aos reticulócitos (RET), existe um canal RET que apresenta um histograma, baseado na intensidade da fluorescência e *forward scatter light*, exibindo grupos de reticulócitos, plaquetas e hemácias. A razão e contagem dos reticulócitos são determinadas pelas seguintes fórmulas:

Razão de reticulócitos (%)

$$\text{RET(\%)} = \frac{\text{RET}}{\text{GV+RET}} \times 100$$

Contagem de reticulócitos

$$\text{RET} = \frac{\text{RET (\%)} \times \text{GV}}{100}$$

Este equipamento automatizado ainda determina o teor de hemoglobina dos reticulócitos que avalia a quantidade de ferro biodisponível para a eritropoiese. Esta avaliação fornece precocemente possíveis alterações no estado do ferro, sendo importante em doenças com carência de ferro, como a anemia ferropénica.

Para a contagem diferencial dos leucócitos existem três canais. O canal WNR que faz a contagem de glóbulos brancos e eritroblastos. O histograma representativo deste canal

exibe separadamente os eritroblastos, os basófilos, os detritos (GV hemolizados e plaquetas) e o grupo que inclui os linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, consoante intensidade da fluorescência e *forward scatter light*. O canal WDF classifica as diferentes células leucocitárias, exibindo no seu histograma os grupos representativos dos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos mais neutrófilos. O canal WPC deteta células imaturas, fornecendo um histograma onde se observam os vários grupos correspondentes a células imaturas, células anormais e leucócitos maduros. Estes dois últimos histogramas são representativos da intensidade da fluorescência e *side scatter light*.

Os exames realizados são enviados ao *software* EPU, que está configurado de acordo com as regras de validação automática a uso no serviço. Quando alguns parâmetros não estão conforme essas regras, o sistema informático desencadeia *flags* que permitem que o profissional analise a necessidade de realização de esfregaço de sangue periférico para corroborar os critérios a validar.

Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço sanguíneo complementa os dados do hemograma porque permite a visualização dos diferentes elementos figurados do sangue, bem como, a observação da presença de células incomuns na corrente sanguínea, como por exemplo, células imaturas, e ainda alterações morfológicas. Para além da observação realiza-se a contagem diferencial de leucócitos que inclui a contagem das células precursoras. No laboratório este processo é realizado quando prescrito pelo clínico ou devido a alarmes suspeitos dados pelo sistema EPU, sistema informático que sincroniza a informação do autoanalisador, histórico clínico do paciente e observação dos histogramas.

A técnica da realização do esfregaço sanguíneo começa pela homogeneização da amostra para que as células estejam bem distribuídas. De seguida, com a ajuda do acessório Haemo-Diff, liberta-se uma gota de sangue da amostra em cima de uma lâmina, devidamente identificada, e por fim realiza-se o



Figura 3 - Técnica utilizada para a execução de esfregaço de sangue periférico.

Fonte: Site Med Tech Invest.

esfregaço arrastando essa gota, ficando uma película fina, terminada numa cauda, de sangue (4). O acessório Haemo-Diff da SARSTEDT apresenta uma agulha de plástico que

penetra a membrana do tubo de sangue total com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), não havendo a necessidade de abertura dos tubos de colheita (Figura 3).

Depois de a lâmina estar seca, à temperatura ambiente, segue-se a coloração no corador automático Hematek. Um dispositivo de bancada que ao longo de um tapete transportador de lâminas, fixa com metanol e cora, segundo o método de Wright modificado, com uma combinação de azul-de-metileno e eosina (4).

Após a coloração do esfregaço de sangue, segue-se a observação ao microscópio ótico para a contagem do diferencial leucocitário e visualização da morfologia das células, bem como da análise das alterações nas três linhagens. Na série rubra é possível observar-se alterações morfológicas, como o tamanho e cor, assim como variações do estado de maturação e presença de inclusões. Na série branca realiza-se a contagem diferencial e analisa-se a displasia das células, bem como a sua maturidade. Finalmente, na linhagem plaquetária podem ocorrer alterações a nível do tamanho, a presença de agregados plaquetários e modificações do número de plaquetas presentes.

Algumas patologias conseguem ser diagnosticadas pela visualização de células anormais no esfregaço sanguíneo como a diferenciação de anemias, leucemias e outras patologias associadas aos elementos figurados do sangue.

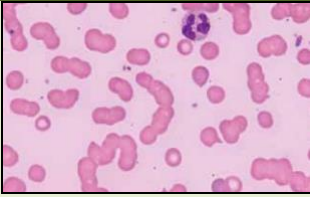
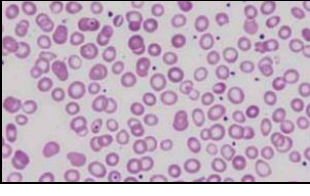
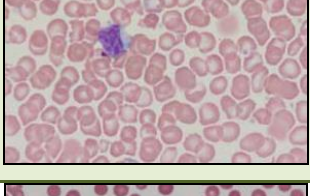
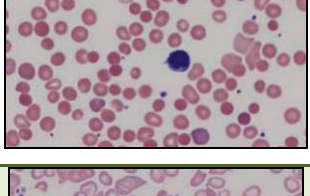
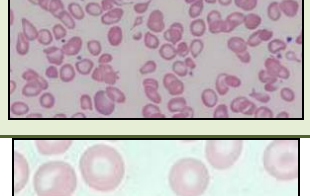
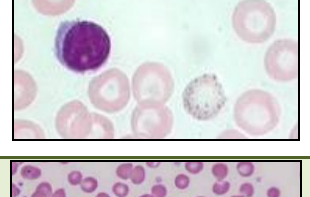
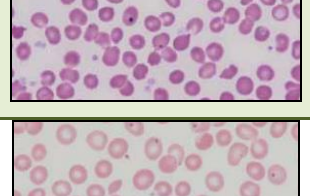
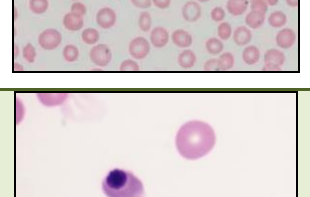
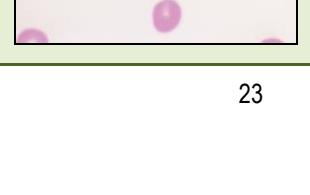
Alterações da Série Rubra

Os eritrócitos normais são caracterizados por células não nucleadas com a aparência de um disco bicôncavo, e um diâmetro de cerca de 7 a 8 μm . Estas células são as células maioritárias num esfregaço sanguíneo e numa coloração de Wright apresentam uma cor rosa a vermelho com o centro pálido.

De seguida apresento algumas das anomalias dos eritrócitos que podemos verificar em algumas situações anormais.

Tabela 2 - Algumas anomalias detetadas através da observação do esfregaço de sangue periférico.

Fonte: Elaborada pela autora. Imagens tiradas ao longo do estágio e do livro "Atlas of Pediatric Peripheral Blood Smears".

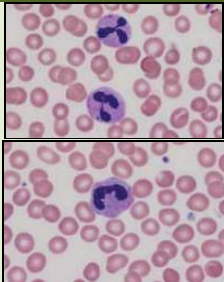

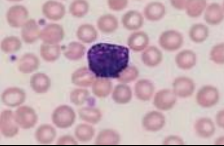
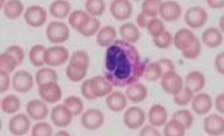
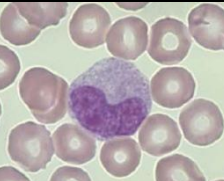
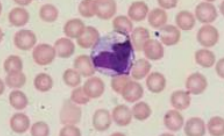

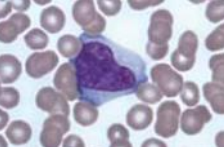
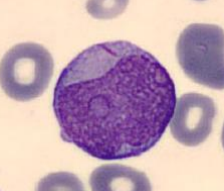
Alteração	Imagem	Observado em situações como...
<i>Rouleaux</i>		Infeção Inflamação Mieloma múltiplo
Microcitose		Anemia por deficiência de ferro Talassemia
Macrocitose		Anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico
Esferócitos		Esferocitose hereditária Anemia hemolítica autoimune
Dacriócitos		Anemia megaloblástica Mielofibrose
Pontuado basófilo		Intoxicação por chumbo Anemia megaloblástica Hemoglobinas instáveis
Corpos de Howell-Jolly (inclusões de DNA)		Anemia hemolítica grave
Corpúsculos de Pappenheimer (inclusões de hemosiderina granulares)		Anemia hemolítica grave Anemia sideroblástica
Eritroblastos (percursores dos eritrócitos)		Eritropoiese hiperplásica Infiltração na medula óssea

Alterações da Série Branca

A série branca é caracterizada por vários tipos de células, como os granulócitos, que incluem neutrófilos, basófilos e eosinófilos; os monócitos e os linfócitos. A tabela 3 inclui uma breve referência a essas células e a algumas patologias associadas a alterações das células da série leucocitária. Ainda é possível observar precursores na corrente sanguínea.

Tabela 3 - Células da série leucocitária e possíveis patologias associadas a alterações destas células.

Fonte: Elaborada pela autora. Imagens tiradas ao longo do estágio e do livro "Atlas of Pediatric Peripheral Blood Smears".

Tipo de célula	Imagem	Alterado em situações como...
Neutrófilos (em banda e/ou segmentados)		Neutropenia (diminuição ou consumo do número de neutrófilos): Uso de drogas; Síndromes mielodisplásicas. Neutrofilia (aumento do número de neutrófilos): Doenças infecciosas bacterianas; Doenças inflamatórias.
Neutrófilos hipersegmentados		Hematopoiese megaloblástica devido a deficiência de vitamina B12, folato ou efeito de agentes quimioterápicos.
Basófilos		Aumento do número de basófilos: Leucemia mieloide crónica; Reações de hipersensibilidade; Hipotireoidismo.
Eosinófilos		Eosinofilia (aumento do número de eosinófilos): Alergias; Infeções parasitárias; Infeções; Leucemia aguda; Doença mieloproliferativa; Abuso de drogas.
Metamielócito (percursor de granulócitos)		Presenças de células imaturas, como o metamielócito, podem ser sugestivas de processos infecciosos ou leucemias.
Monócitos		Monocitose (aumento do número de monócitos): Infeção crónica, como a tuberculose; Neutropenia benigna. Monocitopenia (diminuição do número de monócitos): Anemia aplásica.
Linfócitos		Linfócitos atípicos: Infeções víricas. Linfocitose (aumento do número de linfócitos): Mononucleose infecciosa; Linfocitose infecciosa aguda.
Linfócitos reativos		Mononucleose infecciosa; Doenças virais em crianças.
Corpos de Auer (observados em blastos)		Blastos sugestivos da série mieloide. Podem ser observados em situações como a leucemia mieloide aguda.

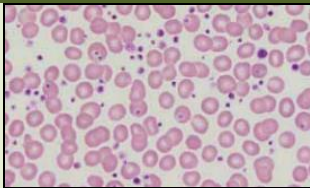
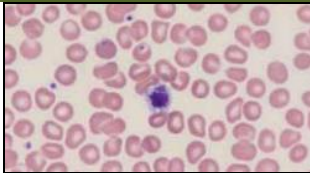
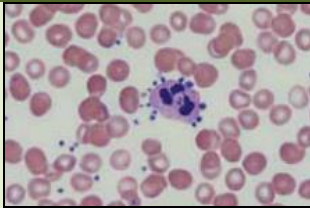
Alterações da Série Plaquetária

As plaquetas derivam de fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos e apresentam-se no sangue periférico como pequenas células não nucleadas com um diâmetro de 1,5 a 3µm.

As alterações observadas na série plaquetária são: agregados plaquetários, plaquetas gigantes, satelitismo plaquetar, entre outras. Os agregados plaquetários determinam falsamente a contagem de plaquetas pelo autoanalisador e deve ser confirmado por esfregaço. Esta situação pode dever-se a imunoglobulinas presentes na corrente sanguínea do paciente que após colheita ocorre esta agregação. A colheita deverá ser realizada num tubo especial, o Tromboexact.

Tabela 4 - Anomalias detetadas na série plaquetária.

Fonte: Elaborada pela autora. Imagens tiradas ao longo do estágio e do livro "Atlas of Pediatric Peripheral Blood Smears".

Alteração	Imagem	Observado em situações como...
Trombocitose		Trombocitose reativa em situações de pós-infecção, inflamação, doenças crónicas, entre outras...
Plaquetas gigantes		Doença mielodisplásica Trombocitopenia hereditária
Satelitismo plaquetar		Quando associado a um processo de diminuição de produção: Infeções virais; Leucemia aguda; Anemia aplásica. Quando associado a um aumento de destruição: Trombocitopenia imune.

Fluidos Biológicos

Os fluidos biológicos servem de meio para transportar nutrientes e resíduos de produtos das células, bem como uma via para os comunicadores químicos coordenarem as

atividades entre as células (5). Dito isto, a análise química dos fluídos biológicos é de extrema importância para os profissionais de saúde no diagnóstico de certas doenças (5).

Líquido cefalorraquidiano

O estudo do líquido cefalorraquidiano (LCR) é útil para interpretar e ajudar no diagnóstico de doenças infecciosas e não infecciosas, tais como doenças inflamatórias, neoplásicas, degenerativas, meningoencefalite aguda, meningite aguda e crónica (6; 7).

O LCR é formado nos plexos coroides, nos ventrículos do cérebro. Circula pelo espaço subaracnoide tendo como funções fisiológicas o fornecimento de nutrientes, bem como a remoção de produtos metabólicos do sistema nervoso central, e representa uma barreira amortecedora contra traumas no cérebro e medula espinal, entre outras funcionalidades (8; 9). A sua produção é de sensivelmente 20mL por hora, sendo o volume normal em adultos de 125 a 150mL (8; 9).

Quando chega ao laboratório uma amostra de um líquido a conduta para processar o exemplar é a apreciação macroscópica da amostra e a contagem de células em câmara de Neubauer. A análise macroscópica da amostra baseia-se essencialmente na cor e aspeto. Um líquido normal é límpido e transparente, enquanto na presença de patologias, o líquido pode apresentar-se xantocrómico, ou seja, amarelado, que pode ter como causa a presença de produtos da degradação de eritrócitos, bem como presença de bilirrubina e/ou grande quantidade de proteínas. A amostra de um líquido poderá aparecer avermelhada que geralmente indica a presença de hemácias. A presença destas pode ser causa de uma hemorragia subaracnoídea, uma hemorragia intracerebral, um infarto ou uma punção traumática (8; 9).

Na câmara de Neubauer devidamente preparada, depositam-se 10 μ L de amostra homogeneizada de ambos os lados de cada retículo (5). No microscópio em objetiva de 10x, realiza-se uma visão geral dos quadrantes da câmara para determinar se há presença de células, pois é uma amostra biológica estéril, ou seja, fluídos biológicos com pouca ou nenhuma presença de células (5). Em objetiva de 40x procede-se à contagem de células presentes, nomeadamente o apuramento de leucócitos (células granuladas), eritrócitos (células vazias) e crenócitos (eritrócitos dismórficos - crenados) (5). Se existe muitas células será realizada a contagem num quadrante ($V=0,1\mu$ L), sendo necessário verificar os outros 3

quadrantes. Caso apresente poucas células deve-se fazer a contagem nos 4 quadrantes e calcular a média de células por microlitro, para tal aplica-se a seguinte fórmula (5; 8):

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Diluição}}{\text{Número de quadrantes contados} \times \text{Volume do quadrante}} = \text{Células}/\mu\text{L}$$

Se a contagem de leucócitos for superior a 10 WBC/ μ L procede-se à realização do citoesfregaço do líquido para fazer a contagem diferencial (5).

O citoesfregaço é realizado com a ajuda do citofunil descartável e a citocentrífuga Shadon Cytospin 2. Após a amostra estar homogeneizada, coloca-se o citofunil na lâmina de vidro e deposita-se algumas gotas da amostra no funil. Após a centrifugação, as células do líquido vão concentrar-se em monocamada, num diâmetro de 6mm da lâmina, enquanto o fluido é absorvido pelo papel de filtro (6; 8). Na citocentrífuga o ciclo deverá ocorrer durante 5 minutos a 800rpm, um ciclo lento para que não haja destruição celular. De seguida, destaca-se a lâmina do citofunil muito delicadamente e deixa-se secar para posterior coloração no corador automático anteriormente discutido (6).

No microscópio ótico, realiza-se então a contagem diferencial como células mononucleares (linfócitos e monócitos) ou células polimorfonucleares (neutrófilos). Uma contagem diferencial com um aumento de neutrófilos, linfócitos e monócitos fornece informação sobre o tipo de microrganismo que está a causar a infeção das meninges, ou seja, um aumento de neutrófilos pressupõe-se uma meningite bacteriana, e um predomínio de linfócitos e monócitos sugere uma meningite de origem viral, tuberculosa, fúngica ou parasitária (5).

Líquido Pleural, Líquido Peritoneal e Líquido Sinovial

Os fluidos apresentados de seguida referem-se a líquidos que se acumulam nas diversas cavidades do corpo, como o líquido pleural (cavidade pulmonar), o líquido peritoneal (cavidade abdominal) e o líquido sinovial (articulações do corpo). Normalmente o fluido é um ultrafiltrado do plasma e está presente nestas cavidades com a função de lubrificar as membranas envolventes.

Um aumento destes fluidos pode estar associado a doença ou ferimento. São classificados em transudatos ou exsudatos, ou seja, os transudatos estão associados a uma

desordem sistémica que perturba o equilíbrio hidrostático, enquanto os exsudatos estão relacionados com infeções e neoplasias que envolvem diretamente as membranas da cavidade (10).

O aumento de líquido pleural e peritoneal pode ocorrer devido a inflamação, diminuição da proteína plasmática, insuficiência cardíaca congestiva ou diminuição da drenagem linfática. Enquanto, o aumento do líquido sinovial nas articulações é observado em patologias como gota e pseudogota.

A colheita destes produtos biológicos é feita em tubo de EDTA para determinar a contagem e diferenciação celular. A amostra quando chega ao laboratório é avaliada o seu aspeto macroscópico, como a cor, e é registado no EPU. No caso de um fluido normal a cor varia entre incolor e amarelado, e na presença de patologia, apresenta uma cor avermelhada ou purulenta. Numa situação de um líquido de aspeto purulento está associada a uma infeção, enquanto na presença de um líquido avermelhado pode estar relacionado com um trauma ou neoplasias. No caso de líquido avermelhado, o líquido pleural pode ser sugestivo de infarto pulmonar, enquanto no líquido peritoneal pode ocorrer devido a infarto intestinal, pancreatite, rutura do fígado ou baço.

Após observação macroscópica, processa-se a amostra no autoanalisador Sysmex NX-2000 no modo para líquidos biológicos e, se a contagem de células totais for superior a 100 células/ μL , avança-se para a execução do citoesfregaço, descrito anteriormente.

No fluido pleural pode ocorrer aumento de células, como por exemplo, aumento de linfócitos ou eosinófilos, entre outras... A presença elevada de linfócitos deve-se a doenças como tuberculose, infeções virais, tumores e doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistémico (8). Estes linfócitos apresentam uma grande variedade de formas, nucléolos proeminentes e núcleos clivados (8). Poderá ocorrer um aumento do número de eosinófilos que está associado a uma reação alérgica, infeção parasitária ou infeção fúngica, bem como, em caso de pneumonia eosinofílica crónica (11). A presença de células mesoteliais aumentadas não é uma situação significativa, mas normalmente verifica-se em caso de pneumonia e tumores (8).

Quanto ao líquido peritoneal, os transudatos podem ter origem no aumento de alterações hepáticas, como a cirrose (8). Em exsudatos, a razão poderá ser resultado de uma perfuração intestinal ou rutura do apêndice (8).

O líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma com presença de ácido hialurônico, que fornece nutrientes à cartilagem e lubrifica as articulações. Normalmente, este líquido é viscoso e incolor, e apresenta poucos leucócitos que na maioria são linfócitos.

Em caso de patologia, tem uma aparência amarelada ou turva, e neutrófilos aumentados. Uma particularidade deste líquido biológico é a presença de cristais, nomeadamente uratos monossódicos (MSU) e pirofosfatos de cálcio (CPPD), entre outros (5; 8). A presença destes cristais no fluido distingue uma situação de gota e pseudogota, ou seja, os cristais MSU estão presentes no caso de gota e os cristais CPPD na pseudogota.

O urato monossódico resulta do metabolismo deficiente de purinas, aumento do consumo de substâncias ricas em purina, tratamento quimioterápico de leucemias, diminuição de excreção renal deste cristal, álcool e frutose (8). Em relação ao pirofosfato de cálcio, a presença destes cristais deve-se a uma situação de artrite degenerativa, ou seja, calcificação da cartilagem e perturbações endócrinas que produzem níveis elevados de cálcio (8).

No microscópio os cristais MSU aparecem em forma de agulha e podem ser localizados dentro do citoplasma dos neutrófilos ou no espaço extracelular (5; 8). Os cristais CPPD geralmente surgem em forma de rombo, localizados normalmente dentro de vacúolos dos neutrófilos (5; 8). Para evitar falsas identificações, os cristais devem ser observados em microscopia de luz polarizada compensada (5; 8). Neste microscópio é colocado um filtro, chamado polarizador, entre a fonte de luz e a lâmina.

No microscópio de luz polarizada compensada, ambos os cristais têm a capacidade de polarizar a luz, mas o MSU é mais brilhante contra um fundo escuro (5). Neste microscópio observam-se cores diferentes para os dois tipos de cristais, devido à birrefringência que cada um proporciona, ou seja, no caso de cristais MSU a birrefringência é negativa e por isso observa-se uma coloração amarela, correspondente à luz que atravessa paralelamente ao longo do eixo, enquanto os cristais CPPD apresentam uma birrefringência positiva observada pela cor azul devido à luz que corre perpendicularmente ao longo do eixo (5; 8) (Figura 4).



Figura 4 - A cor e forma dos cristais num microscópio de luz polarizada compensada com o eixo de polarização fixo.

Fonte: Programa de Formação Continuada a Distância 2015 – AEFA.

Eletroforese de Hemoglobinas

A hemoglobina (Hb A) é uma proteína tetramérica encontrada nos glóbulos vermelhos, composta por duas cadeias alfa e duas cadeias beta, cada uma com cerca de 141 aminoácidos, tendo uma função fundamental de transportar o oxigénio (Figura 5) (12; 13). Para além da hemoglobina A, existem outras hemoglobinas, nomeadamente, a hemoglobina fetal (HbF) e a hemoglobina A₂ (HbA₂) (13).

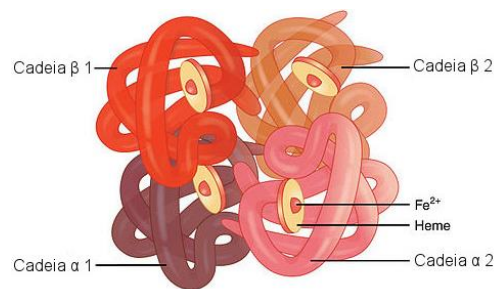


Figura 5 - Estrutura da hemoglobina.

Fonte: Site InfoEscola.

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias, ou seja, alterações genéticas que afetam a síntese ou estrutura de uma ou mais cadeias da hemoglobina. Se ocorre perturbações ao nível da síntese, estamos perante uma hemoglobinopatia quantitativa, comumente denominada talassemia, mas caso seja uma alteração ao nível da estrutura, estamos perante hemoglobinopatias estruturais (14).

O equipamento automatizado presente neste setor de hematologia, o Adams A1c HA-8160, realiza a cromatografia de troca iónica em fase inversa no modo talassemia, ou seja, para além do cálculo da hemoglobina glicada, é possível identificar alterações estruturais e alterações da síntese de hemoglobina. A alteração estrutural é observada a partir do gráfico da cromatografia onde podemos identificar picos anormais, necessitando de mais estudos para identificar a hemoglobina anormal presente.

Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada é formada quando existe ligação de glicose a um ou ambos os N-terminais das valinas presentes nas cadeias β (13). Esta proteína resulta de duas reações: uma enzimática e reversível (glicosilação), e outra não enzimática, lenta e irreversível (glicação) (15). A glicosilação é uma reação que por meio de glicosiltransferases forma-se uma HbA1c instável, enquanto a glicação, posterior à glicosilação, é uma reação entre a glicose que circula no sangue e os grupos aminas livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos (15).

A determinação de hemoglobina glicada é fundamental para a monitorização de doentes com diabetes mellitus, sendo representativo do valor médio de glicose no sangue dos últimos 2-3 meses (corresponde ao tempo médio de vida dos eritrócitos, cerca de 120 dias) (15; 16). É, portanto, um índice de controlo glicémico (valor médio de 6.5%), que evita o problema da variabilidade do dia-a-dia de valores de glicose (13; 16).

Adams A1c HA-8160

Adams HA-8160 é um analisador automático em modo talassemia, que determina a hemoglobina glicada pelo método de cromatografia de troca iónica em fase inversa (método HPLC) (17). Neste método, as hemoglobinas são absorvidas por uma coluna de resina carregada negativamente (fase estacionária) e depois diluídas da coluna por uma solução carregada positivamente (14). Esta solução é adicionada gradualmente e compete para a ligação à coluna de resina. Os padrões de eluição resultantes (picos de Hb) são representados graficamente em janelas definidas com base no tempo de retenção (14). A leitura das frações da hemoglobina é realizada a dois comprimentos de onda, 415nm e 500nm (18). Este equipamento utiliza um volume de 4 μ L de amostra de sangue total com EDTA, que ao passar por este analisador é automaticamente hemolisado (18).

Os resultados são apresentados em percentagem de hemoglobina glicada (% HbA1c), percentagem de hemoglobina α -1 (%HbA1), hemoglobina α -2 (%HbA2) e percentagem de hemoglobina fetal (%HbF), calculados a partir de áreas dos diferentes picos das frações de hemoglobina como uma percentagem da hemoglobina total (18).

Para o controlo de qualidade da determinação laboratorial da HbA1c, este analisador apresenta um controlo de qualidade interno de dois níveis, isto é, duas amostras de sangue humano liofilizado que não contém frações lábeis (18).

Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é um marcador não específico de inflamação, medindo a rapidez com que os eritrócitos sedimentam sobre o efeito da gravidade (19). Esta prova revela duas frações principais no tubo, sendo a inferior composta por hemácias e a superior pelos restantes constituintes sanguíneos.

O resultado desta análise clínica pode alterar devido a certas propriedades físicas e químicas dos eritrócitos, idade, sexo, raça, medicação e estádios de doença, como o caso de obesidade (devido em parte à produção de interleucina-6 pelo tecido adiposo), grau de anemia, hipofibrinogénemia e insuficiência cardíaca congestiva (19; 20). A tendência é que os glóbulos vermelhos se acondicionem devagar devido à sua grande relação superfície-volume e à repulsão mútua dos eritrócitos por possuírem cargas negativas na superfície, resistindo assim à sedimentação (20).

O valor da VS pode ser influenciado por algumas proteínas (por exemplo, o fibrinogénio e as imunoglobulinas) cuja sua concentração plasmática altera em situações inflamatórias (19; 20). Estas glicoproteínas, principalmente o fibrinogénio, são as maiores contribuidoras para a aglutinação e formação de *rouleaux*, pois neutralizam as cargas negativas das superfícies dos eritrócitos (19; 21; 22). A aglutinação e a formação de *rouleaux* aumentam a VS, sendo comum, por exemplo, na inflamação crónica devido ao aumento de fibrinogénio como reagente de fase aguda e o aumento de gamaglobulinas no mieloma múltiplo (22).

Em infeções agudas ou crónicas, a VS pode apresentar valores muito elevados, ocorrendo em casos de leucemia, linfoma, carcinomas da mama, entre outras situações patológicas (22).

Ves-Matic Cube 30

O Ves-Matic Cube 30 é um dispositivo de bancada programado para determinar a velocidade de sedimentação até um máximo de 30 amostras de sangue. O exame é executado em completa automação (agitação e leitura) e os resultados são comparáveis com os obtidos pelo método de Westergren modificado, mas com uma duração de 33 minutos.

O método de Westergren é o método manual utilizado na velocidade de sedimentação (Figura 6). Num tubo de sangue total com EDTA, introduz-se um tubo de Westergren que irá criar vácuo, fazendo com que o sangue fique posicionado verticalmente ao longo do tubo específico. Após uma hora, efetua-se a leitura em milímetros entre o menisco do plasma e o nível da coluna dos eritrócitos sedimentados (19; 20; 22). Este método manual é realizado no laboratório quando as amostras apresentam insuficiência de sangue para a realização do exame automático.



Figura 6 - Método manual de Westergren.
Fonte: Site Dilabo, s.a.

A determinação da VS é efetuada sem consumo de amostra, utilização de reagentes ou produção de resíduos. As amostras são submetidas a uma avaliação padronizada da precisão e exatidão dos resultados por controlo de qualidade. O controlo de qualidade interno deste equipamento é realizado semanalmente para averiguar a eficácia de leitura do sensor ótico.

Gasimetria

A gasimetria é um exame com a finalidade de avaliar a ventilação, oxidação e/ou o estado ácido-base (23). As amostras que chegam ao laboratório provêm de colheitas em seringas heparinizadas com sangue arterial, e tubos com heparina lítio, no caso de sangue venoso.

A análise clínica de uma amostra de sangue arterial pode ser difícil de obter devido a uma baixa pressão sanguínea, ou ao movimento do paciente associada à dor que resulta da colheita por punção arterial (24; 25). No caso de uma colheita de sangue venoso, os locais onde a amostra pode ser colhida são punção periférica venosa, cateter de sangue venoso central e cateter de artéria pulmonar (26).

A prescrição da medição de gases do sangue arterial é devida principalmente quando há suspeita de hipercapnia em pacientes estáveis, ou seja, a presença excessiva de CO₂. Estes utentes apresentam uma história clínica associada, por exemplo uma doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) avançada, para além de um nível elevado de bicarbonato e/ou carência de oxigénio no sangue arterial (hipoxia) (27). No caso de um tubo com heparina lítio de sangue venoso é calculado o cálcio ionizado.

A gasimetria é um conjunto de medições de vários parâmetros: pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂), ião bicarbonato (HCO₃⁻), pressão parcial de oxigénio (pO₂), concentração de oxigénio (ctO₂), saturação de oxigénio (SO₂), hemoglobina total (tHb), oxihemoglobina (O₂Hb), carboxihemoglobina (COHb), metahemoglobina (MetHb), desoxihemoglobina (HHb), glicose, lactato, sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cálcio (Ca²⁺) e cloro (Cl⁻). O interesse clínico destas medições é aclarado de seguida.

As medições do pH extracelular e do bicarbonato são importantes para a deteção de alterações ácido-base intracelular que estipulam verdadeiras causas patológicas (28). Estes dois parâmetros correlacionam-se e auxiliam na identificação da existência de uma acidose ou alcalose metabólica, estando relacionados com o funcionamento renal (28). O pH ainda pode ser necessário para analisar perturbações nas vias respiratórias (28).

Quanto à pressão parcial do dióxido de carbono está dependente do funcionamento dos pulmões e da eliminação de CO₂. As alterações deste parâmetro permitem inferir uma alteração do estado respiratório, bem como, alterações ácido-base (28).

Em relação à concentração de oxigénio no sangue, esta espelha as alterações de todos os parâmetros que compõem a avaliação do fornecimento de oxigénio, nomeadamente a pO₂ arterial, a concentração de hemoglobina e a afinidade da hemoglobina para o oxigénio (28). A pressão parcial de oxigénio no sangue arterial é um parâmetro muito importante porque alterações no funcionamento dos pulmões é indicativo da incapacidade de enriquecer o sangue com oxigénio (28).

Relativamente à saturação de oxigénio, esta avalia a capacidade dos pulmões fornecerem oxigénio ao sangue, bem como permite a apreciação da oxigenação e dissociação da oxihemoglobina. Para este cálculo são utilizadas as frações O₂Hb e HHb.

Quanto à oxihemoglobina é dada através da relação entre a hemoglobina oxigenada e a hemoglobina total. A hemoglobina tem uma afinidade 300 vezes superior a CO do que o oxigénio, logo será de esperar uma diminuição da oxihemoglobina quando existem pacientes fumadores crónicos, habitantes de grandes cidades com muito trânsito automóvel e

trabalhadores em indústrias pesadas, havendo um aumento de carboxihemoglobina. Este último parâmetro, bem como a metahemoglobina, em grandes concentrações dificultam ou impedem a capacidade da hemoglobina se ligar ao oxigênio, podendo originar hipoxias e cianoses (28).

Em relação à determinação da glicose no sangue é um dos parâmetros mais determinados nos laboratórios, pois existe um contínuo aumento das doenças do metabolismo dos hidratos de carbono, bem como uma crescente qualidade nos métodos para a sua determinação (28). O cálculo da concentração de lactato no sangue é conveniente para a avaliação do fornecimento de oxigênio aos tecidos. Concentrações elevadas de lactato podem dever-se a uma carência de oxigênio acrescida, e pode provocar uma acidose láctica grave (28).

A regulação dos líquidos corporais, a manutenção do potencial elétrico nas células musculares e o controlo da permeabilidade das membranas celulares é da responsabilidade do sódio. Alterações neste elemento químico resultam do consumo ou eliminação desadequado, normalmente associado ao desequilíbrio da água. Numa situação de hipo ou hipernatrémia poderá ocorrer variação da consciência, convulsões e vômitos (28). Estes desequilíbrios também alteram o cloreto, mas pode ocorrer uma situação isolada de diminuição do cloreto devido a perturbações do estado ácido-base. O cloreto é substituído por bicarbonato através da excreção renal, logo as suas concentrações alteram-se de uma forma proporcionalmente inversa. Mas no caso das gasimetrias, a análise do cloreto é útil para o cálculo do hiato aniônico, ou seja, diferença entre os catiões e os aniões, normalmente avaliado para medir aniões não determináveis (28). Quanto às alterações no metabolismo do K^+ (hiper ou hipocalemia) constituem sempre perigo de morte, pois podem surgir devido a consumo ou eliminação desajustada de K^+ , e ainda, devido a instabilidade entre o espaço extracelular e intracelular. A monitorização da concentração de potássio é utilizada especialmente em pacientes com alterações do ritmo cardíaco, insuficiência renal aguda, pacientes pré-operatórios, tratamentos com diuréticos e diálise (28).

O cálcio representa um papel fundamental em várias atividades vitais do nosso organismo, como a conversão de impulsos nervosos em atividade muscular e regulação da permeabilidade das membranas a outros iões. Atua também ao nível da coagulação, atividade enzimática e distribuição de hormonas, como a adrenalina. Como acontece nos elementos químicos anteriormente descritos, o desequilíbrio do cálcio ocorre pela

instabilidade no consumo e eliminação, ou alterações no reservatório de cálcio, sendo um elemento importante de análise e monitorização devido ao seu largo espectro de ação (28).

Instrumentation Laboratory GEM 3500/4000

O GEM 3500 e o GEM 4000 são os dois dispositivos presentes no laboratório de Hematologia para o cálculo de gases e outros parâmetros do sangue. Para além disso, apresenta um controlo de qualidade interno automático, o iQM, um processo em tempo real que deteta automaticamente erros, corrige e documenta todas as ações de correção. É executado entre amostras e sempre que o cartucho de reagentes, independente, é renovado.

Existem quatro sensores de medição para calcular os parâmetros da gasimetria. Os sensores potenciométricos calculam o pH, $p\text{CO}_2$, Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Os sensores amperimétricos medem a glucose, lactose e $p\text{O}_2$. A condutividade do sangue calcula o hematócrito da amostra e por fim, por espectrofotometria, depois da amostra lisada, avalia-se os parâmetros de CO-oximetria em vários comprimentos de onda. É de extrema importância que a amostra seja bem homogeneizada antes de ser processada nestes equipamentos.

Os sensores potenciométricos têm como base uma célula eletroquímica constituída por uma meia célula em combinação com um eléctrodo de referência. Este eléctrodo está envolvido numa solução tampão, tendo uma membrana permeável específica que separa a amostra da solução. Se a amostra entrar em contacto com a membrana do eléctrodo forma-se um potencial de membrana. A diferença de potencial ocasionada é proporcional à concentração do parâmetro que está a ser determinado. Finalmente, no voltímetro é comparado a diferença de potencial ocorrida e o potencial constante do eléctrodo de referência. O potencial final reflete a concentração do parâmetro da amostra. Em cada parâmetro que utilize este método existem algumas alterações, como por exemplo, o elemento químico que constitui o eléctrodo, ou o tipo de membrana permeável, entre outras.

Quanto aos sensores amperimétricos apresentam uma célula eletroquímica constituída por dois ou mais eléctrodos, consoante o tipo de parâmetro que está a ser calculado. Esta célula é banhada por uma solução de eletrólitos e também apresenta uma membrana permeável. No caso da $p\text{O}_2$, o oxigénio é reduzido no cátodo e é essa quantidade

reduzida que é diretamente proporcional ao número de eletrões da amostra (28). No caso da avaliação de glicose e lactato, estamos perante uma reação enzimática em que ambos são oxidados e dessa reação resulta eletrões que aumentam o fluxo de corrente que é proporcional à concentração de glicose ou lactato na amostra. Como dito anteriormente, em cada parâmetro, as membranas, os elétrodos entre outras estruturas são específicas de cada fator (28).

Controlo de Qualidade

Os equipamentos automáticos do setor de Hematologia apresentam um controlo de qualidade interno para verificar, rotineiramente, a precisão dos resultados. Os resultados do controlo são registados e confere-se se estão dentro dos limites de aceitação do próprio dispositivo.

O controlo de qualidade externo permite uma comparação dos resultados da mesma amostra, executada por equipamentos e metodologias diferentes, de vários laboratórios que recorrem a programas de avaliação externa da qualidade certificados. Nestes programas de avaliação da qualidade externa afere-se a precisão e exatidão dos equipamentos e metodologias utilizadas. Assim o objetivo desta avaliação é promover resultados mais fidedignos aos utentes.

Estes serviços enviam os controlos para serem processadas como amostras de rotina. No Sysmex, no Adams, no Ves Matic e no GEM a verificação é acompanhada pelo RIQAS (Random International Quality Assessment Scheme). Para além do RIQAS, o laboratório ainda conta com a avaliação do UK NEQAS (External Quality Assessment Services). Este serviço envia, dois esfregaços de sangue periférico para avaliação da morfologia celular. Numa das lâminas, devidamente identificada, acrescenta, para além da avaliação da morfologia, a contagem diferencial leucocitária (40). Os resultados são discutidos com todos os profissionais do laboratório de hematologia e enviados nas datas definidas.

Os resultados obtidos são agrupados de acordo com os equipamentos automáticos utilizados e metodologias executadas, procedendo-se a cálculos estatísticos. Esta estatística define a exatidão dos resultados e são enviados aos respetivos laboratórios participantes, o relatório. Caso os resultados enviados não estejam de acordo com esse relatório é necessário procurar entender e resolver possíveis causas.

Setor de Imunoquímica Laboratorial

O setor de imunoquímica laboratorial é constituído por uma equipa de dois Técnicos Superiores de Ciências Farmacêuticas e quatro Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica. Este setor é composto por três espaços físicos. Isto é, um espaço amplo onde se realizam as diferentes determinações analíticas de bioquímica e imunologia; um espaço mais reduzido onde se realiza as determinações analíticas de outros produtos biológicos, como urina e fezes, bem como a realização da serologia manual em tubos de soro/plasma. Existe ainda uma zona onde se efetua a triagem das amostras biológicas. Antes das amostras serem utilizadas nos diferentes equipamentos e/ou metodologias, para cada parâmetro prescrito, estas necessitam de passar pela triagem.

A triagem das amostras inicia-se após a entrada dos produtos biológicos na receção do laboratório de patologia clínica que é feita pelos administrativos. Na chegada dos tubos de soro à zona de triagem são verificadas as requisições das amostras, e caso seja necessário, depois de centrifugadas, o soro é separado em alíquotas. Esta triagem poderá ser realizada manualmente ou automaticamente (Tabela 5). A triagem automática é realizada pelo equipamento TECAN.

Tabela 5 - Tubos identificados nas várias secções de colheita e triados automaticamente ou manualmente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Triagem Automática (TECAN)	Triagem Manual
<ul style="list-style-type: none"> • Consulta externa 	<ul style="list-style-type: none"> • Urgência
<ul style="list-style-type: none"> • Internamento 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuidados intermédios
<ul style="list-style-type: none"> • Serviço de sangue 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuidados intensivos
<ul style="list-style-type: none"> • Extensão da ULSAM, o Hospital Conde de Bertiandos, em Ponte de Lima 	<ul style="list-style-type: none"> • Unidade polivalente (OBS)
	<ul style="list-style-type: none"> • Unidade de AVC
	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos prioritários (por exemplo, utentes que estão a fazer tratamento quimioterápico)

Os tubos para triagem manual são triados pelo sistema informático *Clinidata XXI*. As etiquetas necessárias para separação do soro são impressas e a amostra depois de centrifugada a 4000rpm durante 10 minutos, é separada em alíquotas identificadas. Consoante a separação realizada, os tubos correspondentes a pedidos mais específicos, e

que não são realizados rotineiramente, são refrigerados ou congelados para posterior análise.

Na rotina do departamento de imunoquímica realizam-se testes de bioquímica geral e imunologia. Os principais equipamentos onde se realizam estas análises são os Architect da ABBOTT®. O departamento de imunoquímica é composto por dois Architect ci8200 e um Architect i2000 que estão sincronizados para conseguir obter a determinação de um maior número de parâmetros, no menor tempo possível. Caso haja necessidade, estes equipamentos têm a facilidade de serem configurados com quaisquer parâmetros.

Para além da determinação de parâmetros em amostras de soro e plasma, ainda existe um espaço físico em que se realiza outras determinações principalmente em amostras de urina e fezes. Neste espaço, é possível realizar-se a sumária de urina, sedimento urinário, preparação de amostras de fezes para o cálculo de calprotectina, bem como exames imunocromatográficos, como o sangue oculto nas fezes, o teste de gravidez e a pesquisa de drogas, e ainda, a serologia manual, como o teste de Gruber-Widal, o teste VDRL, entre outros...

O estágio neste setor decorreu ao longo de 7 semanas. Neste período, foi possível integrar-me na equipa, realizando a rotina diária deste setor. No setor de Imunoquímica tive um maior contacto com o controlo de qualidade realizado diariamente, adquirindo mais experiência ao nível de controlo de qualidade de um laboratório de análises clínicas. Para além da rotina diária realizada, tive a oportunidade de realizar duas formações, nomeadamente uma formação sobre uma plataforma *online* de controlo de qualidade, a *Unity* da BioRad, onde é possível registar e verificar a precisão e exatidão dos resultados diariamente; e ainda uma formação sobre imunofluorescência indireta, cujas análises são realizadas no equipamento Mago 4.

A valência escolhida no estágio curricular foi Imunologia e, a seguir, apresento os equipamentos que estão relacionados com esta área. No final, apresento uma das variadas áreas que podemos encontrar na imunologia, nomeadamente, a serologia infecciosa. A serologia infecciosa descrita a seguir vai incidir em infeções do parasita *Toxoplasma gondii* e os vírus Citomegalovírus e Rubéola, principalmente realizada no diagnóstico pré-natal.

Architect

O Architect é um equipamento modular que analisa diferentes parâmetros de química e imunologia. No setor de Imunoquímica, existem dois equipamentos modulares para determinação de diferentes analitos de química e imunologia, o Architect ci 8200, e ainda um



Figura 7 - Equipamento modular Architect ci 8200.
Fonte: Site DOTmed.

Architect i2000 que realiza determinações analíticas de imunologia (Figura 7). Este sistema apresenta três tecnologias para medir as concentrações dos diferentes analitos, nomeadamente, a fotometria, potenciometria e imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

A fotometria mede a absorvância das amostras para a quantificação da concentração de analitos. Durante a reação química entre o reagente e a amostra, uma unidade ótica foca a luz que passa através da cuvete. Esta luz, ao longo da progressão da reação, vai dispersando em vários comprimentos de onda. Existe uma série de recetores que medem a intensidade da luz em 16 comprimentos de onda diferentes. As diferentes leituras de intensidade são posteriormente transmitidas em leituras de absorvância através de um amplificador. Por último, são corrigidas com um valor “branco”, específicas em cada teste, e convertidas a unidades de concentração.

Relativamente à potenciometria, mede o potencial elétrico numa amostra, ou seja, mede o sódio, potássio e cloro a partir de um chip constituído por elétrodos seletivos de iões em estado sólido (modulo ICT). Este método reduz a manutenção necessária para efetuar as medições dos eletrólitos.

Este equipamento automático ainda tem a particularidade de calcular, por absorvância, os índices de interferência da amostra, ou seja, determina os lípidos, hemoglobina e bilirrubina em amostras lipémicas, hemolizadas e ictéricas.

Em relação ao módulo de imunologia, efetua-se o imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (Figura 8). O imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) determina a presença de antígenos, anticorpos e analitos nas amostras. Durante o processamento da amostra, há a dispensa de micropartículas paramagnéticas revestidas com moléculas de captura, ocorrendo combinação dessas moléculas de captura com os analitos presentes na amostra, formando um complexo. Após a

formação destes complexos, um íman atrai as partículas paramagnéticas, ocorrendo uma posterior lavagem para remover materiais não combinados. Para ser detetado o complexo imunológico é necessário que este se ligue a um conjugado marcado com acridínio quimioluminescente. Após ligação, ocorre nova lavagem para remover materiais não combinados. De seguida, o sistema ótico desta metodologia efetua uma leitura a partir de uma solução pré-ativadora, peróxido de hidrogénio, que cria um ambiente ácido para prevenir a libertação precoce de energia, evita a aglomeração das micropartículas e ainda retira a matéria corante do acridínio do conjugado, combinado com o complexo de micropartículas. À mistura da reação é adicionada a solução ativadora, hidróxido de sódio, que provoca uma reação de oxidação ao acridínio devido à exposição ao peróxido e a uma solução alcalina. Esta oxidação provoca a ocorrência da reação por quimioluminescência, formando-se o N-metilacridona que liberta energia à medida que volta ao seu estado fundamental. O sistema ótico mede a emissão por quimioluminescência durante um período pré-definido de modo a quantificar o analito.

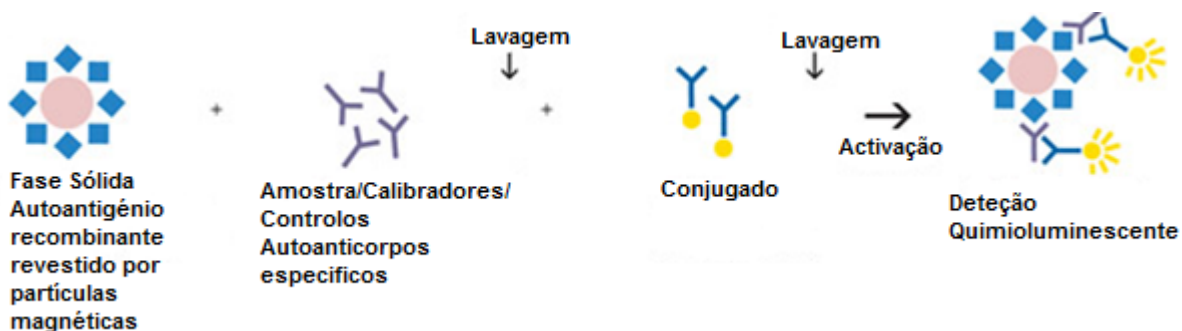


Figura 8 - Esquema do imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência.
Fonte: Alterado pela autora do site A. MENARINI diagnostics.

A rotina diária inicia-se com a manutenção do equipamento, seguida de calibrações de diferentes parâmetros. Depois da realização das calibrações, procede-se ao controlo, que após confirmação da qualidade, inicia-se a rotina normal das amostras.

Mago 4

O equipamento Mago 4 da EUROIMMUN realiza o método de ELISA bem como a montagem de lâminas da imunofluorescência indireta (Figura 9).

No laboratório de imunobioquímica realiza-se o método ELISA para anti-VHS, e imunofluorescência indireta em lâminas com HEp-20-10, anti-dsDNA (*Crithidia luciliae*), mosaicos granulócitos e mosaicos hepáticos.

No caso do método ELISA, a amostra previamente diluída é incubada nos poços das microplacas com uma glicoproteína G2 purificada (antigénio). Após ligação, os anticorpos anti-humanos estão marcados enzimaticamente e são capazes de catalisar uma reação de cor. A leitura da intensidade da cor é realizada fotometricamente num comprimento de onda de 450nm.

Na imunofluorescência indireta o Mago 4 funciona com kits. Estes kits têm o material necessário para a montagem da lâmina, nomeadamente, lâminas com células ou tecidos fixados, Anti-IgG humana ligado a fluoresceína, controlo negativo, controlo positivo, entre outros componentes necessários ao sistema. As lâminas com células ou tecidos são incubadas com a amostra previamente diluída por este equipamento. Após incubação, os anticorpos específicos das classes IgA, IgG e

IgM, presentes na amostra, ligam-se a antigénios das células ou tecidos, e após sucessivas incubações e lavagens, as lâminas são observadas ao microscópio (Figura 10). Caso tenha ocorrido ligação de auto-anticorpos, são observados padrões da fluoresceína característicos. Existe ainda a possibilidade de realizar o ensaio de *immunoblotting* para identificar especificamente o auto-anticorpo presente na amostra.

Estes dois métodos são de extrema importância em doenças autoimunes e na identificação de infeção pelo vírus Herpes Simplex 1 e 2.



Figura 9 - O equipamento Mago 4 realiza o método ELISA e imunofluorescência indireta em lâminas.
Fonte: Site Erba Mannheim.

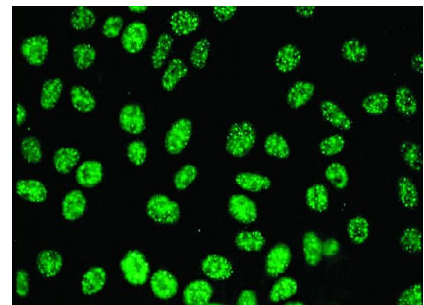


Figura 10 - Figura representativa da reação de imunofluorescência indireta numa lâmina.
Fonte: Site Expert Herald.

MINICAP

O minicap é um sistema de eletroforese capilar que realiza a eletroforese e a imunofixação de proteínas em amostras de soro. A eletroforese consiste na migração de proteínas, por corrente elétrica, ao longo de um capilar que no final da corrida passam por um detetor de luz UV que deteta as ligações peptídicas existentes. O perfil eletroforético capilar normal está apresentado na seguinte imagem (Figura 11).

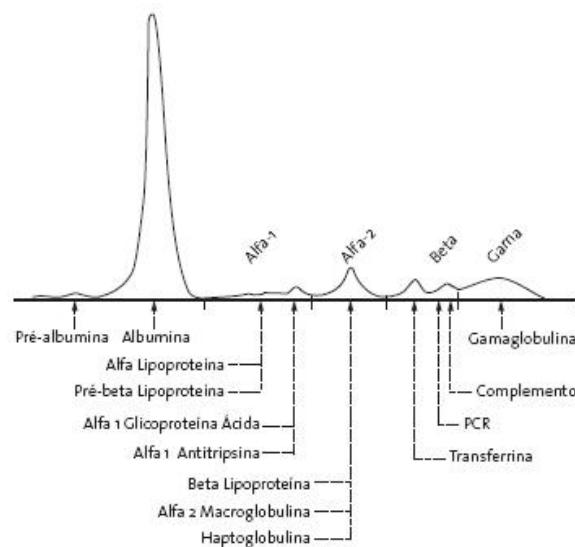


Figura 11 - Perfil eletroforético das proteínas, numa situação normal.
Fonte: Site Bioinforme.

No perfil eletroforético, existem inúmeras situações em que os picos podem estar mais ou menos aumentados. Por exemplo, na síndrome nefrótica, o organismo tenta compensar a perda de proteína aumentando a produção de alfa 2 macroglobulina no soro, observando-se no perfil eletroforético um aumento da zona alfa 2. Outro exemplo, e o mais representativo são as situações de picos monoclonais na zona gama. Nesta situação, a partir do valor das proteínas totais, calcula-se o pico monoclonal para posterior realização do mesmo ensaio, monitorizando a evolução do pico monoclonal. Em situações necessárias para diagnóstico, realiza-se a imunofixação de proteínas para identificação do tipo de imunoglobulina que está a ser produzida anormalmente no organismo. Estes picos monoclonais na zona gama podem ser sugestivos de mieloma múltiplo, alterações ao nível dos linfócitos, entre outras situações patológicas.

Imunocap 250

O Imunocap 250 é um equipamento para determinar parâmetros relacionados com as áreas de alergologia e autoimunidade. O princípio de funcionamento é o ensaio imunoenzimático de fluorescência (FEIA). FEIA consiste no contacto entre o soro da amostra e uma fase sólida (esponja de nitrocelulose) com alergénios acoplados. Durante a incubação, as IgE presentes na amostra vão ligar-se a esses alergénios e formar um complexo. Este complexo é revelado pela atividade de um segundo anticorpo marcado com um fluoróforo. Quanto maior a sua intensidade de fluorescência detetada, mais elevados são os níveis de IgE específica, ou seja, maior probabilidade de alergia ao alergénio em estudo.

Para além desta determinação, é útil na quantificação de parâmetros que ajudam no estudo de doenças autoimunes, como na Síndrome anti-fosfolípidos e doença celíaca.

Cobas E411

O cobas E411 é um equipamento automático utilizado pelo departamento de imunoquímica para realizar o diagnóstico pré-natal, ou seja, determinar a β -HCG livre (subunidade β livre da gonadotropina coriónica) e a PAPP-A (proteína plasmática A associada à gravidez). Para além destes parâmetros ainda é possível determinar analitos como a hormona adrenocorticotrófica, a calcitonina, a tiroglobulina e a anti-TSHR (auto-anticorpos para o recetor de TSH). Este analisador de imunologia para realizar estas determinações procede ao teste por electroquimioluminescência. O fundamento deste teste consiste na incubação de soro com micropartículas revestidas de estreptavidina e outros anticorpos específicos de cada analito. Após incubação, o complexo tipo *sandwich* é fixada magneticamente, graças às micropartículas. Por fim, aplica-se uma corrente elétrica que induz a quimioluminescência, medida por um fotomultiplicador.

Este equipamento, para certas determinações, apresenta o princípio competitivo, ou seja, um analito marcado e o analito presente na amostra competem pelo mesmo local de ligação. No final da reação, a concentração do analito é inversamente proporcional à intensidade do sinal.

Serologia Infeciosa

Depois da apresentação e funcionamento dos equipamentos que caracterizam o setor de imunquímica laboratorial do laboratório de patologia clínica da ULSAM, segue-se a apresentação da serologia infecciosa realizada neste setor, nomeadamente na determinação de anticorpos IgM e IgG do *Toxoplasma gondii*, do citomegalovírus e da rubéola, bem como a avidéz de IgG do *Toxoplasma gondii* e citomegalovírus. Estas determinações são realizadas pelo Architect i2000 em amostras de soro ou plasma.

Estes testes são importantes principalmente em mulheres grávidas, pois estes agentes etiológicos podem provocar graves sequelas ou até mesmo a morte do feto. Uma pesquisa precoce destes anticorpos fornece uma possível visão do que se passa com a grávida, e posteriormente, uma monitorização da grávida, caso apresente uma primoinfeção, para minimizar as sequelas que podem afetar o feto.

Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório e o agente etiológico da toxoplasmose (29). Apresenta dois ciclos reprodutivos, o sexual, que ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, principalmente, os gatos domésticos; e o ciclo assexual que ocorre em diversos tecidos dos reservatórios naturais, nomeadamente, mamíferos e aves (Figura 12).

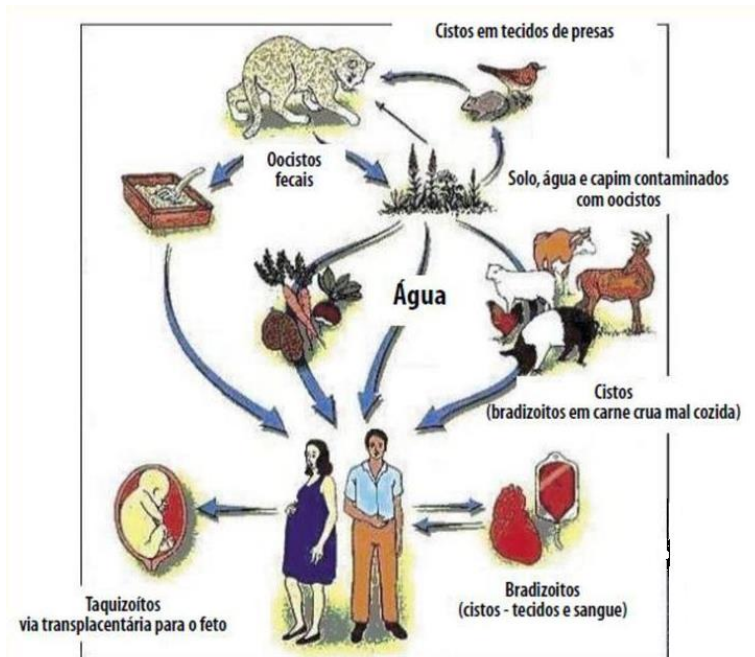


Figura 12 - Representação das fases do ciclo de vida do parasita *T. gondii*.

Fonte: Site O Cantinho do Mago.

Os gatos são contaminados pela ingestão de quistos encontrados em carne crua de ratos e aves, e raramente pela ingestão de ooquistos provenientes de fezes de outros gatos (29). Uma a duas semanas após exposição ao parasita, os gatos libertam nas suas fezes cerca de mais de um milhão de ooquistos por dia, não apresentando quaisquer sintomas de infeção (29). Estes ooquistos libertados, após cerca de 48 horas, tornam-se infecciosos, mantendo-se viáveis durante meses quando presentes em ambientes amenos e húmidos, como no caso de jardins e areias de gato (29).

Quando os hospedeiros secundários, como o Homem, ingerem ooquistos ocorre a libertação de esporozoítos, que entram no organismo por via das membranas da mucosa intestinal ou pelas estruturas faríngeas (29). Estes esporozoítos transformam-se em taquizoítos, durante a infeção aguda, e são capazes de invadir células para se replicarem, durante dias, circulando pelo sistema linfático e circulatório (29). Nestes sistemas podem lisar as células, deslocando-se para células próximas, infetando-as. Este processo pode resultar em danos nos tecidos como necrose com inflamação circundante.

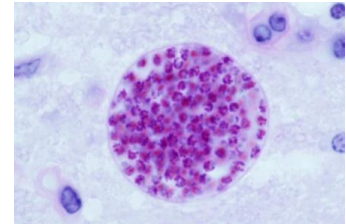


Figura 13 - Quisto com o interior cheio de taquizoítos, uma fase do ciclo de vida de *Toxoplasmas gondii*.
Fonte: Site Metis.

Na fase crónica estes taquizoítos modificam-se em bradizoítos e formam quistos nos diversos tecidos (Figura 13) (29). Quando presentes em músculos esqueléticos, como no diafragma, músculo cardíaco e cérebro, afeta as funções teciduais desses órgãos. Estes quistos podem sofrer uma rutura e libertam muitos bradizoítos, podendo ocorrer uma inflamação, devido a uma reação de hipersensibilidade nesse local, bem como bloquear vasos sanguíneos e morte celular. Os hospedeiros secundários normalmente permanecem assintomáticos, mas quando há imunossupressão pode haver reativação do organismo (29).

As três principais vias de transmissão ao ser humano são a ingestão de carnes cruas e mal cozinhadas, exposição a fezes de gatos infetados, transmissão vertical (durante a gravidez), bem como a transfusão sanguínea ou de órgãos (29; 30). A maioria das infeções em humanos são assintomáticas, apesar de alguns casos apresentar mal-estar, febre baixa e linfadenopatia (30). Por outro lado, em imunossuprimidos, as complicações que podem ocorrer são retinite, encefalite, entre outras (29)... Existe uma maior preocupação em grávidas, devido aos danos que pode causar ao feto (30).

A apresentação clínica em mulheres grávidas não é mais grave que as mulheres não grávidas, e normalmente, a infeção por este parasita apresenta sintomas de uma doença

como a gripe, com um período de incubação de 5 a 18 dias após exposição ao agente etiológico (29).

O primeiro passo para o diagnóstico de toxoplasmose é a serologia de anticorpos IgM e IgG (Figura 14). O título de anticorpos IgM após contacto com o parasita aumenta de 5 dias a semanas, alcançando um máximo de um a dois meses, e diminuindo até valores baixos ou indetetáveis, podendo, em muitos casos, persistir durante anos após infecção aguda. A sua presença não assegura um diagnóstico de infecção aguda.

Os anticorpos IgG aparecem mais tarde que os IgM e normalmente são detetáveis uma a duas semanas após infecção, com um pico alcançado dentro das 12 semanas a 6 meses depois da infecção aguda. Estes anticorpos são detetáveis antes de adquirir nova infecção e normalmente estão presentes para o resto da vida.

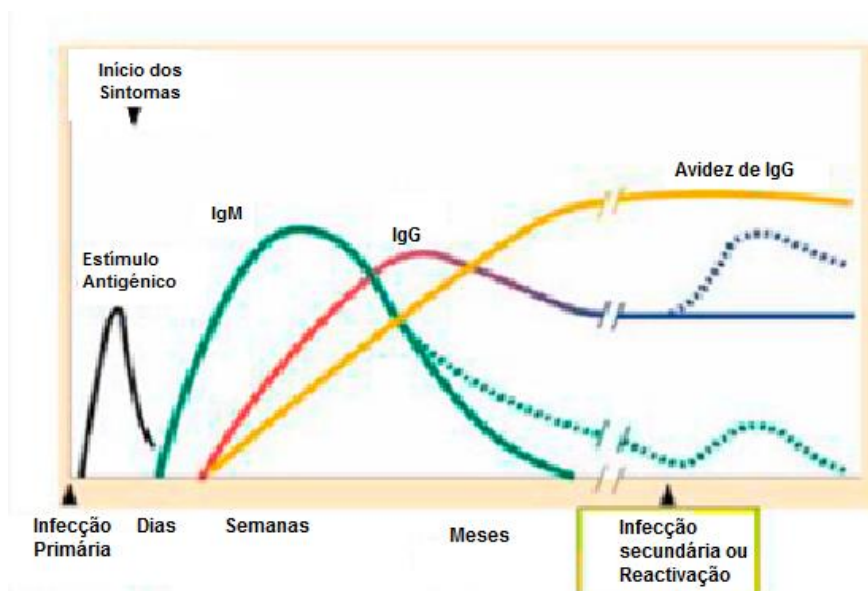


Figura 14 - Gráfico representativo da evolução dos diferentes títulos de anticorpos de IgM e IgG, numa infecção por *T. gondii*.

Fonte: Site Laborclínica.

Saber quando a infecção ocorreu durante a gravidez é de extrema importância para uma avaliação dos riscos do feto, iniciar uma terapêutica e assegurar um apropriado aconselhamento pré-natal (30). O laboratório de Patologia Clínica da ULSAM realiza um teste específico adicional, a avididade de IgG. A avididade de IgG mede a força de ligação de IgG ao parasita, ajudando a determinar o tempo em que ocorreu a infecção, ou seja, se apresenta uma avididade elevada, isto sugere uma infecção que ocorreu à pelo menos 5 meses antes da realização do teste serológico.

De seguida apresento uma tabela com a interpretação dos resultados que se podem obter de um teste serológico (Tabela 6).

Tabela 6 - Interpretação dos resultados obtidos a partir do título de IgM e IgG, e avides de IgG.

Fonte: Elaborada pela autora, a partir dos artigos citados no texto.

IgM	IgG	Avides IgG	Interpretação
Não reativo	Não reativo	Não aplicável	Ausência de infeção (não apresenta imunidade). ¹
Reativo	Não reativo	Não aplicável	Infeção aguda ou falso positivo. ¹ Caso a nova amostra apresentar IgG, existe infeção aguda.
Não Reativo	Reativo	Baixa	Infeção passada ou reação cruzada. ¹
Não Reativo	Reativo	Alta	Infeção passada (imunidade).
Reativo	Reativo	Baixa	Infeção aguda.
Reativo	Reativo	Alta	Infeção passada de portador crónico de IgM ou reativação da infeção. ¹ Caso a nova amostra apresenta um aumento de 4 vezes do título de IgG em relação à amostra anterior, o utente apresenta uma reativação da infeção.

1. Necessária nova amostra 2 a 3 semanas.

A transmissão ao feto ocorre principalmente em mulheres que adquirem a primeira infeção durante a gravidez, mas, em certos casos raros, em mulheres grávidas com infeção crónica, detetou-se reativação devido a imunossupressão. A transmissão mãe-feto ocorre entre 1 a 4 meses pela colonização da placenta por taquizoítos. Estudos revelam que o risco de transmissão vertical aumenta com a idade gestacional, com taxas elevadas no terceiro trimestre comparado com o primeiro trimestre. A severidade da doença, no entanto, diminui com a idade gestacional, com a infeção no primeiro trimestre resultando em aborto ou sequelas graves.

A toxoplasmose congénita é caracterizada por corioretinite, hidrocefalo, calcificação intracraniana, distúrbios psicomotores e convulsões (29).

A prevenção é conseguida através de uma higiene pessoal apropriada e evitar as fezes de gatos, bem como de animais como ovelhas e porcos, principalmente em grávidas que apresentam testes serológicos negativos. A carne deverá ser devidamente cozinhada para assegurar a destruição de parasitas. Quanto às areias do gato deverão ser lavadas todos

os dias, porque, como anteriormente referido, os ooquistos libertados nas fezes tornam-se infecciosos após cerca de 48 horas.

O tratamento da toxoplasmose congénita apresenta dois tipos de regime, o pré-natal e o pós-natal (30). No primeiro, previne a infeção do feto, acelerando o tratamento antes do nascimento, enquanto o tratamento pós-natal trata a infeção e previne sequelas (30). As medicações existentes administradas são a espiramicina, a pirimetamina e a sulfadiazina (30). Recentemente estão a realizar-se estudos para recorrer a novas medicações como o caso do atovaquone e azitromicina (30).

Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus que pertence à família *Herpesviridae*, sendo este o vírus humano que apresenta o maior conteúdo genético nesta família, com 240kbp (31; 32). Existem muitas estirpes geneticamente diferentes a circular na população humana.

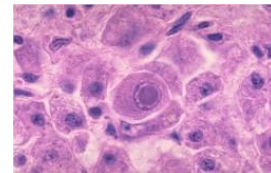


Figura 15 - Inclusões em células provocadas pelo vírus Citomegalovírus.
Fonte: Site Hepcentro.

Este vírus é um vírus envelopado com DNA de cadeia dupla (32; 33). É capaz de infetar a maioria das células e atua no citoplasma e núcleo, formando inclusões (Figura 15) (31; 33).

A replicação viral deste vírus tem início com a interação de glicoproteínas virais e recetores celulares, ocorrendo a fusão do envelope viral com a membrana da célula suscetível. De seguida, a cápside contendo o DNA de dupla cadeia viral, é transportada até à membrana nuclear. Aí ocorre a entrada do DNA viral e de proteínas do tegumento. Sucede-se a replicação do DNA viral. O DNA replicado é encapsulado ainda no núcleo, brotando através da membrana nuclear, adquirindo o envelope. Já no citoplasma, os novos vírus perdem o envelope inicial e adquirem o definitivo quando brotam através do complexo de Golgi, onde previamente foram inseridas glicoproteínas virais.

O citomegalovírus é um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência em infeções congénitas (32). As infeções assintomáticas são comuns na infância e adolescência, enquanto uma infeção em adultos imunossuprimidos é uma situação grave (32; 34).

Após exposição ao agente, o período de incubação em crianças e adultos é de cerca de 4 a 8 semanas. Apesar da maioria das infeções por citomegalovírus serem assintomáticas, a característica clínica desta infeção é semelhante à mononucleose (31; 35). Após infeção

primária, o vírus pode ser intermitentemente eliminado pela faringe e urina durante meses a anos (31). Esta intermitência deve-se ao facto da infeção primária bloquear a imunidade mediada por células. As infeções por este vírus, tal como acontece em todos os vírus da família herpes, estabelece latência, devido, principalmente, à capacidade de invadir as células do sistema imunológico, necessitando de vários meses para recuperar a resposta celular imunológica (33).

As infeções primárias por citomegalovírus em imunossuprimidos são muito mais graves que em hospedeiros normais, ocorrendo normalmente pneumonia. Os indivíduos com maior risco são: os que recebem órgãos transplantados, os que apresentam tumores malignos e fazem tratamento quimioterápico e os pacientes com SIDA. Como referido anteriormente, este vírus fica num estado latente podendo ser mais tarde reativado (31). Esta reativação da infeção é menos severa, mas a virulência pode ser igual à infeção primária. Nestes indivíduos, as infeções primárias e recorrentes por citomegalovírus aumentam a taxa de morbilidade e mortalidade (35).

Os bebés infetados por citomegalovírus podem apresentar a doença de inclusão citomegálica (31). A doença de inclusão citomegálica é uma infeção generalizada dos bebés causada pela transmissão de citomegalovírus via intrauterina, durante o parto ou pelo leite materno (31; 32). O vírus pode ser transmitido pelo útero numa infeção primária, secundária ou numa reativação de infeção materna, sendo a infeção primária a que normalmente provoca a doença de inclusão citomegálica (32). Nestas situações, a infeção do feto pode ocorrer após leucócitos infetados atingirem o feto, via placenta, ou então, o próprio vírus infetar a placenta, contaminando o líquido amniótico que posteriormente afetará o feto (31). A infeção congénita pode provocar a morte do feto, enquanto os sobreviventes podem apresentar a doença de inclusão citomegálica que é caracterizada pelo envolvimento do sistema nervoso central e pelo sistema reticuloendotelial, ou seja, um défice significativo do sistema nervoso central, perda severa da audição, anormalidades oculares e atraso mental (31; 32; 34). Em situações de transmissão durante o parto ou pelo leite materno, os bebés infetados pelo citomegalovírus tendem a ser assintomáticos pois recebem anticorpos da mãe diminuindo a severidade da infeção (31). As infeções congénitas, sintomáticas ou assintomáticas, resultam em infeções crónicas com eliminação viral detetável durante anos.

A infeção de crianças e adultos é normalmente assintomática, mas ocasionalmente pode causar uma síndrome mononucleose (31; 32). A mononucleose por citomegalovírus é uma doença leve e as complicações são raras.

Como a maioria dos adultos e crianças são assintomáticas não é previsível uma mulher grávida estar infetada, logo é de extrema importância realizar-se um rastreio no início da gravidez pela pesquisa de anticorpos anti-CMV, IgM e IgG, para avaliar o risco de transmissão intrauterina da infeção (Tabela 7) (31; 32). Para além de ser importante a avaliação no início da gravidez é de extrema importância o seguimento até ao final da gravidez de mulheres seronegativas (31; 32).

A deteção de IgM anti-CMV pode ser suspeita de uma infeção primária, ou revela ser um falso positivo devido a reações cruzadas com o vírus Epstein-Barr e o vírus Herpes Simplex (31; 32). O título de IgG permite concluir a existência de uma infeção passada, mas não permite determinar a data de início de infeção (32). Para determinar a data de início de infeção recorre-se à medição da avididade de IgG (32; 33). De seguida apresento um quadro para uma melhor compreensão do rastreio realizado em grávidas.

Tabela 7 - Interpretação dos resultados obtidos a partir do título de IgM e IgG, e avididade de IgG.

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos artigos citados no texto.

IgM	IgG	Avididade IgG	Interpretação
Não reativo	Não reativo	Não aplicável	Ausência de infeção (Não apresenta imunidade). ¹
Reativo	Não reativo	Não aplicável	Infeção recente ou falso positivo. ¹
Não reativo	Reativo	Avididade baixa	Infeção passada ou reação cruzada. ¹ Baixo risco de transmissão intrauterina.
Não reativo	Reativo	Avididade alta	Infeção passada (imunidade). Baixo risco de transmissão intrauterina.
Reativo	Reativo	Avididade baixa	Infeção primária. Alto risco de transmissão intrauterina.
Reativo	Reativo	Avididade alta	Infeção crónica de portador de IgM ou reativação da infeção. ¹ Baixo risco de transmissão intrauterina. Caso a nova amostra apresenta um aumento de 4 vezes do título de IgG em relação à amostra anterior, o utente apresenta uma reativação da infeção.

1. Necessária nova amostra 2 a 3 semanas.

A prevalência da infeção varia com o *status* socioeconómico, condições de vida e práticas higiénicas (33). A sua transmissão requer contacto próximo entre pessoas, pois o vírus pode ser eliminado pela urina, saliva, sémen, leite materno e secreções cervicais (31; 32).

O tratamento de controlo de infeções por citomegalovírus é feito pela medicação de ganciclovir, aciclovir e foscarnet, apesar da sua toxicidade a nível renal e hematológico, bem como os seus efeitos teratogénicos (33). Recentemente está a ser realizado um estudo farmacológico para testar a eficácia de valaciclovir oral nos casos de infeção congénita (33). Outro estudo está a realizar a eficácia de tratamento com uma globulina de elevada avidéz contra o CMV (conseguida da infeção primária da mãe) observando-se resultados promissores para a prevenção e tratamento de infeções congénitas sem efeitos secundários (33). A vacina contra citomegalovírus ainda está em desenvolvimento (33).

Rubéola

O vírus da rubéola é um dos agentes mais teratogénicos conhecidos, pertencente à família *Togaviridae* (36). O seu genoma é constituído por RNA de cadeia simples de polaridade positiva, envolvido por uma cápside icosaédrica e por um envelope.

A replicação do genoma da rubéola inicia-se com o reconhecimento da célula alvo. Após o reconhecimento, ocorre a entrada do nucleocapsídeo, constituído por proteínas virais e RNA, para o citoplasma. É neste local da célula que o genoma e as proteínas virais são replicados. Quando os novos nucleocapsídeos estiverem formados, saem da célula por brotamento, para infetar novas células.

Durante a gravidez pode ocorrer uma infeção primária, havendo possibilidade de o vírus atravessar a placenta e induzir infeção no feto havendo risco de ocorrer aborto espontâneo (36; 37). A transmissão vertical do vírus pode causar dano citopático nos vasos sanguíneos e isquemia nos órgãos em desenvolvimento (37). Se a infeção ocorre nas primeiras 12 semanas de gravidez causa infeção congénita em 90% dos casos, com aproximadamente 100% com risco de anomalias congénitas (36). Das 13 às 17 semanas, o risco de infeção é cerca de 60%, e o risco de anomalias cerca de 50% (36). Das 18 às 24 semanas o risco de infeção é 25%, com nenhum risco de defeitos congénitos (36). As complicações associadas à rubéola congénita consistem em cataratas, problemas cardíacos e surdez neurosensorial, mas também podem ocorrer outras anomalias (36; 37).

Na ausência de gravidez, geralmente a infeção manifesta-se moderada e autolimitada, associada por um exantema maculopapular característico, começando a

aparecer no rosto e espalha-se pelo tronco e extremidades (37). Existem casos raros que podem experienciar febre, conjuntivite, dores de cabeça e linfadenopatia (37).

As mulheres com um risco elevado de contrair rubéola durante a gravidez são as mulheres não-imunes ao vírus da rubéola e que são expostas à infeção (36). A mulher grávida seronegativa pode ser infetada diretamente por gotículas do nariz e garganta de pessoas infetadas (36). O período de incubação é de 14 a 18 dias, podendo chegar aos 21 dias (36).

O diagnóstico clínico de infeção aguda pelo vírus da rubéola, durante a gravidez, é extremamente difícil (36). Os testes serológicos são utilizados para diagnosticar uma infeção aguda em mulheres grávidas (36). Em casos de suspeita de infeção primária, a amostra deve ser colhida 1 a 2 semanas após o aparecimento do exantema maculopapular que não é muito específico ou inaparente (35; 36). No geral, a produção de IgM é uma reação aguda, seguida pela produção de IgG de 1 a 3 semanas (36). Assim sendo, a demonstração de conversão e presença de elevados títulos de IgM dá-nos informação de infeção aguda na gravidez, reativação ou vacinação recente (36).

A mulher que é imune à rubéola após infeção natural ou vacinação demonstra anticorpos IgG para toda a vida (36). A presença de imunidade natural é um parâmetro de proteção da infeção intrauterina durante a gravidez, e o mesmo acontece com a vacinação, pois só existe um serotipo do vírus da rubéola (36; 37). O programa de vacinação contra a rubéola introduzido desde 1969 tem-se mostrado eficaz, apesar, de casos raros, apresentar efeitos secundários como artrite, artralgia, erupção cutânea, adenopatias e febre (37). A vacina continua a ser o melhor método para prevenir a infeção pelo vírus da rubéola, bem como a necessidade da vigilância serológica para identificar indivíduos suscetíveis e reduzir o risco de infeção congénita, pois ainda não existe tratamento disponível para fetos infetados.

Controlo de Qualidade

No setor de Imunoquímica o controlo de qualidade interno é realizado, maioritariamente, por controlos da casa comercial BioRad. Estes controlos podem ser específicos de um parâmetro ou serem multicontrolos, isto é, utiliza-se o mesmo controlo para vários analitos.

Após a manutenção e calibrações necessárias de cada equipamento inicia-se o controlo dos vários parâmetros que serão executados nesse dia. Os controlos são verificados pelos responsáveis do laboratório para verificar se os equipamentos apresentam a precisão para o processamento das amostras. Este processo de verificação é realizado numa plataforma *software* em que de uma maneira simples apresenta um gráfico (gráfico de Levey-Jennings) com a média e desvios-padrões de cada parâmetro. O controlo efetuado diariamente visualiza-se por pontos. Estes pontos devem estar perto da média, mas caso se verifiquem outras situações, como por exemplo, o ponto encontrar-se acima de três desvios-padrões será necessário verificar esse resultado. Estes erros podem ocorrer devido ao reagente estar há demasiado tempo no equipamento, uma troca de lote do controlo, entre outras situações.

Corrigidas todas as situações possíveis para valores fora dos limites do controlo, a conduta a seguir, é novamente a passagem de um lote novo, e caso se verifique uma regularização dos valores, valida-se esses pontos e procede-se à rotina normal das amostras.

O controlo de qualidade externo, tal como no setor de Hematologia, é acompanhado pelo RIQAS. Este programa de avaliação externa de qualidade certificada avalia estatisticamente os resultados que os laboratórios enviam. Estes laboratórios periodicamente recebem amostras que devem ser processadas como uma amostra normal a fim de entender a exatidão dos resultados que o laboratório apresenta. Essa exatidão é conseguida após estatística de todos os resultados que os laboratórios enviam, o equipamento onde foi processada ou metodologia aplicada.

Conclusão

Ao longo dos seis meses de estágio procurei atingir os meus objetivos, isto é, capacidade de integração numa equipa de profissionais, adquirir autonomia na manipulação das diversas amostras biológicas e aprofundar conhecimentos teóricos, adquiridos ao longo do mestrado, que me permitiram fazer uma melhor interpretação dos resultados analíticos.

A acrescentar a estes objetivos, os profissionais do Serviço de Patologia Clínica transmitiram-me um dos conhecimentos que muito valorizei ao longo destes meses e que me será útil na vida profissional futura. Isto é, o apoio dos profissionais em explicar exhaustivamente a importância dos controlos e sistema de gestão da qualidade. Sem a garantia da qualidade, não podemos estar seguros dos resultados apresentados aos utentes e médicos prescritores.

Nos setores que compõem o serviço de patologia aprendi diversas metodologias que me serão úteis ao longo da minha vida profissional. No setor de Hematologia tive oportunidade de analisar resultados, interligando-os com o histórico do doente. Observei, também, muitas lâminas de esfregaços de sangue periférico ao microscópio para uma melhor identificação das células sanguíneas possíveis de serem encontradas.

No setor de Imunoquímica, tive um maior contato com controlos de qualidade interno e externo, podendo observar cartas de controlo para identificar e solucionar tendências ou erros dos diversos equipamentos, assegurando os resultados diariamente.

No setor de Microbiologia, os desafios diários propostos pelos profissionais, proporcionaram-me uma aprendizagem muito prática na identificação e suscetibilidade dos microrganismos presentes em amostras biológicas.

Nas últimas semanas de estágio, passei por dois serviços de apoio ao diagnóstico clínico, nomeadamente o Serviço de Imunohemoterapia e o Serviço de Saúde Pública. No serviço de Imunohemoterapia tive contacto com o processamento, desde a colheita até à entrega das dádivas de sangue do hospital. Este serviço também apresenta um laboratório para estudo da coagulação e um laboratório de biologia molecular para estudo de cargas virais. No Serviço de Saúde Pública os procedimentos são maioritariamente manuais, ou seja, é necessário a preparação das próprias placas com meios de identificação de microrganismos possíveis de contaminar águas públicas.

Em suma, este estágio veio contribuir para enriquecer a minha vida profissional, principalmente em relação à sensibilidade que temos de ter quanto aos controlos e sistema

de gestão da qualidade para garantirmos resultados fiáveis aos nossos utentes. A área das Análises Clínicas é, sem dúvida, uma das áreas mais importantes no auxílio do diagnóstico de diversas patologias.

Bibliografia

1. SILVA, Teresa et al. - **Citometria de fluxo: Funcionalidade celular on-line em bioprocessos.** Boletim Biotecnologia. Vol. 77 (2004) 32-40.
2. BROWN, Michael; WITTEWER, Carl - **Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology.** Clinical Chemistry. Vol. 46 (2000) 1221-1229.
3. CHAKRAVARTHY, V. Kalyan et al. - **Haemoglobin Estimation by Non-cyanide Methods.** Journal of Clinical & Diagnostic Research. Vol. 6 (2012) 955-958.
4. ALEMU, Yared; ATOMSA, Alemayehu; SAHLEMARIAM, Zewdneh - **Hematology.** Ethiopia Public Health Training Initiative (2006) 1-549.
5. RINGSRUD, Karen Munson; LINNÉ, Jean Jorgenson - **Urinalysis and Body Fluids: A Colortext and Atlas.** 1ª Ed. Michigan : Mosby, 1995. ISBN 0801670438-9780801670435.
6. DEISENHAMMER, F. et al. - **Routine Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis.** In: GILHUS, N. E.; BARNES, M. P.; BRAININ, M. European Handbook of Neurological Management. Blackwell Publishing Ltd., 2011, ISBN: 978-1405185332. p. 5-17.
7. MACHADO, Luís dos Ramos; LIVRAMENTO, José Antonio; VIANNA, Liliana Scaff - **Cerebrospinal fluid analysis in infectious diseases of the nervous system: when to ask, what to ask, what to expect.** . Vol. 71, 9-B (2013), 693-698.
8. STRASINGER, Susan King; LORENZO, Merjorie Schaub Di - **Urinalysis and Body Fluids.** 6ª Ed. Philadelphia:F. A. Davis Company, 2015. ISBN 9780803639201.
9. JOHNSON, Kimberly S.; SEXTON, Daniel J. - **Cerebrospinal fluid physiology and utility of na examination in disease states.** UpToDate, 2017. [Acedido a 24 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.uptodate.com/contents/cerebrospinal-fluid-physiology-and-utility-of-an-examination-in-disease-states>
10. SUVERNAKAR, S. V. et al. - **Cytological Study of Pleural Cavity Effusions in a Tertiary Care Hospital.** Indian Journal of Pathology: Research and Practice. Vol. 6, 2 (2017), 456-459.
11. SRIRATANAVIRIYKUL, Narin; LA, Hanh H.; ALBERTSON, Timothy E. - **Chronic Eosinophilic Pneumonia Presenting with Ipsilateral Pleural Effusion: a Case Report.** J Med Case Rep. Vol. 10, 227 (2016) ISBN 27520469.
12. HEIMAN, Meadow; GREIST, Anne - **Sickle Cell Disease and Hemoglobinopathy Screening in Pregnancy.** The Indiana Hemophilia and Thrombosis Center (2010).

13. STEINBERG, Martin H. - **Structure and Function of Normal Hemoglobins**. UpToDate, 2014. [Acedido a 26 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet:<https://www.uptodate.com/contents/structure-and-function-of-normal-hemoglobins>
14. HOPPE, Carolyn - **Methods for Hemoglobin Analysis and Hemoglobinopathy Testing**. UpToDate, 2018. [Acedido a 26 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet:<https://www.uptodate.com/contents/methods-for-hemoglobin-analysis-and-hemoglobinopathy-testing>
15. PORTUGAL. Direcção-Geral de Saúde - **Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c**. Lisboa:DGS, 2012.
16. MCCULLOCH, David K. - **Overview of Medical Care in Adults with Diabetes Mellitus**. UpToDate, 2016. [Acedido a 26 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet:<https://www.uptodate.com/contents/overview-of-medical-care-in-adults-with-diabetes-mellitus>
17. URRECHAGA, Eloísa - **Evaluation of ADAMS A1c Menarini HA-8180 HPLC Analyzer for HbA1c Determination**. Journal of Life Sciences. Vol.6 (2012) 456-460.
18. THEVARAJAH, Malathi T.; NANI, Nordin; CHEW, Y. Y. - **Performance Evaluation of the Arkray Adams HA-8160 HbA1c Analyser**. Malaysian J Pathol. Vol. 30, 2 (2008), 81-86.
19. RAMSAY, Elaine S.; LERMAN, Melissa A. - **How to use the erythrocyte sedimentation rate in paediatrics**. Arch Dis Child Educ Pract. Vol.100 (2014) 30-36.
20. AMERICA. American Society for Clinical Pathology - **Educational Commentary: The Erythrocyte Sedimentation Rate and its Clinical Utility**. America:American Proficiency Institute, 2006.
21. BRAY, Christopher et al. - **Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine**. WMJ. Vol.115, 6 (2016).
22. SINGH, Pratap; KUMAR, Sanjay - **Sedimentation Rate in Modern Era: Clinical Utility of Erythrocyte**. India:The Association of Physicians of India, 2017.
23. TAVAKOL, K.; GHARAMANPOORI, B.; FARAROUEI, M. - **Prediction of Arterial Blood pH and Partial Pressure of Carbon dioxide from Venous Blood Samples in Patients Receiving Mechanical Ventilation**. J Med Signals Sens. Vol. 3, 3 (2013), 180-184. ISBN 24672766.
24. HONARMAND, Azim; SAFAVI, Mohammadreza - **Prediction of arterial blood gas values from arterialized earlobe blood gas values in patients treated with mechanical ventilation**. Indian J Crit Med. Vol. 12, 3 (2008) 96-101.
25. KELLY, Anne-Maree - **Can VBG analysis replace ABG analysis in emergency care?** Emerg Med J. Vol. 0 (2014) 1-3. ISBN 204326.

26. THEODORE, Arthur C. - **Venous blood gases and other alternatives to arterial blood gases.** UpToDate, 2015. [Acedido a 23 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet:<https://www.uptodate.com/contents/venous-blood-gases-and-other-alternatives-to-arterial-blood-gases>
27. MCCORMACK, Meredith C. - **Overview of pulmonary function testing in adults.** UpToDate, 2017. [Acedido a 23 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet:<https://www.uptodate.com/contents/overview-of-pulmonary-function-testing-in-adults>
28. MIKULCIK, Patrizia - **Análises Rapid: Gases no sangue e muito mais.** 1ª Ed. Siemens, 2008.
29. PAQUET, Caroline; YUDIN, Mark H. - **Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment.** Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. Vol. 35 (2013).
30. SERRANTI, D.; BUONSENSO, D.; VALENTINI, P. - **Congenital Toxoplasmosis Treatment.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences. Vol. 15 (2011) 193-198.
31. IJPELAAR, Hans - **Prenatal Diagnosis of Cytomegalovirus Infection.** Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2010).
32. NASIR, Idris Abdullahi; BABAYO, Adamu; SHEHU, Muhammad Sagir - **Clinical Significance of IgG Avidity Testing and Other Considerations in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection: A Review Update.** Medical Sciences. Vol. 4, 5 (2016).
33. NADDEO, Flávia; PASSOS-CASTILHO, Ana Maria; GRANATO, Celso - **Cytomegalovirus infection in pregnancy.** J Bras Patol Med Lab. Vol. 51, 5 (2015) 310-314.
34. NAESENS, Anne et al. - **A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection.** The Journal of Pediatrics. (2005).
35. WALLACH, Jacques - **Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio.** 4ª Ed. MASSON, 2002.
36. DEEPIKA, Deka et al. - **Diagnosis of acute rubella infection during pregnancy.** The Journal of Obstetrics and Gynecology of India. Vol.56, 1 (2005), 44-46.
37. DONTIGNY, Lorraine; ARSENAULT, Marc-Yvon; MARTEL, Marie-Jocelyne - **Rubella in Pregnancy.** J Obstet Gynaecol Can. Vol. 30, 2 (2008), 152-158.
38. DUKIC, Lora et al. - **Blood gas testing and related measurements: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine.** Biochem Med. Vol. 26, 3 (2015), 318-336. ISBN 27812301.