

Alexandra Fernandes Gama

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela  
Dra. Maria Gabriel Barroca e pela Professora Doutora Armanda Emanuela Santos e  
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alexandra Fernandes Gama

# Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Maria Gabriel Barroca e pela Doutora Armanda Emanuela Santos, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## **Agradecimentos**

Após estes dois anos de muito trabalho e luta, agora nesta fase final posso dizer que no geral foi uma experiência muito gratificante, que me permitiu crescer, aprender e claro fazer amigos excepcionais.

Quero desde já agradecer a todos os professores do Mestrado que nos apoiaram sempre e que nos ensinaram tudo para que sejamos melhores profissionais.

Agradecer à Professora Doutora Armanda Santos pela paciência e por toda a ajuda na elaboração deste relatório.

À Doutora Maria Gabriel Barroca, que me recebeu no Laboratório Dr. Flaviano Gusmão de braços abertos e que orientou o meu estágio da melhor forma.

Agradecer a todos os que me receberam tão bem, desde Técnicos Superiores, às Técnicas de Análises Clínicas, ao pessoal administrativo e restante.

Um especial agradecimento às minhas meninas da Microbiologia, Cristina Ambrósio, Filipa Velhinho, Maria José Pereiro, Ana Paula Morais, Paula Bicho, Lena Pinto, Piedade Silveira, Inês Morgado e Inês Caldeira que me acompanharam desde o início, sem as quais este estágio não teria sido o mesmo!!

Agradecer também à Graça Oliveira, à Marta Silva e ao Ivo Ricardo, amigos e companheiros desta jornada de dois anos.

Por fim quero agradecer à minha família que estiveram sempre do meu lado e que apoiaram sempre todas as minhas decisões.

Muito Obrigada a todos!!



## Índice

<b>Introdução</b> .....	1
<b>1. Local de Estágio</b> .....	2
<b>1.1. Controlo de Qualidade</b> .....	3
<b>2. Hematologia</b> .....	5
<b>2.1. Hematopoiese</b> .....	5
<b>2.2. Hemóstase</b> .....	6
<b>2.3. Determinações analíticas</b> .....	8
2.3.1. Hemograma.....	8
2.3.2. Esfregaço de Sangue Periférico.....	13
2.3.3. Velocidade de Sedimentação.....	13
2.3.4. Provas de Coagulação.....	14
2.3.5. Hemoglobina Glicada (HbA1c).....	16
<b>3. Imunologia</b> .....	17
<b>3.1. Imunidade Inata</b> .....	17
3.1.1. Componentes da Imunidade Inata.....	18
<b>3.2. Imunidade Adaptativa</b> .....	20
3.2.1. Imunidade Celular.....	21
3.2.2. Imunidade Humoral.....	22
3.2.2.1. Anticorpos.....	23
<b>3.3. Determinações analíticas</b> .....	26
3.3.1. Immulite2000®.....	26
3.3.1.1. Processamento de amostras.....	26
3.3.2. Advia Centaur XP.....	27
3.3.2.1. Processamento de amostras.....	27
<b>3.4. Serologia</b> .....	28
3.4.1. Efetuadas no equipamento Vidas ( <i>Vitek Immuno Diagnostic Assay System</i> ).....	29
3.4.2. Teste de Coombs indireto.....	29
3.4.3. Grupos sanguíneos AB0/Rh.....	31
3.4.4. Monoslide test.....	33
3.4.5. Rose Bengal.....	34
3.4.6. VDRL com titulação.....	35
<b>4. Conclusão</b> .....	37
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	38



## Abreviaturas

**AFP** – Alfa-Feto Proteína

**CD** – Células Dendríticas

**CEA** – Antígeno Carcinoembrionário

**CH** – Conteúdo celular de Hemoglobina

**EA** – Éster de Acridina

**FT** – Fator Tecidual

**FSH** – Hormona Folículo Estimulante

**HB** – Hemoglobina

**HbA1c** – Hemoglobina Glicada

**HbA2** – Hemoglobina A2

**HbF** – Hemoglobina F

**HBs** – Vírus da Hepatite B

**HC** – Concentração de Hemoglobina

**hCG** – Hormona Gonadotrofina  
Coriônica Humana

**HCV** – Vírus da Hepatite C

**HDW** – *Hemoglobin Distribution Width*  
(Amplitude de Distribuição de  
Hemoglobina)

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência adquirida

**Ig** – Imunoglobulina

**IL** – Interleucina

**LFG** – Laboratório Dr. Flaviano Gusmão

**LH** – Hormona Luteinizante

**MCHC** – *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)

**MCV** – *Mean Corpuscular Volume* (Volume Corpuscular Médio)

**MHC** – *Major Histocompatibility Complex*

**NK** – Células Natural Killer

**PLT** – Plaquetas

**PMP** – Partículas Paramagnéticas

**PSA** – Antígeno Específico da Próstata

**RBC** – *Red Blood Cells* (Glóbulos Vermelhos)

**RDW** – *Red Cell Distribution Width* (Índice de variação do tamanho dos Eritrócitos)

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**TGFβ** – Fator de Crescimento Transformador beta

**TP** – Tempo de Protrombina

**TTPa** – Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

**TSH** – Hormona Tiroestimulante





## **Resumo**

As análises clínicas são uma área de extrema importância no âmbito da saúde e cuidados médicos, sendo elas um dos meios de confirmar, diagnosticar e monitorizar certas patologias. Este relatório é o culminar dos 6 meses de estágio no Laboratório Dr. Flaviano Gusmão, em Évora, no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Neste relatório é feita uma breve caracterização do local do estágio, bem como uma caracterização de cada uma das valências do laboratório, com especial destaque para as de Hematologia e Imunologia, tendo sido estas as valências escolhidas por mim para realização deste trabalho.

**Palavras-Chave:** Análises Clínicas, Estágio, Laboratório, Hematologia, Imunologia, Diagnóstico.

## **Abstract**

Clinical analysis is an area of extreme importance in the health field and medical care, being one of the ways to confirm or make the diagnosis of certain pathologies, as well as to perform its monitoring. This report reflects six months of internship in the Laboratory *Dr. Flaviano Gusmão in Évora*, in the context of the Master's Degree of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. In this report is made a brief characterization of the place of internship, as well as a characterization of each and every one of the areas of the laboratory, with special importance to the haematology and immunology components, which are the areas chosen by me for the realization of this report.

**Key-words:** Clinical analysis, Internship, Laboratory, Haematology, Immunology, Diagnosis.



## **Introdução**

As análises clínicas são um dos meios complementares de diagnóstico mais solicitados nos dias de hoje, permitindo ao médico realizar um diagnóstico mais correto e com isso também um tratamento e um acompanhamento do doente mais adequado. Todos estes aspetos, incluindo também o facto de ser bastante acessível nos dias de hoje, fazem das análises clínicas uma área extremamente importante, no que diz respeito à saúde e cuidados médicos.

Foi-me permitido fazer um estágio de seis meses no Laboratório Dr. Flaviano Gusmão, em Évora, onde consegui perceber todo o funcionamento de um laboratório de análises clínicas, onde me foi possível trabalhar e aprender um pouco em todas as suas valências, tais como Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia, assim como também a nível de colheitas e triagem de amostras. Este tempo de estágio foi essencial para pôr em prática tudo o que nos foi ensinado no primeiro ano do Mestrado de Análises Clínicas, e também para conseguir ter noção do que se passa na realidade num laboratório profissional, com amostras de pacientes que não podem ser comprometidas e com resultados que muitas vezes têm de ser validados com alguma urgência.

Este relatório tem como objetivo apresentar o que foi realizado nestes 6 meses de estágio, abordando com especial ênfase as áreas de Hematologia e Imunologia.





## I. Local do estágio

O estágio foi realizado no Laboratório Dr. Flaviano Gusmão (LFG) em Évora. Este laboratório está inserido na SYNLAB que é uma empresa especializada em diagnóstico clínico presente em mais de 35 países.

O espaço físico do LFG inclui a receção e sala de espera, duas casas de banho para os utentes, quatro salas de colheitas e uma zona de triagem. O laboratório tem as valências de Microbiologia, Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Endocrinologia Laboratorial e Estudo Funcional de Metabolismo, Órgãos e Sistemas.

Na receção é onde ocorre o primeiro contacto com o doente, são recolhidos os seus dados, é verificado se este fez a preparação necessária à análise requerida, caso seja necessário alguma, e é-lhe atribuído um código numérico, consoante a credencial fornecida pelo médico. Depois é então feita a colheita das amostras necessárias, para os tubos adequados, referidos na Tabela I, sendo as amostras posteriormente levadas para a triagem. Na triagem é verificado se as amostras vêm em condições aceitáveis para análise, sendo depois feita a distribuição das amostras pelos diferentes sectores do laboratório, de acordo com os parâmetros a analisar. As amostras são novamente verificadas e analisadas em cada sector específico.

**Tabela I:** Tipos de tubos de colheitas usados no LFG, respetivas cores e tipos de análises para que são usados.

<b>Tipo de Tubo</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Tipo de análises</b>	<b>Cor da tampa</b>
<b>Citrato de sódio</b>	Plasma	Testes de coagulação	
<b>Tubo seco</b>	Soro	Testes bioquímicos, imunológicos e serológicos	
<b>EDTA</b>	Sangue total	Hemogramas	
<b>Fluoreto de sódio</b>	Plasma	Testes de glicose	

O laboratório possui um sistema informático, ao qual estão ligados todos os equipamentos, evidenciados na Tabela II, havendo passagem automática da informação e dos resultados, consoante o código associado ao paciente na receção.

O LFG tem, para além do Laboratório Central em Évora, 50 postos de colheitas espalhados por todo o Alentejo. As amostras provenientes destes postos de colheitas são devidamente identificadas, com um código correspondente ao paciente e ao posto de colheita, e depois são convenientemente acondicionadas e transportadas por veículos da empresa, diariamente, para o Laboratório central.

**Tabela II:** Aparelhos usados no LFG, respetiva técnica e funcionalidade.

<b>Area técnica</b>	<b>Aparelho</b>	<b>Técnica</b>	<b>Funcionalidade</b>
<b>Bioquímica</b>	Advia 1800	Espectrofotometria	Parâmetros bioquímicos
	Aution MAX Ax4280	Fotometria	Urianálise
	Hydrasis phoresis	Eletroforese	Electroforese
<b>Imunologia</b>	Immulite 2000®	Quimioluminescência	Parâmetros
	Advia Centaur XP	Quimioluminescência	imunológicos
<b>Hematologia</b>	Advia 120 e 2120	Citometria de fluxo	Hemograma
	Vescube 80	Sensores óticos	Velocidade de sedimentação
	Adams A1c HA8160	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Hemoglobina A1c
	Sysmex CA 1500	Coagulação	Fatores de coagulação
<b>Microbiologia</b>	Vitek 2C	Incubação, Leitura ótica de turvação e coloração	Identificação de bactérias e antibiogramas
<b>Serologia</b>	Diana Grifols	Técnicas de aglutinação	Sistema ABO e Coombs
	Vidas 30	ELFA	Serologia

### **1.1. Controlo de Qualidade**

O controlo de qualidade é um sistema usado para avaliar a qualidade dos serviços, consoante as especificações técnicas. Isto passa por se realizar todos os dias, antes de se iniciar o processamento de amostras, um controlo de qualidade interno para cada técnica em cada aparelho, provido pelos fornecedores dos respetivos equipamentos. Desta forma antes de se iniciar a rotina de análise de amostras é sempre verificado que o aparelho em questão está no seu pleno funcionamento e que as amostras vão ser devidamente analisadas e que os resultados serão fidedignos.

É também realizado um controlo de qualidade externo mensalmente, permitindo a comparação de resultados com outros laboratórios e a deteção de erros sistemáticos que possam não estar a ser detetados no controlo interno. Para este efeito existem diversos programas de controlo e fornecedores. No LFG é realizado o PNAEQ (Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade dos Laboratórios), fornecido pelo Instituto Nacional de

Saúde Dr. Ricardo Jorge, o NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*), o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), o SEHH (Sociedade Espanhola de Hematologia e Hemoterapia) e o SEQC (Sociedade Espanhola de Química Clínica). Para realização do controlo de qualidade externo cada fornecedor envia ao laboratório amostras correspondentes a determinado número de ensaios, consoante as técnicas a avaliar e a área. Estes controlos são então realizados num dia normal de funcionamento e posteriormente os dados são enviados aos respetivos fornecedores que depois os avaliam devidamente, sendo que esta avaliação permite comparar os valores obtidos no laboratório com os de outros laboratórios e agências responsáveis pelo controlo externo, verificando se estes estão de acordo, garantindo assim o controlo dos procedimentos efetuados e dos resultados obtidos nas amostras dos utentes.

## **2. Hematologia**

A hematologia é a área da ciência que estuda o sangue, a nível dos seus elementos figurados (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) e não figurados (plasma), os órgãos hematopoiéticos, a hematopoiese e também a hemóstase. Estuda a possível existência de alguma alteração, em qualquer um dos seus elementos, e a sua possível causa.

O sangue é um fluido constituído por uma componente celular (elementos figurados ou hematócrito) e uma componente líquida (plasma). Cerca de 55% do volume sanguíneo é composto pelo plasma, este é constituído maioritariamente por água, mas também estão presentes componentes inorgânicos, tais como sódio, potássio, cloro, entre outros, e componentes orgânicos, tais como as proteínas, os ácidos gordos e a glicose. Um dos componentes mais importantes são as proteínas, chamadas proteínas plasmáticas, tais como a albumina, as imunoglobulinas, o fibrinogénio e muitas outras (1).

### **2.1. Hematopoiese**

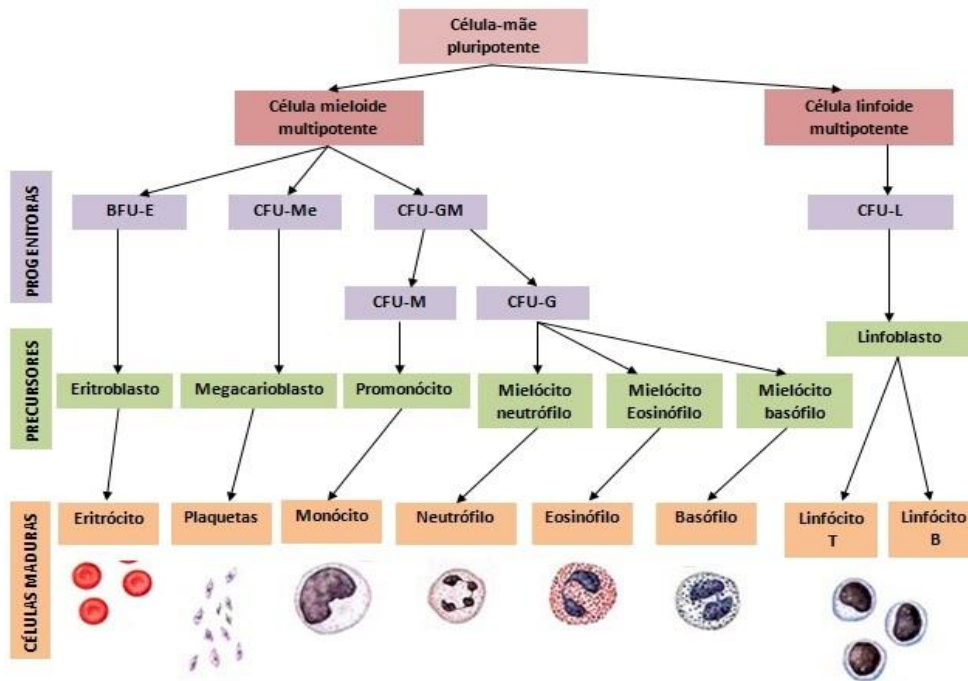
A hematopoiese inclui todos os processos que levam à formação de células sanguíneas maduras, regulando a génese celular consoante as necessidades do organismo. A nível embrionário a hematopoiese ocorre no saco vitelino, passando posteriormente a ocorrer no fígado e baço fetais e, a partir dos 6 meses de gestação, na medula óssea. Na vida adulta a hematopoiese ocorre essencialmente na medula óssea dos ossos chatos e longos (2).

As células sanguíneas derivam de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes que têm capacidade diferenciadora e de autorrenovação. Estas dão origem a duas linhagens de células multipotentes diferentes, a mieloide e a linfoide, que por sua vez originam os precursores específicos de uma determinada linhagem celular (2). As células multipotentes de linhagem mieloide dão origem aos eritroblastos, precursores dos eritrócitos, aos megacariócitos, precursores das plaquetas, e aos mieloblastos, que são os precursores dos monócitos e dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), e ainda células dendríticas mieloides. As de linhagem linfoide dão origem aos linfoblastos, precursores dos linfócitos T e B, às células dendríticas linfoides e às células NK (natural killer) (Figura 1) (1).

Estes processos necessitam de ter um ambiente propício à sua ocorrência, ou seja, um ambiente medular benéfico, requerendo ainda a presença de algumas vitaminas, como a vitamina B12 e o ácido fólico, que são essenciais para a síntese de DNA e também para a divisão celular, são também necessários fatores de crescimento, tais como a eritropoietina, trombopoietina e as citocinas (2). As citocinas são um grupo de substâncias, constituído por



fatores de crescimento e interleucinas, estas encontram-se na medula óssea em pequenas quantidades, sendo que os fatores de crescimento atuam mais especificamente sobre as células mieloides, enquanto que as interleucinas têm mais ação nas células linfoides (1). Estes fatores atuam a nível da proliferação, diferenciação, maturação, ativação e ajudam também a prevenir a apoptose das células progenitoras (2).



**Figura 1:** Esquema resumo da formação das células hematopoiéticas, com indicação de todas as células precursoras. (Adaptado de <http://know.net/ciencterravida/biologia/hematopoiese/> em 18/05/2018)

## 2.2. Hemóstase

É o processo fisiológico que protege o sistema vascular quando ocorre uma lesão. Este depende de um conjunto de mecanismos que contribuem rapidamente para parar uma hemorragia, atuando localmente e de modo limitado, para não comprometer o fluxo normal do sangue (4). Depende da interação entre elementos da parede vascular, como o colagénio e o fator von Willbrand, das plaquetas circulantes e de proteínas plasmáticas.

Divide-se em hemóstase primária e hemóstase secundária (1). Na hemóstase primária há formação do trombo plaquetar, através da vasoconstrição imediata, adesão e agregação plaquetar, que acontece com a finalidade de diminuir o fluxo local e de permitir um maior contacto entre as plaquetas e o local da lesão. Na hemóstase secundária, também chamada

de Cascata de Coagulação, é formado o coágulo de fibrina insolúvel, pela ativação do sistema pró-coagulante que permite a formação de fibrina e a sua deposição entre as plaquetas agregadas.

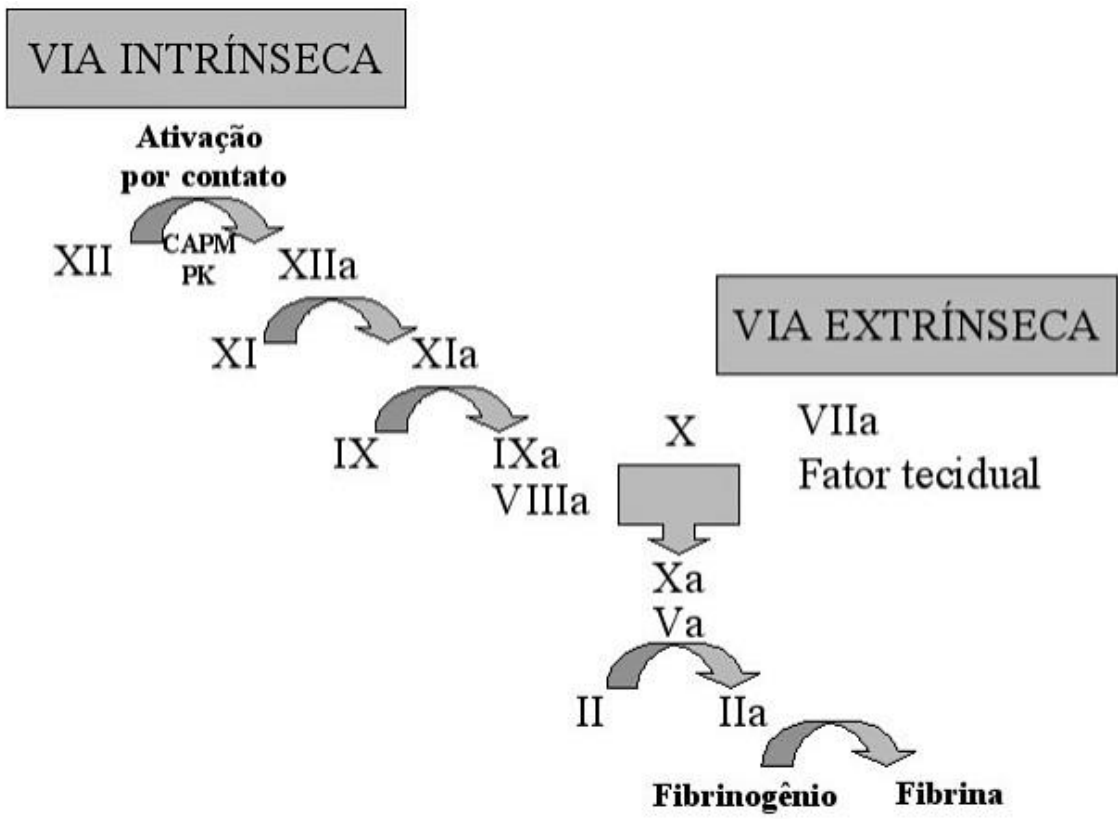
A cascata de coagulação pode ser ativada por 2 vias: a via extrínseca e a via intrínseca, que prosseguem depois através da via comum que culmina com a formação de fibrina (Figura 2) (5).

A via extrínseca envolve componentes do sangue e componentes que não estão normalmente no espaço intravascular, nomeadamente o fator tecidual (FT), que é sintetizado em diversos órgãos e também pelas células das camadas profundas da parede vascular, e é libertado aquando de uma lesão endotelial. Nesta via o fator tecidual ativa o fator VII – fator VIIa – e formam assim o complexo FT/FVIIa que por sua vez vai ativar o fator X – fator Xa (1/5).

A via intrínseca é iniciada após haver contacto do plasma com uma superfície com carga negativa (vidro, colagénio), chamada ativação por contacto, ativando diretamente o fator XII. Este vai então ativar o fator XI por sua vez vai ativar o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X (4).

A via comum inicia-se com a ativação do fator X, que combinado com fosfolípidos libertados pelas plaquetas e com o fator V levam à formação de trombina. A trombina tem como principal função converter fibrinogénio em fibrina, mas também promove a ativação plaquetária e a ativação do fator VIII que estabiliza o coágulo (4).

Em contrapartida, na fibrinólise ocorre a dissolução do coágulo por ação enzimática (1). O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas que regulam a formação de plasmina a partir do seu precursor, o plasminogénio. Este processo ocorre devido à presença de dois ativadores fisiológicos do plasminogénio, o ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) e a uroquinase (u-PA). Apesar da plasmina conseguir degradar não só a fibrina, mas também o fator V e VIII, em condições fisiológicas este processo é altamente específico para a fibrina. A inibição deste sistema ocorre a nível dos ativadores do plasminogénio, por ação de inibidores específicos (PAI-1 e PAI-2), e diretamente sobre a plasmina, por atuação da  $\alpha$ 2-antiplasmina.



**Figura 2:** Esquemática da cascata de coagulação, representando as vias intrínseca e extrínseca. (Adaptado de Franco, R. Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001 em 18/05/2018)

### 2.3. Determinações analíticas

Na secção de Hematologia do LDFG são efetuadas várias determinações que auxiliam o diagnóstico médico, tais como o hemograma, a velocidade de sedimentação, o esfregaço sanguíneo, as provas de coagulação e a determinação da hemoglobina glicada (Hb A1c).

Aqui foi-me possível participar em todas as etapas referentes às análises hematológicas, auxiliando na limpeza e manutenção dos aparelhos, colocação de controlos de qualidade e verificação do seu resultado, tratamento das amostras para posterior colocação nos respetivos aparelhos e limpeza final após o final do dia de trabalho.

#### 2.3.1. Hemograma

O hemograma é um dos testes mais requisitados pelos médicos, pois permite avaliar o estado geral do paciente com base nos valores correspondentes a cada um dos seus parâmetros. Este faz uma contagem diferencial de todas as células sanguíneas, sejam da serie vermelha, branca ou plaquetas.

Neste teste são feitas várias determinações analíticas, tais como a concentração de hemoglobina (HB), contagem total de glóbulos vermelhos (RBC), contagem total de glóbulos brancos (WBC), contagem de plaquetas, contagem diferencial dos diferentes tipos de glóbulos brancos, reticulócitos, hematócrito (que representa a proporção de glóbulos vermelhos no volume total de sangue), entre outras. A concentração de hemoglobina, por exemplo, é um parâmetro de excelência para avaliar a existência de uma possível anemia, tal como a contagem de glóbulos vermelhos também poderá dar esta indicação, quando as suas concentrações se encontram abaixo dos níveis normais. A quantidade de reticulócitos, que representam o número de eritrócitos recém-formados, é utilizado como medida de função da medula óssea, permitindo verificar se esta está a produzir células vermelhas com normalidade ou não. A nível dos glóbulos brancos é possível determinar se o paciente se encontra com algum tipo de infeção, quando apresenta leucocitose (número de leucócitos aumentado), ou com suscetibilidade de adquirir uma infeção, quando apresenta leucopenia (número de leucócitos diminuído). Já as plaquetas ajudam a determinar uma possível patologia a nível da coagulação.

No LDFG existem dois aparelhos de Hemogramas, o Advia®120 e o Advia®2120, os dois utilizam o mesmo método, a citometria de fluxo, que consiste na análise eletrónica de sinais gerados por células em suspensão, quando estas são intercetadas por um feixe de luz a um determinado comprimento de onda. O padrão da dispersão de luz gerado depende então da forma, do tamanho e da estrutura celular, permitindo assim fazer uma contagem diferencial dos diferentes tipos de células presentes no sangue. Diariamente são utilizados os dois em simultâneo, tendo em conta o grande fluxo de hemogramas que são realizados. Para a realização da contagem dos diferentes tipos celulares existem cinco câmaras de reação, a de hemoglobina (HB), a dos basófilos, a dos reticulócitos, a dos eritrócitos/plaquetas (RBC/PLT) e a dos glóbulos brancos.

#### **a. Hemoglobina (HB)**

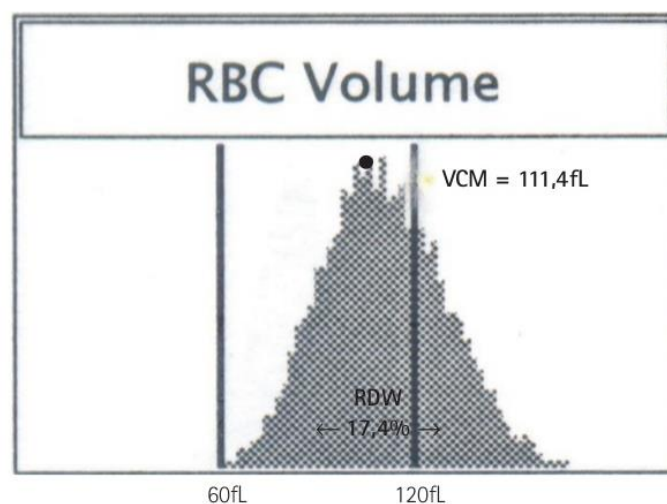
Para a determinação da concentração de hemoglobina, na câmara de reação primeiro os glóbulos vermelhos são lisados libertando a hemoglobina, isto acontece devido à presença de um surfactante no reagente, depois o ferro-heme da HB é oxidado ao ar passando do estado ferroso para o estado férrico. Após este processo o ferro coordena-se com um ião hidroxilo e uma molécula de água levando à formação do mono-aquo-mono-

hidroxiferriporfirina como produto de reação. As leituras óticas são obtidas espectrofotometricamente a 565nm.

### b. Canal de eritrócitos/plaquetas (RBC/PLT)

Nesta câmara de reação é realizada a contagem total de glóbulos vermelhos e das plaquetas, onde o Dodecil Sulfato de Sódio e o Glutaraldeido, presentes no reagente, provocam a fixação e a permeabilização das células. Depois um volume constante da suspensão celular passa na câmara de fluxo, onde são medidas as dispersões de luz em ângulo baixo ( $2^\circ$  a  $3^\circ$ ) e ângulo alto ( $5^\circ$  a  $15^\circ$ ), célula a célula, sendo que a medida de ângulo baixo é convertida em volume da célula e a medida de ângulo alto convertida em concentração de HB. Outros parâmetros como o volume corpuscular médio (MCV), o índice de variação do tamanho dos eritrócitos (RDW), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o hematócrito, entre outros são determinados a partir dos histogramas obtidos.

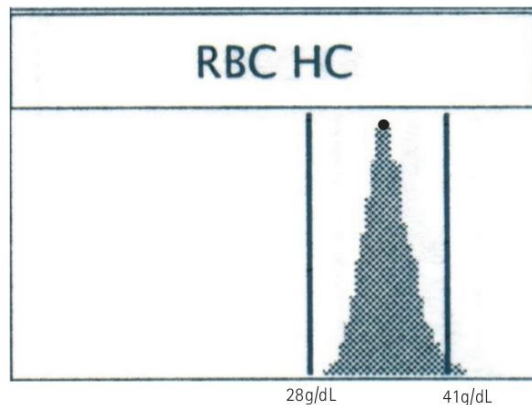
- O histograma de volume, representado na figura 3, mostra a distribuição em volume, célula a célula, isto é, a frequência de células de igual volume detetadas, e tem uma amplitude de 0 fL a 200 fL. Através deste histograma é possível determinar o MCV, sendo este a média da curva, e o RDW, sendo este o coeficiente de variação de população de eritrócitos em relação ao seu volume.



**Figura 3:** Exemplo de um histograma para o volume eritrocitário, sendo VCM a média e o RDW o coeficiente de variação. (Adaptado de <https://www.slideshare.net/samyracecilio/hemograma-como-fazer-e-interpretar> em 20/05/2018)

- O histograma RBC HC (concentração de HB) representado na figura 4, exibe a distribuição em frequência dos eritrócitos quanto à concentração celular de HB, tem uma amplitude dos

0 fL aos 50 fL. Através deste é possível determinar o MCHC, sendo a média da curva, e o HDW (amplitude de distribuição da concentração de HB), que é o desvio padrão.



**Figura 4:** Exemplo de um histograma para a concentração de Hb celular. (Adaptado de <https://www.slideshare.net/samyracecilio/hemograma-como-fazer-e-interpretar> em 20/05/2018)

No caso das plaquetas é realizada uma análise bidimensional, baseada na análise de plaquetas e eritrócitos. O citograma é obtido emparelhando sinais de dispersão de luz adquiridos a ângulo baixo, que nesta determinação é amplificado 30 vezes, e a ângulo alto, que é amplificado 12 vezes, sendo que neste caso o sinal do ângulo baixo é convertido em volume e o do ângulo alto é convertido em índice de refração. Deteta plaquetas com volumes entre os 0 fL e os 30 fL.

### c. Canal de reticulócitos

Aqui é realizada a contagem de reticulócitos, que representa o número de glóbulos vermelhos recém-formados, num dado volume. O reagente utilizado para este parâmetro contém um detergente surfactante que faz com que os glóbulos vermelhos fiquem em forma esférica, de forma a manter o seu volume inalterável, possui também um corante vital, o oxazine, que cora as células de acordo com o seu conteúdo de RNA. Após ocorrência da reação na câmara, um volume constante da suspensão passa pela câmara de fluxo, onde são medidas a dispersão de luz em ângulo baixo ( $2^\circ$  a  $3^\circ$ ) e alto ( $5^\circ$  a  $15^\circ$ ), e as características de absorção de cada célula. As dispersões em ângulo baixo e alto são proporcionais ao tamanho das células e concentração de HB, os espectros de absorção são proporcionais ao conteúdo de RNA, sendo que os reticulócitos corados absorvem mais luz que os eritrócitos maduros.

#### **d. Canal Peroxidase (WBC)**

Neste canal são realizadas as contagens de glóbulos brancos, e neste caso existem três reagentes, o Perox 1, o Perox 2 e o Perox 3. Inicialmente ocorre a lise dos glóbulos vermelhos, por combinação dos surfactantes, presentes no Perox 1, a temperatura elevada. Posteriormente o formaldeído fixa os leucócitos e o meio hipertônico causa alguma diminuição do volume dos leucócitos. Depois juntam-se o Perox 2 e 3, onde o 4-cloro-1-naftol do Perox 2 serve como substrato, permitindo que o peróxido de hidrogênio, proveniente do Perox 3, forme um precipitado negro no interior dos grânulos dos leucócitos com atividade de enzimas peroxidase (neutrófilos, monócitos e eosinófilos). Os glóbulos brancos são então identificados consoante o seu tamanho e a intensidade da atividade de enzimas peroxidase.

Tal como nos outros casos, um volume constante da suspensão passa pela câmara de fluxo, onde a absorção da coloração devido à atividade peroxidase e a dispersão da luz (correlacionada com o tamanho da célula) são medidas, célula a célula. Depois os sinais de dispersão e absorção de luz são detetados e amplificados eletronicamente, dando origem aos histogramas e gráficos de dispersão.

#### **e. Canal dos Basófilos**

Aqui é finalmente realizada a contagem de basófilos, A junção do reagente, que possui ácido ftálico (produzido pela ação do ácido azótico sobre o bicloreto de naftalina) e surfactante, com a temperatura elevada (32°C a 34°C) beneficia a lise dos glóbulos vermelhos, das plaquetas e do citoplasma de todos os leucócitos, com exceção dos basófilos. Assim os glóbulos brancos despojados podem ser categorizados como mononucleares ou polimorfonucleares, com base na forma e complexidade dos seus núcleos, e os basófilos intactos podem ser facilmente distinguidos dos núcleos menores. Um volume constante da suspensão passa pela câmara de fluxo, onde são medidas as dispersões de luz a ângulo baixo e ângulo alto, consoante o tamanho da célula ou núcleo.

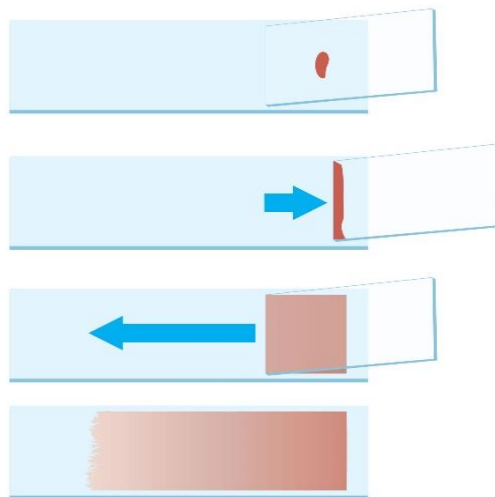
Da passagem por todos estes canais resulta o Hemograma no seu todo, permitindo ao médico verificar a existência de algum problema a nível hematológico, seja uma anemia, revelada pelos níveis de HB, seja uma infeção, revelada pelos níveis de leucócitos, entre muitas outras.

### 2.3.2. Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço sanguíneo, no LDFG, é feito normalmente quando os resultados apresentados pelo aparelho suscitam algumas dúvidas. Este fornece informações mais específicas quanto à morfologia e contagem celular.

Para a sua realização é colocada uma gota do sangue do paciente na extremidade de uma lâmina, depois com outra lâmina faz-se a extensão da gota, com um movimento de frente para trás, num ângulo de 45°, como representado na figura 5 (3).

A coloração utilizada é a de May-Grünwald-Giemsa, na qual o azul de metileno reage com os componentes ácidos das células, corando-os de azul (núcleos, heterocromatina), e a eosina reage com os componentes básicos, corando-os de vermelho ou rosa (citoplasma).



**Figura 5:** Técnica de esfregaço sanguíneo. (Adaptado de <http://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/> em 20/05/2018)

### 2.3.3. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação mede a rapidez com que sedimentam os eritrócitos. Este valor é influenciado pela concentração plasmática de algumas proteínas, por propriedades dos eritrócitos e pelo valor do hematócrito. Os valores podem estar alterados em situações inflamatórias e em certas patologias, como neoplasias (9).

Para determinação da Velocidade de Sedimentação são usadas amostras de sangue total, tal como nos hemogramas, sendo colhidas para os mesmos tubos, contendo EDTA como anticoagulante.

No LDFG é usado o Ves-Matic Cube 80, ilustrado na figura 6, que é um dispositivo de bancada, capaz de analisar até 90 amostras por hora, efetua a análise diretamente nos tubos



de hemograma e dá resultados em 20 minutos. Este possui dois pares de elementos ótico-eletrônicos, constituídos por um Led de alta potência e um sensor fotográfico analógico.



**Figura 6:** VesMatic Cube 80. (Adaptado de [http://www.axonlab.com/CH\\_ita/Hospital-priv.-laboratories/Human-medicine/Erythrocyte-sedimentation/VES-MATIC-CUBE-80](http://www.axonlab.com/CH_ita/Hospital-priv.-laboratories/Human-medicine/Erythrocyte-sedimentation/VES-MATIC-CUBE-80) em 25/05/2018)

Os tubos são agitados antes de entrarem no aparelho, são colocados numa rack e esta é introduzida no aparelho. Uma vez dentro do aparelho são lidos os códigos de barras e são introduzidos na cadeia do módulo de análise I a I, depois são transferidos para a zona de agitação, onde cada amostra é agitada 15 vezes. Na saída da zona de agitação ele efetua a primeira leitura para determinar o nível total de sangue, depois cada tubo é movido, dentro da cadeia, a cada 19 segundos para a segunda leitura. Este processo demora 20 minutos, chegando ao segundo sensor é então feita a leitura ótica para determinação do nível de corpúsculos, após a sedimentação. Os dados são depois elaborados, impressos e transmitidos ao sistema informático.

Os valores obtidos são relacionados com o método de referência de Westergren, que utiliza amostras de sangue não diluído, com EDTA como anticoagulante. Os valores normais no Homem encontram-se entre 1 e 10 mm e na Mulher entre 1 e 15 mm.

#### **2.3.4. Provas de Coagulação**

Estas provas são muitas vezes solicitadas pelos médicos, no sentido de perceber se há alguma alteração nos tempos de coagulação dos pacientes, principalmente em casos em que estes apresentam histórico de hemorragias ou doenças que alterem os fatores hemostáticos. São também muito solicitadas na avaliação pré-operatória e também na monitorização de pacientes que estão medicados com anticoagulantes orais, como tratamento de problemas vasculares e cardíacos.

Para realização destas provas, no LDFG, existe o Sysmex CA 1500, que é um analisador de coagulação sanguínea, para uso em diagnóstico *in vitro*. Este consegue analisar o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa), e o Fibrinogénio, entre outros.

São colhidas amostras de sangue total para um tudo com citrato de sódio, como anticoagulante, que depois vão a centrifugar a 1500 r.p.m. por 15 minutos, e é então separado o plasma que vai para análise.

Os tubos com as amostras são colocados numa *rack* e vão para o aparelho. Este aspira uma certa quantidade do plasma das amostras e coloca-as nas placas de amostra, onde estas são aquecidas. Depois são transferidas para os tubos de reação, juntamente com o reagente correspondente a cada ensaio, cuja indicação será feita mais à frente, também aquecido. Este aparelho utiliza o método de coagulação e conforme a reação progride e os coágulos de fibrina se vão formando a amostra torna-se turva. A mistura é então exposta a uma luz vermelha com comprimento de onda de 660 nm, que deteta a turbidez através de um aumento acentuado na intensidade de dispersão da luz. A luz dispersa que é gerada é recebida por um fotodiodo, que converte a luz em sinais elétricos, que são armazenados e calculados formando uma curva de coagulação.

- a. **TP:** é utilizado um reagente que contém uma concentração ótima de extrato tecidual (tromboplastina) e cálcio. Mede o tempo de formação de fibrina, após ativação dos fatores pelo fator tecidual adicionado. Indica a eficiência global das vias extrínseca (Fator VII) e comum (Fatores X, V, II e Fibrinogénio), ou a existência de deficiências congénitas ou adquiridas em algum destes fatores (6). Utilizado na monitorização da terapia com anticoagulantes orais, juntamente com a Relação Monitorizada Internacional (INR). O INR foi aplicado pela OMS, de forma a uniformizar os resultados, tendo em conta o índice de sensibilidade internacional (ISI) do reagente utilizado (tromboplastina).
- b. **TTPa:** usa como reagentes um fator de contato, como a cefalina por exemplo, e NaCl. Mede o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação por contato (sem adição de FT), indicando globalmente a eficácia da via intrínseca e comum. Serve para fazer a monitorização da terapêutica com heparina clássica (9).
- c. **Doseamento do fibrinogénio:** avalia-se pelo tempo de trombina, uma vez que a trombina é o ativador direto do fibrinogénio, permitindo a quebra deste num monómero de fibrina insolúvel. Utiliza-se um reagente contendo trombina bovina e o

tempo de coagulação é proporcional à concentração de fibrinogénio. Avalia a eficácia da via comum da cascata de coagulação.

### **2.3.5. Hemoglobina Glicada – Hb A1c**

A hemoglobina A é a forma principal da Hb no adulto, sendo a HbA0 o principal componente, correspondente à fração não glicada da HbA. A HbA1 corresponde a formas de HbA carregadas mais negativamente, devido à adição de glicose e outros hidratos de carbono. A HbA1 possui vários subtipos, sendo a A1c a que se refere à porção glicada, cujo resíduo de valina no terminal amínico (N-terminal) da cadeia beta está ligada à glicose, por uma ligação estável e irreversível (8).

Esta determinação é efetuada para auxiliar no diagnóstico da *Diabetes Mellitus* e na monitorização terapêutica destes doentes (7), uma vez que a quantidade de glicose ligada à HB é diretamente proporcional à concentração média de glicose no sangue, refletindo a média dos níveis glicémicos dos últimos 2 a 4 meses, isto porque depende do tempo de vida médio dos eritrócitos (120 dias aproximadamente). Os valores de referência deste parâmetro vão dos 4% aos 6%, sendo que níveis acima dos 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crónicas.

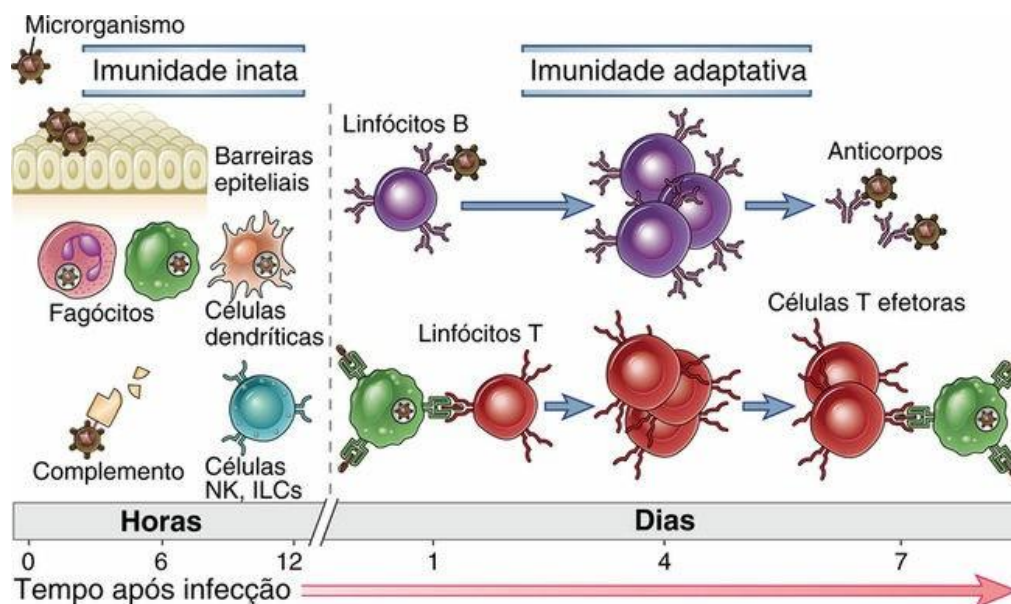
Neste laboratório existem dois Adams HA-8160 para a realização destas análises, e são utilizadas amostras de sangue colhidas para tubos de hemograma com EDTA.

Este aparelho permite medir os níveis de HbA1c, HbA1, HbF e HbA2, desde que configurado para tal. A técnica utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde a hemoglobina não glicada apresenta carga positiva interagindo mais com a coluna catiónica, de carga negativa, e na presença de um tampão adequado a fração glicada flui mais facilmente, permitindo a separação das duas frações. O procedimento demora cerca de 3 minutos por amostra e após terminar a análise de cada amostra é impresso um cromatograma e os resultados são igualmente transmitidos para o sistema informático, automaticamente.

### 3. Imunologia

A imunologia é a área da ciência que estuda os mecanismos de defesa do organismo contra agentes estranhos, tais como vírus ou bactérias, ou mesmo contra células anormais que possam proliferar e gerar doenças, como o cancro.

Para um estado de saúde pleno é necessário um sistema imunológico funcional, composto por um conjunto de células, órgãos e moléculas, que mediem a resistência às infeções e à doença oncológica. A proteção contra os microrganismos é mediada, no início, por reações de imunidade inata e, caso a resposta imunológica inata não consiga eliminar os microrganismos, é desencadeada a ativação da resposta imunológica adaptativa, como é demonstrado na figura 7 (11).



**Figura 7:** Evolução da resposta imunológica, com início na imunidade inata, pelas barreiras físicas e químicas, passando pelas células de imunidade inata, até chegar à imunidade adaptativa, onde há ativação das células T e células B, com produção ou não de anticorpos e resolução da infeção. (Adaptado de <http://www.conteudoacademicoweb.com.br/2017/08/imunidade-inata-e-adaptativa.html> 30/05/2018)

#### 3.1. Imunidade Inata

Esta proporciona uma linha de defesa primária contra os microrganismos prevenindo, controlando ou eliminando a infeção. Tem como principais componentes: i) as barreiras físicas e químicas, como a pele, as mucosas, os fluidos corporais ou o pH do estômago; ii) as células dendríticas, os fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos) e as células natural killer; e iii) proteínas do sangue, como mediadores da inflamação e citocinas, que regulam e coordenam atividades das células (14).

### **3.1.1. Componentes da Imunidade Inata**

#### **i. Barreiras físicas e químicas**

Sendo as principais vias de entrada dos microrganismos a pele, e as mucosas dos sistemas respiratório e gastrointestinal, estas constituem um mecanismo de proteção muito importante. A pele tem uma função protetora que impede a entrada, até certo ponto, dos agentes estranhos, isto porque tem uma função de barreira física e além disto possui um revestimento gordo devido às secreções sebáceas e ligeiramente ácido que impede a adesão e proliferação de microrganismos (12). Também o sistema respiratório possui mecanismos de proteção contra microrganismos, como por exemplo o transporte mucociliar, que através de um revestimento mucoso das vias aéreas, juntamente com os cílios presentes, conseguem expulsar os microrganismos, através da tosse e dos espirros (13). Já no sistema gastrointestinal os mecanismos de proteção passam pela ação bactericida do suco gástrico, biliar e secreções pancreáticas, pelos movimentos peristálticos do intestino delgado e também pela microbiota do indivíduo.

#### **ii. Células dendríticas (CD)**

Residem em tecidos periféricos, como a pele, o fígado e o intestino, onde capturam os antígenos e são ativadas, migrando depois para os nódulos linfáticos, onde apresentam os antígenos aos linfócitos T. As CD imaturas são muito competentes na captura dos antígenos, enquanto as CD maduras são mais eficazes na apresentação destes (14). Os antígenos são capturados e depois são processados dentro da célula e apresentados na sua superfície, num complexo com moléculas do complexo MHC (*Major Histocompatibility Complex*). O MHC é o complexo de histocompatibilidade major, que representa um grupo de genes que codifica dois grupos de proteínas estruturalmente diferentes, MHC de classe I e MHC de classe II, cujos produtos estão envolvidos na apresentação de antígenos (11). Podem reter o antígeno por longos períodos de tempo, podendo assim contribuir para a memória imunológica. As CD ainda conseguem estimular a migração de outros tipos de células do sistema imunológico, através da secreção de quimiocinas (14).

#### **iii. Neutrófilos**

Estes são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea, sendo muito importantes nas fases precoces das reações imunológicas. São das primeiras células a migrarem dos vasos sanguíneos para os tecidos, atraídos por quimiocinas, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento, imunocomplexos, quimiocinas e citocinas (14).

#### **iv. Macrófagos**

Têm origem a partir dos monócitos que migram da circulação sanguínea para os tecidos, encontrando-se no tecido conjuntivo ou no parênquima dos órgãos. São fagócitos muito eficientes e podem permanecer nos tecidos por muito tempo. Além de serem fagócitos estes também atuam como células apresentadoras de antígeno, potenciando a ativação dos linfócitos T (14).

#### **v. Células Natural Killer**

Estas células têm origem na medula óssea, a partir de um precursor comum aos linfócitos T. Representam uma importante linha de defesa, pois estas células reconhecem e lisam células infectadas com vírus e bactérias, e também células tumorais. Ainda estimulam neutrófilos e macrófagos, ativam as CD e os linfócitos, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (14).

#### **vi. Sistema do complemento**

Em resultado da ativação do sistema complemento formam-se fragmentos das proteínas do complemento que atuam como opsoninas e quimiotaxinas. A ativação do sistema do complemento é baseada em cascatas proteolíticas, e na sequência destas cascatas há uma grande amplificação da quantidade de produtos proteolíticos gerados, onde os passos finais da cascata levam à formação do complexo de ataque à membrana, originando a lise dos microrganismos. A sua ativação pode ocorrer por três vias distintas: clássica, alternativa e das lectinas. Na via clássica usa uma proteína plasmática denominada C1q, que deteta anticorpos à superfície de um microrganismo ou outra estrutura, depois da ligação da C1q à porção Fc dos anticorpos, são ativadas duas serina proteases, dando assim início à cascata proteolítica. A via alternativa é desencadeada por uma proteína denominada C3, quando reconhece certas estruturas da superfície microbiana. Finalmente, a via das lectinas é desencadeada por uma proteína plasmática, a lectina ligante de manose, que reconhece resíduos terminais de manose presentes em glicoproteínas microbianas, após este reconhecimento associam-se a ela dois zimogénios, com funções semelhantes às serina proteases da via clássica, e iniciam a cascata proteolítica (11).

#### **vii. Citocinas**

As citocinas são glicoproteínas ou polipéptidos extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células. Uma mesma citocina pode ser produzida por diferentes tipos de células, e pode também atuar em diferentes células. Estas moléculas influenciam a

atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas e regulam a produção de outras citocinas, que vão atenuar ou acentuar a resposta inflamatória, consoante a situação. As que atuam de forma pró-inflamatória são as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e o fator de necrose tumoral (TNF) e as anti-inflamatórias são as IL 4, 10 e 13 e o fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) (14/26).

A imunidade inata apresenta características defensivas, promovendo um ataque inicial aos agentes patogênicos, mas também estimula as respostas imunológicas adaptativas e, visto que certos componentes da resposta inata reagem de forma distinta a diferentes microrganismos, pode influenciar as respostas específicas que se vão gerar.

### **3.2. Imunidade adaptativa**

A imunidade adaptativa acontece quando a imunidade inata é incapaz de resolver a infecção presente, sendo necessária uma resposta mais adequada e específica. Após sucessivas exposições ao mesmo microrganismo, a resposta adaptativa é mais eficaz pois ocorre a maturação de afinidade dos anticorpos produzidos e há um maior número de linfócitos que reconhecem de forma específica o agente infeccioso. Este tipo de imunidade caracteriza-se pela sua especificidade para moléculas diferentes e pela sua capacidade de reagir cada vez com mais intensidade e também com produção de anticorpos de maior afinidade às exposições seguintes ao agente infeccioso, devido ao desenvolvimento de células de memória específicas para o antígeno. As células responsáveis por este tipo de imunidade são os linfócitos B e T, e também participam no sistema imunológico adaptativo células apresentadoras de antígeno, citocinas e alguns produtos do sistema complemento (11).

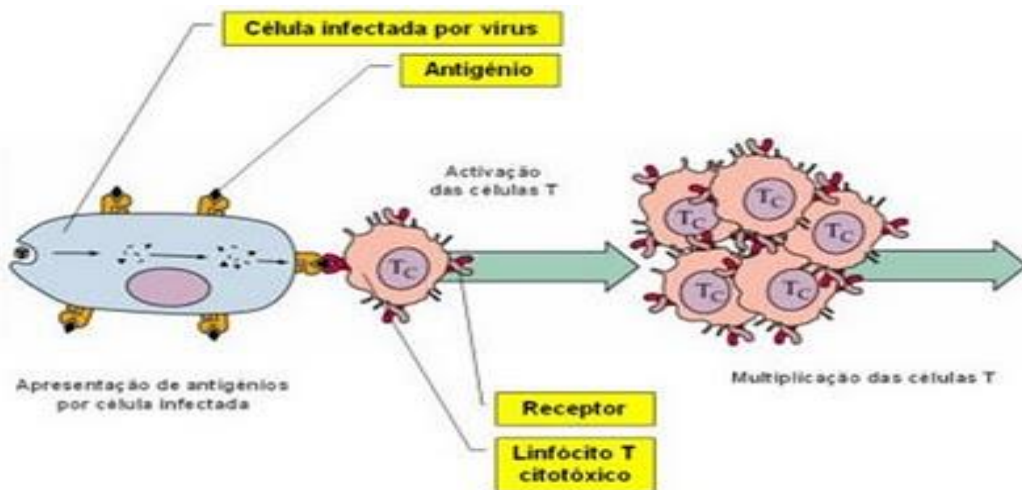
Os linfócitos B e T são as únicas células que apresentam recetores de antígenos distribuídos clonalmente, possuindo cada clone uma determinada especificidade antigénica. Os diferentes tipos de linfócitos diferem nas suas funções. Os linfócitos *naive*, ou virgens, são células T ou B maduras que residem nos órgãos linfoides periféricos ou na circulação e que nunca encontraram o antígeno correspondente, sendo assim não se encontram em divisão celular nem desempenham funções efetoras (11). Apenas depois de haver contato com o antígeno nos órgãos linfoides periféricos e de este ser reconhecido é que os linfócitos ficam ativos, e começam a proliferar. Algumas das células que resultam da expansão clonal acabam por se diferenciar em linfócitos efetores, tendo a capacidade de produzir moléculas que contribuem, direta ou indiretamente, para eliminar o antígeno, como é o caso dos linfócitos T auxiliares, dos linfócitos T citotóxicos ou dos plasmócitos secretores de anticorpos, e outra parte das células diferencia-se em linfócitos de memória (T e B). Os linfócitos T

auxiliares expressam moléculas de superfície e secretam citocinas que ativam os macrófagos e os linfócitos B enquanto os linfócitos T citotóxicos possuem grânulos citoplasmáticos preenchidos com proteínas que quando libertadas matam as células que apresentam o antígeno que reconhecem. Por outro lado, os plasmócitos secretam anticorpos solúveis que auxiliam a eliminar o agente infeccioso (15).

A ativação dos linfócitos acontece através de dois sinais diferentes, ou por apresentação do antígeno ou através de mediação por moléculas que são sintetizadas durante a resposta imunológica inata, tais como citocinas e produtos de proteólise do sistema do complemento. Os linfócitos são as células que reconhecem e que respondem especificamente a antígenos, atuando como mediadores da imunidade humoral e celular (11).

### 3.2.1. Imunidade celular

A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T e promove a destruição dos microrganismos através da eliminação dos reservatórios da infecção, no caso de infecções por vírus e bactérias intracelulares, mas também atuam contra algumas bactérias extracelulares. Os linfócitos T depois de formados migram dos órgãos linfóides para os tecidos periféricos, perto dos locais de infecção, onde depois reconhecem os antígenos proteicos dos microrganismos que são exibidos na superfície da célula infetada, tal como observado na figura 8. Após o reconhecimento antigénico os linfócitos T auxiliares são estimulados e começam a produzir citocinas e quimiocinas que estimulam uma migração muito maior de leucócitos ao local, promovendo assim uma melhor defesa (11).



**Figura 8:** Na figura pode observar-se a célula infetada com a apresentação dos antígenos à sua superfície, o reconhecimento pelos linfócitos T, ativação dos linfócitos e a proliferação destes de forma a combater a infecção. (Adaptado de <http://ponjoo.blogspot.com/2010/03/imunidade-celular.html> em 30/05/2018)



Existem populações de linfócitos T funcionalmente distintas, os linfócitos T auxiliares (*helper*), linfócitos T citotóxicos e linfócitos T reguladores.

Os linfócitos T auxiliares funcionam como um importante regulador do sistema imunológico, que produzem citocinas, moléculas de sinalização celular, que enviam mensagens aos diversos leucócitos que depois estimulam a ativação e proliferação dos linfócitos T citotóxicos e reguladores, a ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos para produção de anticorpos, e ainda ativação dos macrófagos.

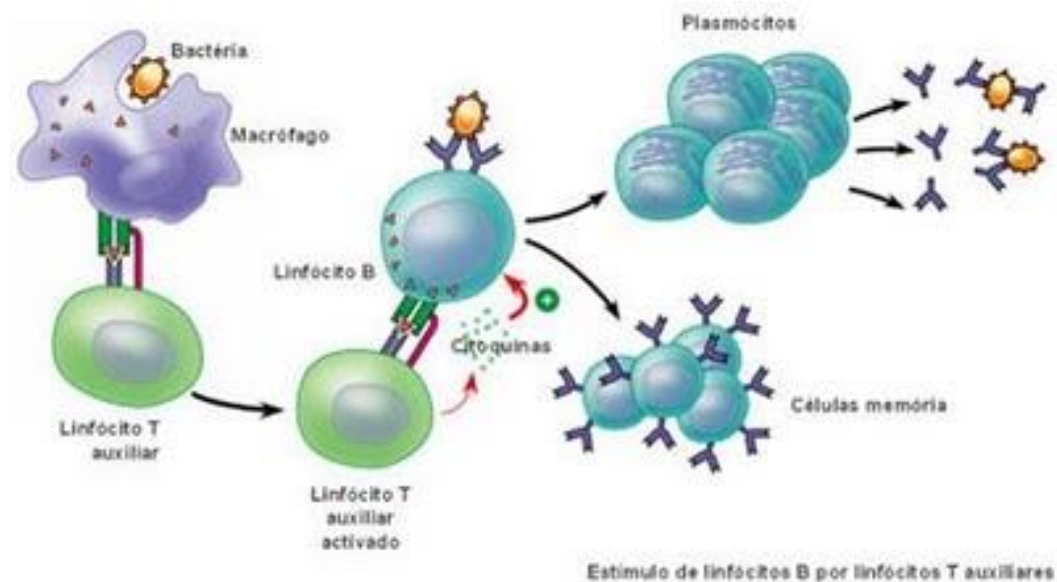
Os linfócitos T citotóxicos possuem recetores CD8 na membrana, com função de reconhecer o MHC de classe I. Os linfócitos T citotóxicos podem reconhecer as células que apresentam antígenos estranhos complexados com moléculas MHC de classe I, e libertam substâncias que originam a lise das células infetadas ou das células tumorais.

Os linfócitos T reguladores modulam a resposta imunológica através da inibição dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos (11).

### **3.2.2. Imunidade humoral**

É o principal mecanismo de proteção contra microrganismos extracelulares e toxinas. Esta é mediada pelos linfócitos B que, depois de reconhecer os antígenos e de sofrerem ativação, entram em divisão celular originando células que se diferenciam em células de memória ou plasmócitos que secretam anticorpos (também conhecidos como imunoglobulinas - Ig) solúveis.

As respostas dos anticorpos aos diferentes antígenos podem ser T dependentes ou T independentes. Nas respostas T dependentes os antígenos proteicos são expostos pelas células apresentadoras de antígenos às células T, que por sua vez potenciam a ativação dos linfócitos B que reconhecem o antígeno, estimulando assim a produção de anticorpos, como representado na figura 9. As respostas T independentes acontecem na presença de antígenos não proteicos, normalmente polissacarídeos, que estimulam a produção de anticorpos sem necessidade de intervenção das células T (16).



**Figura 9:** Ativação dos linfócitos B dependente de linfócitos T, com a consequente maturação em plasmócitos, produtores de anticorpos, e produção de células B de memória. (Adaptado de <http://ponjoo.blogspot.com/2010/03/imunidade-celular.html> em 30/05/2018)

As células B de memória conseguem sobreviver por anos no organismo, sem necessidade de estimulação antigénica e, em consequência dos eventos de mudança de classe do anticorpo, para além de expressarem anticorpos da classe M e D adicionalmente podem expressar moléculas de anticorpo de outros isótopos (IgE, IgG, IgA).

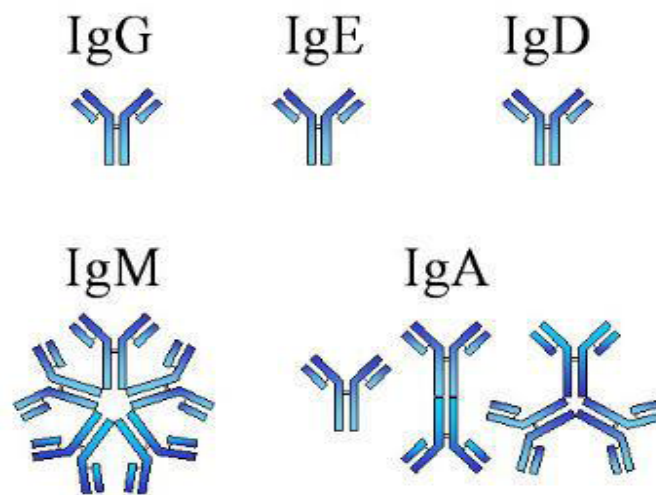
### 3.2.2.1. Anticorpos

São expressos durante a maturação dos linfócitos B, à sua superfície, ou são produzidos como moléculas solúveis pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados), que resultam da ativação de um clone de linfócitos pelo antígeno. Os anticorpos podem apresentar-se como proteínas membranares na superfície dos linfócitos B, funcionando como recetores de antígenos, ou como moléculas solúveis presentes nos fluidos biológicos e nas mucosas, onde neutralizam toxinas, impedem a entrada, a proliferação e eliminam microrganismos.

As funções efetoras mediadas pelos anticorpos incluem a neutralização dos microrganismos e produtos tóxicos, a ativação do sistema do complemento, a opsonização de microrganismos, a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e a ativação de mastócitos mediada por anticorpos (11).

### a. Estrutura dos anticorpos

Todos os anticorpos partilham as mesmas características estruturais básicas, apresentando uma grande variabilidade na região de ligação do antígeno. Uma molécula de anticorpo apresenta uma estrutura central simétrica em forma de Y, composta por duas cadeias leves e duas pesadas, idênticas entre si, ligadas por pontes dissulfureto. As cadeias contêm uma série de domínios com cerca de 110 resíduos de aminoácidos, que se doblam numa forma globular, designados domínios Ig. As cadeias pesadas e leves são compostas por uma região constante e uma variável, sendo a região variável responsável pela interação com o antígeno e a região constante da cadeia pesada medeia as funções efetoras dos anticorpos (11). As imunoglobulinas podem ser classificadas em diferentes classes, distinguidas com base nas diferenças estruturais da região constante das cadeias pesadas. Assim, a IgA tem uma cadeia do tipo  $\alpha$ , a IgD uma do tipo  $\delta$ , a IgE uma do tipo  $\epsilon$ , a IgG uma do tipo  $\gamma$  e a IgM uma do tipo  $\mu$  (Figura 10) (17).



**Figura 10:** Representação esquemática das Imunoglobulinas. (Adaptado de <https://www.todamateria.com.br/anticorpos/> em 31/05/2018)

### b. Classes de Imunoglobulinas (17)

#### i. IgA

Representa 15 a 20% das imunoglobulinas no soro. É a Ig predominante em secreções, como a saliva e as lágrimas, e na superfície das mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital, onde se encontra associada ao componente secretor, designando-se por IgA secretora. Tem como principal função proteger o organismo da invasão viral ou bacteriana, através da sua neutralização.

## **ii. IgD**

A função desta classe ainda não está bem esclarecida, sendo expressa juntamente com a IgM na superfície de quase todas as células B.

## **iii. IgE**

É a imunoglobulina presente em menor concentração sérica, uma vez que após o primeiro contacto com o alérgeno, há produção de IgE específica que depois se liga aos recetores de alta afinidade específicos de IgE presentes nas membranas superficiais dos mastócitos e basófilos (24). Após um segundo contacto com o alérgeno, este liga-se à IgE na superfície dos mastócitos e basófilos, resultando na desgranulação destas células e posterior libertação de histamina, mediador inflamatório que causa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e mobilização de outras células que participam no processo inflamatório. Por promover a ativação destas células e libertação de histamina nas superfícies das mucosas nasal, conjuntiva e brônquica é muito associada a reações alérgicas, mas pode ter também um papel importante no combate contra helmintas.

## **iv. IgG**

Representa 80% das imunoglobulinas no soro, encontra-se distribuída igualmente entre os espaços intravascular e extravascular. Esta classe de anticorpos tem a capacidade de ativar o sistema do complemento, o que amplifica a resposta inflamatória através da quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos e do aumento da permeabilidade vascular.

## **v. IgM**

No soro a IgM está presente na forma pentamérica, com cinco moléculas de anticorpo ligadas por pontes dissulfeto, onde todas as cadeias pesadas são idênticas e cadeias leves são idênticas. A estrutura pentamérica da IgM contém ainda uma cadeia polipeptídica designada cadeia J. É a primeira Ig a ser expressa na superfície dos linfócitos B durante o seu processo de maturação na medula óssea, apresentando aqui uma estrutura monomérica. Cada pentâmero possui 10 locais de ligação ao antígeno e é encontrada no espaço intravascular, sendo produzida nas fases iniciais da resposta humoral.

### 3.3. Determinações analíticas

Na secção de Imunologia do LDFG existem dois aparelhos diferentes, o Immulite® 2000 e o Advia Centaur® XP, usados para realizar diferentes testes, referenciados na Tabela 3. Para realização destas análises são colhidas amostras de sangue para tubo seco, que depois são centrifugadas durante 10 minutos a 3500 r.p.m. é separado o soro do coágulo, e depois são distribuídas consoante o aparelho onde vão ser analisadas.

**Tabela III:** Determinações efetuadas por cada um dos aparelhos da Imunologia.

<b>Aparelhos</b>	<b>Determinações efetuadas</b>				
<b>Immulite® 2000</b>	Citomegalovírus IgM e IgG	Rubéola IgM e IgG	Testosterona	PSA	PCR ultrassensível
	Toxoplasmose IgM e IG	Imunoglobulina E	Cortisol	PSA livre	
	TSH	Progesterona	Vitamina B12	CEA	HIV
	T3	Estradiol		CA19.9	HCV
<b>Advia Centaur® XP</b>	T4	LH	Folatos	CA125	antigénio HBs
	T3 livre	FSH		AFP	anticorpo HBs
	T4 livre				

#### 3.3.1. Immulite®2000

Este aparelho é um analisador automático que efetua imunoensaios de quimioluminescência, que pode utilizar amostras de soro, plasma e/ou urina, sendo que no LDFG apenas são usadas amostras de soro.

Para cada teste, o aparelho, necessita de um reagente específico, como fase líquida, e uma esfera de poliestireno revestida com uma camada de anticorpos específicos, como fase sólida, utiliza também tubos de reação, que servem como recipiente para os processos de incubação, lavagem e processo de desenvolvimento da reação.

##### 3.3.1.1. Processamento das amostras

Uma esfera revestida com anticorpos, específica para o teste a realizar, é depositada no tubo de reação. De seguida é dispensada a amostra e o reagente específico constituído por fosfatase alcalina e água. O tubo de reação é então conduzido para a área de incubação com uma temperatura de 37°C, onde é agitado. Após o processo de incubação a mistura é separada da esfera, por movimento de rotação do tubo a alta velocidade sobre um eixo

vertical, e depois o tubo é transferido para a câmara de lavagem, onde ocorrem quatro lavagens discretas. É então adicionado o substrato de dioxetano, que ao reagir com a camada de fosfatase alcalina que ficou ligada à esfera emite luz. A quantidade de luz é diretamente proporcional à quantidade de analito inicialmente contido na amostra, e é detetada pelo tubo fotomultiplicador e os resultados são depois calculados.

### **3.3.2. Advia Centaur XP**

As determinações efetuadas por este aparelho também são realizadas com base nas reações de quimioluminescência, nas quais ocorre emissão de energia sob a forma de luz. Os reagentes utilizados possuem partículas paramagnéticas (PMP), que são cristais de óxido de ferro, unidas covalentemente ao antigénio ou anticorpo, como fase sólida, e éster de acridina (EA), como marcador direto da reação.

#### **3.3.2.1. Processamento das amostras**

A amostra é pipetada pela sonda de amostras e dispensada numa cuvete de reação, esta cuvete vai de seguida para o anel de incubação, que se move a cada 15 segundos e permanece a uma temperatura de 37°C. Neste aparelho os imunoenaios podem ocorrer em quatro formatos diferentes, sendo eles o de sandwich, competição com antigénio marcado, competição com anticorpo marcado ou captura de anticorpo.

##### **a. Sandwich**

Os anticorpos ligados ao éster de acridina são adicionados à amostra, unindo-se ao antigénio que se pretende medir. De seguida adicionam-se as PMP unidas a anticorpos específicos do antigénio a detetar na amostra. Durante a incubação as PMP unem-se aos complexos antigénio-anticorpo marcados com EA, anteriormente formados. Depois tudo o que não estiver ligado às PMP é separado e aspirado, através de uma lavagem durante a qual estas partículas ficam unidas às paredes da cuvete, por ação de magnetos no anel de incubação. A cuvete é então encaminhada até ao luminómetro e são adicionados o ácido ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ), que oxida o éster, e a base (NaOH), iniciando-se assim a reação de quimioluminescência. O luminómetro mede a intensidade de luz emitida, que vai ser diretamente proporcional à concentração de analito presente.

### **b. Competição por antígeno marcado**

Os antígenos marcados com o EA competem com os antígenos da amostra por uma quantidade limitada de locais de ligação aos anticorpos, os quais estão unidos covalentemente às PMP do reagente. Depois da incubação, a mistura de reação é exposta a um campo magnético, e o que não estiver ligado às partículas paramagnéticas é aspirado. A cuvete é então encaminhada ao luminômetro e são adicionados os reagentes ácido e base, dando início à reação de quimioluminescência, sendo depois medida a intensidade da luz emitida, que é diretamente proporcional à concentração de analito.

### **c. Competição por anticorpo marcado**

Os antígenos unidos às PMP competem com os antígenos da amostra por locais limitados de ligação aos anticorpos marcados com EA, a mistura vai a incubar e depois é encaminhada para o luminômetro. Aqui são adicionados o ácido e a base, dando-se a reação de quimioluminescência, medida a intensidade de luz emitida e calculada a concentração de analito, que é diretamente proporcional à intensidade de luz emitida.

### **d. Captura de anticorpos**

Utilizado quando o analito que se pretende quantificar é um anticorpo. Utiliza anticorpos especificamente dirigidos aos anticorpos da amostra. Adicionam-se à amostra PMP unidas a anticorpos específicos de IgM Humana (anticorpo anti-IgM). Os anticorpos da amostra são separados de outras substâncias que possam interferir, depois adicionam-se antígenos marcados com EA, que têm afinidade para os anticorpos da amostra. Após a incubação, a fração não ligada é separada, adicionam-se os reagentes ácido e base e depois é então medida a intensidade de luz emitida, pela reação de quimioluminescência, e é calculada a concentração de anticorpos presentes.

## **3.4. Serologia**

Na secção de Imunologia do LDFG são também realizados os testes de serologia. A serologia é a área que determina a presença ou não de anticorpos no soro, referentes a determinadas patologias, através de reações de aglutinação. As reações de aglutinação baseiam-se na capacidade de um anticorpo se ligar a um antígeno, quando este está presente na superfície de uma partícula grande, como por exemplo o látex. No LDFG são realizados os testes a seguir descritos.

### **3.4.1. Vidas® (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)**

Este aparelho utiliza o método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) com leitura final em fluorescência, chamada de técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). Utiliza como enzima a fosfatase alcalina e como substrato o 4-metil-umbeliferil fosfato (4-MUP), que depois é hidrolisado em 4-metil umbeliferona (4-UM) fluorescente.

Os Kits do aparelho, específicos de cada teste, são constituídos por barretes, compostas por uma serie de poços com a quantidade certa de reagentes a utilizar, cones sensibilizados com antigénios ou anticorpos, funcionando como fase sólida e sistema de pipetagem, dois controlos, um positivo e outro negativo e um calibrador. Em cada teste efetuado é utilizada uma barrete para cada amostra a testar, mais duas para os controlos, e os cones são utilizados um por cada barrete.

O sistema Vidas, no LDFG, é utilizado como sistema de confirmação de resultados que tenham dado como duvidosos nos outros dois aparelhos, das determinações de HIV, HCV, IgM e IgG de CMV, rubéola e toxoplasmose.

### **3.4.2. Teste de Coombs indireto**

O teste de Coombs indireto deteta a presença de anticorpos capazes de aglutinar e destruir glóbulos vermelhos. É normalmente realizado no diagnóstico de anemias, antes da realização de transfusões sanguíneas, e como um dos exames da rotina pré-natal, determinando se a mãe produz anticorpos contra o feto, devido às incompatibilidades sanguíneas que possam existir (21).

Existem dois tipos de teste de Coombs, o direto, que permite detetar anticorpos já ligados à superfície dos glóbulos vermelhos, e o indireto, que permite detetar anticorpos em circulação na corrente sanguínea (29), sendo que no LDFG só se realiza o teste indireto.

Este teste baseia-se na utilização de um reagente de Antiglobulina Humana Polivalente, que contem anticorpos anti-IgG e permite a deteção dos anticorpos IgG presentes no soro do doente, por sensibilização dos glóbulos vermelhos *in vitro*.

Este teste baseia-se numa técnica em gel, para deteção das reações de aglutinação produzidas quando os antigénios eritrocitários entram em contato com os anticorpos correspondentes, presentes no reagente ou na amostra do doente. É utilizada uma placa (DG Gel) de plástico com 8 microtubos (Figura 11), cada um deles formado por uma coluna



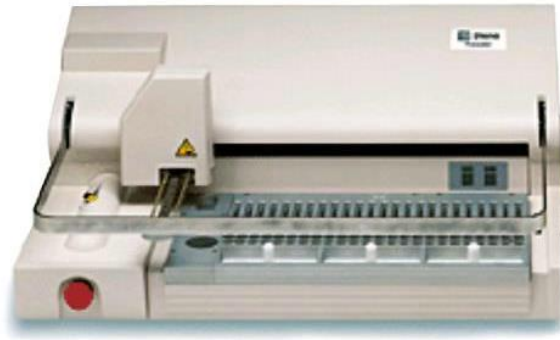
de distribuição/incubação e cada coluna contém microesferas de dextranos polimerizados num meio com tampão. Os microtubos que contêm Antiglobulina Humana atuam aglutinando os glóbulos vermelhos sensibilizados com anticorpos IgG do soro do paciente. Cada placa serve para realizar o teste de quatro amostras diferentes, uma vez que cada amostra apenas necessita de dois microtubos.



**Figura 11:** Placa de DG Gel onde decorre o teste de Coombs. (Adaptado de <http://www.grupolabca.com.mx/laboratorios%20clinicos/Licon/banco%20de%20sangre/Tarjeta%20Gel/Tecnica%20tarjeta%20gel%20reactivos.htm> 04/06/2018)

Para realização deste teste é utilizado o processador Diana da Grifols (Figura 12), automatizando o processo, onde são dispensados os reagentes, as amostras e as placas de gel necessários a cada utilização, este possui um *software* que nos permite seleccionar o tipo de teste que se vai efetuar e que nos vai dando indicações do que vai sendo necessário colocar, sendo tudo identificado por código de barras.

As placas de gel, após a introdução dos reagentes e das amostras e da incubação acabar, são colocadas num centrífuga apropriada, Dianafuge, que está predefinida e onde as placas são centrifugadas durante 10 minutos. Depois da centrifugação, os aglutinados são capturados consoante o seu tamanho, na superfície ou extensão da coluna, e os glóbulos vermelhos não aglutinados ficam no fundo dos microtubos.



**Figura 12:** Processador Diana da Grifolds, onde se realizam os testes de Coombs e as tipagens AB0/Rh. (Adaptado de <http://www.bio-asia.com/static/grifols.html> 04/06/2018)

Depois estas placas são lidas no Diana Reader, que deteta as aglutinações e passa os resultados para o *software*, onde os resultados são depois verificados consoante a carta e são impressos e passados para a ficha do doente.

### **3.4.3. Grupos sanguíneos (AB0/Rh)**

O grupo sanguíneo é determinado consoante o tipo de antigénio presente à superfície dos eritrócitos, sendo que o grupo A possui antigénios do tipo A, o grupo B antigénios do tipo B, o grupo AB antigénios do tipo A e B e o tipo 0 não possui antigénios A nem B. A determinação do fator Rh é definida pela presença, ou ausência, do antigénio D na superfície dos eritrócitos, sendo que os indivíduos Rh positivo (Rh+) possuem antigénios D e os indivíduos Rh negativo (Rh-) não o possuem (20).

A tipagem AB0/Rh é realizada no mesmo processador que o teste de Coombs, utilizando também a técnica em gel para deteção das reações de aglutinação dos eritrócitos. São usadas umas placas similares às da técnica de Coombs, ilustrada na figura 13, com 8 microtubos, formados por uma coluna e câmara de distribuição/incubação, contendo também microesferas de dextranos polimerizados. Neste caso cada placa apenas serve para uma amostra, ou seja, são utilizadas tantas placas quanto as amostras a analisar.



**Figura 13:** Placa de DG Gel em que ocorre a tipagem ABO/Rh. (Adaptado de <http://www.grupolabca.com.mx/laboratorios%20clinicos/Licon/banco%20de%20sangre/Tarjeta%20Gel/Tecnica%20tarjeta%20gel%20reactivos.htm> em 04/06/2018)

Utiliza-se um reagente, DG Sol, uma solução de baixa força iônica, que serve para fazer uma suspensão dos glóbulos vermelhos, depois a partir desta suspensão é que são dispensadas as quantidades necessárias nos microtubos. São ainda utilizados mais dois reagentes, A I e B, que são frascos de glóbulos vermelhos reativos A I e B, que servem para realizar a prova reversa, permitindo confirmar o resultado da tipagem ABO.

Os microtubos que contêm anticorpos específicos incorporados na solução de gel da placa, atuam como meio de reação e os eritrócitos aglutinam em contacto com os anticorpos para os quais possuem antigénio. Nos microtubos sem anticorpos, ou seja, aqueles em que são adicionados os reagentes A I e B, os anticorpos da amostra do paciente reagem diretamente com os eritrócitos dos reagentes e servem para fazer confirmação de resultados.

Após a incubação as placas são centrifugadas e os aglutinados são então separados consoante o tamanho e os glóbulos vermelhos não aglutinados concentram-se no fundo dos microtubos. Depois a leitura das placas é efetuada no Diana Reader e os resultados, são confirmados e transmitidos ao sistema informático. Os resultados são apresentados, a seguir, nas tabelas 4 e 5.

## a. Resultados

**Tabela IV:** Resultados da Tipagem AB0

<b>Grupo AB0</b>	<b>Microtubo A</b>	<b>Microtubo B</b>	<b>Microtubo AB</b>	<b>Microtubo Ctl.</b>	<b>Microtubo N + reagente AI</b>	<b>Microtubo N + reagente B</b>
<b>0</b>	0	0	0	0	+	+
<b>A</b>	+	0	+	0	0	+
<b>B</b>	0	+	+	0	+	0
<b>AB</b>	+	+	+	0	0	0

**Tabela V:** Resultados da tipagem Rh.

<b>Grupo Rh</b>	<b>Microtubo D</b>	<b>Microtubo Ctl.</b>
<b>D positivo</b>	+	0
<b>D negativo</b>	0	0

Legenda: + = Positivo  
0 = Negativo

### i. Interpretação dos resultados

No grupo sanguíneo 0, todos os microtubos dão negativo, confirmando a ausência de antígenos na amostra, enquanto que nos microtubos da prova reversa os dois se apresentam positivos, confirmando assim o resultado da tipagem como 0. No grupo sanguíneo A podemos verificar que apresenta positividade no microtubo A e no microtubo AB, que apresentam anticorpos para o antígeno que define este grupo sanguíneo, tal como é possível confirmar na prova reversa em que apenas apresenta positividade no microtubo do reagente B que confirma o resultado. Para o grupo sanguíneo B verificamos o mesmo que para o A, sendo que neste caso apresenta positividade nos microtubos B e AB e também na prova reversa com o reagente AI. No caso do grupo sanguíneo AB apresenta positividade em todos os microtubos, com exceção dos microtubos da prova reversa, que confirmam os resultados.

No caso dos grupos Rh podemos verificar que no caso de ser Rh positivo, o microtubo apresenta positividade, e no caso de ser Rh negativo isso não acontece.

### 3.4.4. Monoslide test

Este teste realiza-se para detetar a presença de anticorpos heterófilos, que são imunoglobulinas produzidas em resposta a antígenos não específicos ou antígenos animais, devido a vacinação de origem animal, a contato ambiental ou determinadas doenças infecciosas ou autoimunes (25). São imunoglobulinas multiespecíficas e com baixa afinidade e

estão frequentemente associadas à Mononucleose infecciosa, conhecida também como a doença do beijo, provocada pelo vírus Epstein-Barr, um vírus pertencente à família dos Herpes vírus. Esta infecção é muito frequente na infância e na adolescência, tem como principais sintomas febre, faringite e adenopatia.

Este é então um teste de aglutinação, em placa com 6 quadrantes, para deteção qualitativa destes anticorpos, constituído por quatro reagentes: R1, uma suspensão estabilizada de hemácias de cavalo (antigénio MNI), R2, suspensão estabilizada de hemácias de boi (antigénio de boi), R3, uma suspensão de rim de cobaia e o R4, um soro humano em suspensão em 25% de glicerina (soro de testemunho positivo). Sendo que para realização do procedimento apenas se utiliza o R1, onde se coloca uma gota do soro do doente num dos quadrantes e uma gota do R4, controlo positivo, noutra quadrante e adiciona-se a cada um dos quadrantes uma gota do R1, depois de agitar por 1 minuto e repousar por mais 1 minuto, se houver presença de alguma aglutinação, passa-se então à confirmação onde se utilizam os outros dois reagentes. Na confirmação o procedimento é o mesmo, sendo que se realiza em dois quadrantes diferentes com junção do R2 no primeiro e do R3 no segundo, e num outro quadrante se faz mais uma vez o controlo positivo. Se no primeiro quadrante estiver uma mistura homogénea e no segundo houver aglutinação, confirma-se a presença de anticorpos heterófilos. Se no primeiro houver aglutinação e no segundo estiver uma mistura homogénea, a reacção é considerada negativa para a Mononucleose infecciosa.

#### **3.4.5. Rose Bengal**

Este é um teste rápido para deteção de anticorpos aglutinantes anti-*Brucella* em soro. Bacterias do género *Brucella*, são cocobacilos gram negativo, existindo algumas espécies capazes de infetar o Homem e causar a chamada Brucelose, caracterizada por febres agudas (22).

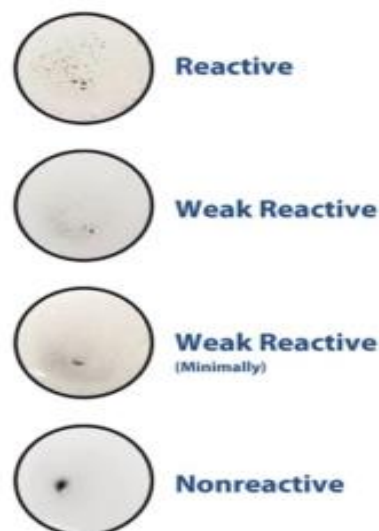
É realizado também em placa e utiliza células de *Brucella* inativas, coradas com Rosa de Bengala e ressuspensas num tampão ácido, que tem como função impedir a aglutinação não específica de outras bactérias. É colocada uma gota da amostra num dos quadrantes e uma gota de cada um dos controlos noutros dois quadrantes, de seguida adiciona-se uma gota do reagente Rosa de Bengala a cada um deles, após a agitação de 4 minutos é verificada a presença de aglutinação ou não.

### 3.4.6. VDRL com titulação (IMMUTREP RPR)

Este é um teste de floculação não específico para o diagnóstico da sífilis, através da pesquisa de anticorpos no soro.

A sífilis é uma doença de transmissão sexual, causada pela bactéria *Treponema pallidum*, uma espiroqueta. Esta patologia passa por três fases diferentes, se não for devidamente diagnosticada e tratada. Durante a primeira fase podem aparecer algumas lesões indetetáveis, uma vez que podem não causar qualquer incómodo. Na segunda fase é possível que comecem a aparecer erupções cutâneas em locais distintos, pode também aparecer febre, dor de garganta, dor de cabeça, e fadiga, entre outros sintomas. Caso não haja tratamento pode evoluir para a fase latente, que ocorre quando todos os outros sintomas desaparecem, podendo ficar assim por muito tempo ou evoluir para problemas a nível motor, cegueira e demência (22).

Este teste também é realizado em placa e contém um reagente RPR, que se trata de uma suspensão de cardiolipina, lecitina, colesterol e partículas de carvão, um controlo positivo, que contém soro com anticorpos anti-*Treponema pallidum*, e um controlo negativo. Para realização deste teste coloca-se uma gota da amostra e depois os controlos, em três quadrantes diferentes da placa, depois dispensa-se uma gota do reagente em cada um dos três, vai agitar por 8 minutos e depois junto a uma fonte de luz é verificada a presença de aglutinação, como ilustrado na figura 14, comparando sempre com o controlo positivo.



**Figura 14:** Exemplos dos tipos de reações obtidas no teste VDRL. (Adaptado de <https://laboratoryinfo.com/vdrl/> em 05/06/2018)

A imunologia foi uma das minhas secções preferidas, uma vez que houve bastante trabalho manual, principalmente a nível da serologia, permitindo que aprendesse mais técnica manual e não tão automatizada. Consegui igualmente aprender um pouco de tudo o que se faz, desde a manutenção do equipamento, a colocação de reagentes no equipamento, a passagem de controlos e de amostras, e também a resolução de alguns problemas que os aparelhos demonstravam.

#### **4. Conclusão**

Este estágio foi essencial na minha aprendizagem, pois apenas com o que nos foi ensinado nas aulas não seria possível ter noção do que é realmente trabalhar num laboratório destas dimensões, com a quantidade de amostras que chegam diariamente.

Foi possível consolidar todos os conhecimentos adquiridos nas aulas e ainda aprender outras coisas que apenas neste tipo de ambiente é possível, uma vez que estamos a aprender com pessoas que já trabalham há imenso tempo na área, e conhecem os aparelhos e os procedimentos a realizar de uma forma exemplar, passando os seus conhecimentos de uma forma muito entusiasta e dando oportunidade para que o meu percurso durante este tempo fosse o melhor.

Consegui perceber que no fundo todas as valências acabam por estar interligadas e que muitas vezes para validar um resultado de determinada valência pode ser útil ter o resultado de outra valência já disponível, sendo assim sempre um trabalho de equipa.

No fim de contas, foi uma experiência extremamente positiva, uma vez que aprendi bastante, senti-me uma verdadeira profissional da área, pois foi muito bem recebida por toda a equipa e fizeram sempre questão de que me sentisse em casa.



## 5. Referências Bibliográficas

- 1) Lorenzi, T. F. - Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. 4º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. (2006) ISBN 978-85-277-1791-5
- 2) Fernandes, A. - Hematopoiese: Conceito de Hematopoiese, (2016) 20/05/2018 Disponível em <http://know.net/ciencterravida/biologia/hematopoiese/>
- 3) Hematologia: Como é realizada a técnica de Esfregaço de Sangue? (2017) 27/05/2018 Disponível em <http://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>
- 4) Franco, R. - Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (2001) (Artigo de Revista da Universidade de São Paulo)
- 5) Ferreira, C. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, volume 32 (2010) pág. 416-421.
- 6) Reis, P. et al. - Avaliação da determinação do tempo de Protrombina em amostras de sangue colhidas por duas técnicas diferentes. Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial, v.41 (2005) pág. 251-255.
- 7) Bem, A.; Kunde, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes *mellitus*. Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial, v.42 (2006) pag. 185-191.
- 8) Netto, A. et al. Atualização sobre a hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial, v.45 (2009) pág. 31-48.
- 9) Blaya, C. et al. Análise da Utilização dos Novos Inibidores da Trombina na Prática Médica. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, volume 71, (1998) pág. 163-167.
- 10) Santos, V. M.; Cunha S. F.; Cunha D. F. Velocidade de Sedimentação das Hemácias: utilidade e limitações. Revista Associação Médica Brasileira, volume 46 (2000) pág. 232-236.
- 11) Abbas, A.; Lichtman, A.; Pillai, S. Imunologia Celular e Molecular. 7º ed. Rio de Janeiro, Elsevier (2012) capítulos 1-10.
- 12) Funções da Pele – Medipédia (2012) 30/05/2018 Disponível em <https://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=451>
- 13) Lopes, A.; Noronha, A.; Mafort, T. Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, volume 9, Rio de Janeiro (2010) pág. 10-17.

- 14) Cruvinel, W. *et al.* Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira Reumatol*, volume 50, (2010) pág. 434-461.
- 15) Delves, P. Imunidade Adquirida 31/05/2018  
Disponível em <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/doen%C3%A7as-imunol%C3%B3gicas/biologia-do-sistema-imunol%C3%B3gico/imunidade-adquirida>
- 16) Respostas Imunes Humorais – Capítulo 7 (2011) 31/05/2018  
Disponível em <https://pt.slideshare.net/GuilhermeSchmittdeAndrade/respostas-imunes-humorais>
- 17) Imunologia e Anticorpos – Ebah (2012) 30/05/2018  
Disponível em <http://www.ebah.pt/content/ABAAAAvsAG/imunologia-anticorpos-antigenos>
- 18) Mayer, G. Imunoglobulinas – Estrutura e Função, Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul, Microbiologia e Imunologia on-line 01/06/2018 Disponível em <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter4.htm>
- 19) O’Connell, K. What is Serology (2018) 03/06/2018  
Disponível em <https://www.healthline.com/health/serology>
- 20) Diferença entre o Teste de Coombs Direto e Indireto 03/06/2018  
Disponível em <https://pt.esdifferent.com/difference-between-direct-and-indirect-coombs-test>
- 21) Case Lo, Christine. Coombs Test 03/06/2018  
Disponível em <https://www.healthline.com/health/coombs-test#purpose>
- 22) Weatherspoon, D. Blood Typing (2017) 03/06/2018  
Disponível em <https://www.healthline.com/health/blood-typing>
- 23) Sousa, Maria José Rego. Teste de Coombs como Parte Integrante da Rotina Pré-Natal. *Revista SapoLifestyle*, (2017) 03/06/2018  
Disponível em <https://lifestyle.sapo.pt/familia/gravidez/artigos/teste-de-coombs-como-parte-integrante-da-rotina-pre-natal>
- 24) Todo-Bom, A.; Mota Pinto, A. Fisiopatologia da asma grave. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, volume 14, (2006) pág. 43-48.
- 25) Guemra, S. *et al.* Detecção de Anticorpos Heterófilos em Soros de Indivíduos Idosos. *Revista Ciência Biológica da Saúde*, volume 10, Londrina (2008) pág. 69-74
- 26) Marcio Barros de Oliveira, C. *et al.* Citocinas e Dor, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, volume 61, (2011) pág. 255-265.