



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Susana Cristina Grilo Caeiro

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa
e pela Doutora Maria Gabriel Barroca e apresentado à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Susana Cristina Grilo Caeiro

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e pela Doutora Maria Gabriel Barroca e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Passados 5 meses de estágio no SYNLABHEALHT ALENTEJO não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas neste processo, e que dia após dia me permitiram adquirir os conhecimentos que hoje tenho. A Carmo, a Angélica, a Genoveva, a Cristina, a Maria João, a Zezinha, a Paula, a Maria José, o António, a Inês, a Sofia, a Lena, a Susana e tantos outros que me fizeram sentir tão bem-recebida e que sempre se disponibilizaram para me ajudar em tudo aquilo que foi necessário. Agradecer a todos pela simpatia, pelo carinho e acima de tudo pela permissão de integridade na equipa.

Agradecer à Professora Doutora Maria do Céu Sousa, minha orientadora interna pela disponibilidade e ajuda na elaboração deste relatório.

À Dra. Maria Gabriel Barroca, minha orientadora no SYNLABHEALTH ALENTEJO que me recebeu com enorme simpatia e disponibilidade. Devido à situação pandémica que decorreu durante os últimos anos e que sobrecarregou laboratórios de análises clínicas por todo o país, encontrar um local que nestas condições permitisse a receção de estagiários não foi uma tarefa fácil. Tendo isso em consideração o meu profundo agradecimento à Dra. Maria Gabriel que permitiu que este estágio pudesse decorrer. Agradecer pelo apoio prestado durante a realização deste estágio e pela confiança depositada.

Um agradecimento especial ao Dr. Fernando Calisto, diretor técnico do laboratório, e ao Dr. César Gama pela disponibilidade, simpatia e preocupação em deixar sempre um esclarecimento em cada situação.

Não poderia também deixar de agradecer à minha companheira de estágio, a Dora, por todo o companheirismo e amizade ao longo deste período.

Agradecer ao meu Francisco, por ser a pessoa mais incrível do mundo e por me ter acompanhado e apoiado nesta aventura.

Por último, mas acima de tudo, mais importante, o maior agradecimento do mundo aos meus pais e à minha irmã, que sem eles nada disto seria possível.

RESUMO

Neste relatório estão descritas as atividades desenvolvidas nos cinco meses de estágio no SYNLABHEALTH ALENTEJO, na cidade de Évora, integrado no plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

A realização deste estágio permitiu consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos na componente teórica do mestrado, possibilitando vivenciar a rotina diária de um laboratório de análises clínicas. Além de abordar o fluxo laboratorial, referindo as amostras, equipamentos, métodos e parâmetros mais frequentemente determinados, este relatório apresenta uma caracterização do local de estágio e destaca ainda a importância das diversas fases do processo analítico bem como do controlo de qualidade interno e da avaliação externa da qualidade.

Durante o estágio tive a oportunidade de contactar e executar diferentes técnicas nas áreas de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. Contudo, neste relatório serão desenvolvidas com mais detalhe as áreas da Hematologia e Imunologia.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Imunologia, Hematologia, Microbiologia, Controlo de Qualidade.

ABSTRACT

This report describes the activities developed in the five-month internship, at SYNLABHEALTH ALENTEJO, in the city of Évora, included in the curricular plan of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

Performing this internship allowed the consolidation and application of the knowledge acquired in the theoretical component of the master, enabling to experience the daily routine of a clinical analysis laboratory. In addition to the laboratory flow, referring the samples, equipment, methods and parameters most frequently determined, this report presents a characterization of the internship place and highlights the importance of the various phases of the analytical process, as well as intern quality control and quality extern evaluation. During this internship it was possible to contact and perform several techniques in the fields of Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology. However, in this report the areas of Hematology and Immunology will be developed in more detail.

Keywords: Clinical analysis, Immunology, Hematology, Microbiology, Quality Control.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS	11
ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS	13
1. INTRODUÇÃO	17
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO.....	17
3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	18
3.1 Fase Pré - Analítica.....	18
3.2 Fase Analítica	22
3.3 Fase Pós - Analítica	23
4. CONTROLO DE QUALIDADE	23
4.1 Controlo de Qualidade Interno.....	24
4.2 Avaliação Externa da Qualidade	25
5. BIOQUÍMICA	25
6. MICROBIOLOGIA	27
7. HEMATOLOGIA.....	28
7.1 Hematopoiese	28
7.2 Hemostase.....	29
7.3 Amostras.....	31
7.4 Equipamentos e Métodos.....	31
7.5 Determinações Analíticas.....	33
7.5.1 Hemograma	33
Eritrócitos	33
Hemoglobina	34
Hematócrito	36
Volume Corpuscular Médio	36
Hemoglobina Corpuscular Média	36
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média	37
Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW)	37
Leucócitos.....	38
Plaquetas.....	40
Plaquetócrito.....	40
Volume Plaquetar Médio.....	40
Índice de Distribuição Plaquetário.....	41
7.5.2 Reticulócitos	41
7.5.3 Velocidade de Sedimentação	41
7.5.4 Esfregaço de Sangue Periférico	42
7.5.5 Eletroforese de Hemoglobinas	43

7.5.6 Provas de Coagulação	44
Tempo de Protrombina.....	44
Tempo de Tromboplastina Parcial ativado.....	45
Fibrinogénio.....	46
8. IMUNOLOGIA.....	47
8.1 Amostras.....	48
8.2 Equipamentos e Métodos	49
8.3 Determinações Analíticas	53
8.3.1 Manuais.....	53
8.3.1.1 VDRL / RPR.....	53
8.3.1.2 Grupos Sanguíneos.....	54
8.3.1.3 Teste De Coombs Indireto.....	55
8.3.2 Automatizadas	56
8.3.2.1 Infeções Virais e Parasitárias.....	57
Citomegalovirus	57
Vírus da Hepatite B.....	58
Vírus da Hepatite C	58
Vírus da Imunodeficiência Humana.....	59
Rubéola.....	59
<i>Toxoplasma gondii</i>	60
8.3.2.2 Hormonas.....	61
Hormona Tiro Estimulante (TSH).....	61
Tetraiodotironina ou Tiroxina (T4).....	61
Tiroxina Livre (FT4).....	62
Triiodotironina (T3).....	62
Triiodotironina Livre (FT3).....	62
Hormona Luteinizante (LH).....	63
Hormona Folículo Estimulante (FSH).....	63
Testosterona.....	64
Cortisol	64
Hormona Gonadotrofina Coriónica - β hCG	65
17 β – Estradiol	66
Prolactina	66
Progesterona.....	67
Hormona da Paratiroide (PTH)	67
8.3.2.3 Marcadores Tumorais	68
Antigénio Específico da Próstata Total e Livre (PSA Total e PSA Livre)	68
Antigénio Carcinoembrionário (CEA)	68
CA 125	69
CA 19.9	69
Alfa Fetoproteína (AFP)	70

8.3.2.4 Vitaminas.....	70
Vitamina B12.....	70
Ácido Fólico.....	71
8.3.2.5 Proteína C Reativa Ultra Sensível	71
8.3.2.6 IgE Total.....	72
8.3.2.7 Anticorpos Anti - Tiroideus (Anti - Peroxidase e Anti - Tiroglobulina).....	72
9. CONCLUSÃO.....	73
BIBLIOGRAFIA	74
ANEXO A	79
ANEXO B.....	81
ANEXO C.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Fluxograma representativo da Colheita, Receção e Triagem das amostras</i>	22
<i>Figura 2 - Diagrama esquemático da hematopoiese com representação das células precursoras e células maduras de cada linhagem</i>	29
<i>Figura 3 - Esquema simplificado do mecanismo de ativação da Cascata de Coagulação.</i>	30
<i>Figura 4 - Observação microscópica de eritrócitos microcíticos e hipocrómicos, referentes a um doente com anemia por deficiência em ferro, numa coloração de May - Grunwald Giemsa</i>	35
<i>Figura 5 - Observação microscópica de eritrócitos macrocíticos, referentes a um doente com doença hepática, numa coloração de May – Grunwald Giemsa</i>	35
<i>Figura 6 - Observação microscópica de um neutrófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	38
<i>Figura 7 - Observação microscópica de um linfócito num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	38
<i>Figura 8 - Observação microscópica de um monócito num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	39
<i>Figura 9 - Observação microscópica de um eosinófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	39
<i>Figura 10 - Observação microscópica de um basófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	39
<i>Figura 11 - Realização do Esfregaço de Sangue Periférico</i>	43
<i>Figura 12 - Poiquilocitose acentuada observada num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	43
<i>Figura 13 - Células imaturas referentes a uma Leucemia Mieloide Aguda observadas num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa</i>	43
<i>Figura 14 - Detecção de antigénios pelo ensaio não competitivo (tipo sandwich)</i>	50
<i>Figura 15 - Detecção de anticorpos pelo ensaio não competitivo (tipo sandwich)</i>	51
<i>Figura 16 - Detecção de antigénios pelo ensaio competitivo</i>	51
<i>Figura 17 - Detecção de anticorpos pelo ensaio de captura de anticorpos</i>	52
<i>Figura 18 - Determinação do grupo sanguíneo pelo Card-ID DiaClon ABO/D + Reverse Grouping</i>	55

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela I - Descrição sumária dos tubos utilizados com indicação do produto obtido e os testes executados de cada amostra</i>	<i>20</i>
<i>Tabela II - Equipamentos utilizados no laboratório SYNLABHEALTH ALENTEJO</i>	<i>23</i>
<i>Tabela III - Classificação das Anemias com base nos índices eritrocitários</i>	<i>35</i>
<i>Tabela IV - Grupos Sanguíneos</i>	<i>54</i>
<i>Tabela V - Determinações analíticas realizadas nos automatizadores ADVIA CENTAUR XP e IMMULITE 2000.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela VI - Meios de Cultura utilizados para Inoculação de amostras de Urina</i>	<i>79</i>
<i>Tabela VII - Meios de Cultura utilizados para Inoculação de amostras de Fezes</i>	<i>79</i>
<i>Tabela VIII - Meios de Cultura utilizados para Inoculação de Exsudatos, Amostras de Pus e Expetoração</i>	<i>80</i>
<i>Tabela IX - Resultados Analíticos do Hemograma do utente</i>	<i>81</i>
<i>Tabela X - Resultados Analíticos do Doseamento de Ferro, Ferritina e Transferrina do utente</i>	<i>82</i>
<i>Tabela XI - Resultados Analíticos dos Parâmetros Imunológicos da utente</i>	<i>83</i>
<i>Tabela XII - Resultados Analíticos do Teste da Aidez da utente</i>	<i>83</i>

ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica, do inglês <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AFP	Alfa Fetoproteína
ALP	Fosfatase Alcalina, do inglês <i>Alkaline Phosphatase</i>
ALT	Alanina Aminotransferase, do inglês <i>Alanine Aminotransferase</i>
ASO	Antiestreptolisina-O
AST	Aspartato Aminotransferase, do inglês <i>Aspartate Aminotransferase</i>
CBG	do inglês <i>Corticosteroid Binding Globulin</i>
CEA	Antigénio Carcinoembrionário, do inglês <i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CK	Creatina Cinase
CLIA	Ensaio Imunoquimioluminescente, do inglês <i>Chemiluminescent Immunoassays</i>
CMV	Citomegalovirus
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRH	Hormona Libertadora de Corticotrofina, do inglês <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
DIG	Diagnóstico Imunológico da Gravidez
EA	Ésteres de Acridina
EDTA K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico, do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELFA	Ensaio Imunoenzimático com Fluorescência, do inglês <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
FSC	Luz Dispersa Frontalmente, do inglês <i>Forward-Scattered Light</i>
FSH	Hormona Folículo Estimulante, do inglês <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
FT3	Triiodotironina livre, do inglês <i>Free Triiodothyronine</i>
FT4	Tiroxina Livre, do inglês <i>Free Thyroxine</i>
GnRH	do inglês, <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>

Hb A	Hemoglobina Adulto
Hb A2	Hemoglobina A2
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HBs Ag	Antigénio de Superfície da Hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B Surface Antigen</i>
HBV	Vírus da Hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B Virus</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C Virus</i>
HDL	Lipoproteína de Elevada Densidade do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSC	Célula Estaminal Hematopoiética do inglês <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
hsPCR	Proteína C Reativa ultra sensível do inglês <i>High Sensitivity Proteína C- Reativa</i>
IF	Fator Intrínseco do inglês <i>Intrinsic Factor</i>
IG	Granulócitos Imaturos, do inglês <i>Immature Granulocytes</i>
INR	Rácio Internacional Normalizado, do inglês <i>International Normalized Ratio</i>
ISE	Eléctrodo Seletivo de Iões, do inglês <i>Ion Selective Electrode</i>
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional
LA	Anticorpo Lúpico do inglês <i>Lupic Antibody</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	Hormona Luteinizante, do inglês <i>Luteinizing Hormone</i>
MBPL	Manual de Boas Práticas Laboratoriais
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
NRBC	Eritrócitos Nucleados, do inglês <i>Nucleated Red Blood Cells</i>
PCR	Proteína C Reativa
PCT	Plaquetócrito
PDW	Índice de Distribuição Plaquetário, do inglês <i>Platelet Distribution Width</i>

PNAEQ	Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
PPM	Partículas Paramagnéticas
PSA	Antígeno Específico da Próstata, do inglês <i>Prostate Specific Antigen</i>
PTH	Hormona da Paratiroide, do inglês <i>Parathyroid Hormone</i>
RBC	Eritrócito, do inglês <i>Red Blood Cell</i>
RDW	Índice de Variação do Tamanho dos Eritrócitos, do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>
RF	Fator Reumatóide, do inglês <i>Rheumatoid Factor</i>
RIQAS	do inglês <i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
SEHH	do espanhol <i>Sociedad Espanhola de Hematologia y Hemoterapia</i>
SEQC	do espanhol <i>Sociedad Española de Quimica Clínica</i>
SFL	Luz de fluorescência lateral, do inglês <i>Side-Fluorescent light</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLS	Lauril Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>
SOP	Síndrome do Ovário Poliquístico
SSC	Luz dispersa lateralmente, do inglês <i>Side-Scattered light</i>
T3	Triiodotironina, do inglês <i>Total Triiodothyronine</i>
T4	Tetraiodotironina ou Tiroxina do inglês <i>Total Thyroxine</i>
TBG	do inglês <i>Thyroxine-binding globulin</i>
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG Ab	Anticorpos anti - Tiroglobulina, do inglês <i>Thyroglobulin Autoantibodies</i>
TIBC	Capacidade Total de Fixação do Ferro, do inglês <i>Total Iron Binding Capacity</i>
TP	Tempo de Protrombina
TPO Ab	Anticorpos Anti - Peroxidase, do inglês <i>Thyropoxidase Autoantibodies</i>
TRH	do inglês <i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>
TSH	Hormona Tiro Estimulante, do inglês <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
VCM	Volume Corpuscular Médio
VDRL/RPR	do inglês <i>Veneral Disease Research Laboratory e Rapid Plasma Reagin</i>
VPM	Volume Plaquetar Médio
VS	Velocidade de Sedimentação

WBC	Leucócitos, do inglês <i>White Blood Cell</i>
WDF	Canal de diferenciação dos Leucócitos, do inglês <i>White Blood Cell Differential</i>
WNR	Canal de diferenciação de Leucócitos Nucleados, do inglês <i>White Cell Nucleated</i>
WPC	Canal de diferenciação de Leucócitos Percussores e Células Patológicas, do inglês <i>White Precursor and Pathological Cell Channel</i>
β hCG	Hormona Gonadotrofina Coriônica, do inglês <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
γ -GT	Gama Glutamiltransferase

I. INTRODUÇÃO

As análises clínicas são uma ferramenta imprescindível na prevenção, diagnóstico e controlo da terapêutica de inúmeras patologias. Esta é uma área multidisciplinar que funciona como serviço complementar de diagnóstico, o que lhe confere um elevado grau de responsabilidade. Além disso, a garantia da qualidade é um aspeto imprescindível em todo o processo analítico, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica, permitindo que esta seja executada com elevado rigor.

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas no decorrer do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado nos meses de abril a setembro de 2021, no SYNLABHEALTH ALENTEJO. Para atingir o objetivo pretendido, o plano de estágio consistiu no desenvolvimento de atividades laboratoriais nos setores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia do SYNLABHEALTH ALENTEJO, nos quais participei de forma ativa na rotina laboratorial.

Desta forma, é possível a elaboração do presente relatório de estágio onde estão descritas informações relativas à caracterização do laboratório de estágio, controlo de qualidade interno e avaliação externa da qualidade, fase pré-analítica, fase analítica, fase pós-analítica e uma descrição mais detalhada dos equipamentos, métodos e procedimentos utilizados e dos parâmetros determinados nas valências de Hematologia e Imunologia. As valências de Bioquímica e Microbiologia serão abordadas de uma forma breve e bastante resumida.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O SYNLABHEALTH ALENTEJO, SA, localizado na cidade de Évora, faz parte do grupo SYNLAB, que engloba as marcas Synlab e Labco, e constitui uma empresa líder do mercado em serviços de diagnóstico clínico, permitindo aos seus utentes beneficiar de uma da maior rede regional de centros de análises clínicas, o que permite a disponibilidade de um serviço mais rápido e com elevada qualidade.

O SYNLABHEALTH ALENTEJO é composto por dois pisos. O piso superior é constituído por uma receção, uma sala de espera, quatro salas de colheitas, duas casas de banho para utentes e uma zona de triagem de amostras. O piso inferior é constituído por diversos setores tais como, o setor da Bioquímica, Imunologia, Hematologia, Hematologia II e

Bioquímica, Serologia, Urinálise, Microbiologia e possui ainda uma sala de lavagens. Neste piso existe também uma sala de Secretariado onde é realizada a impressão de boletins analíticos e a faturação, um gabinete da direção técnica, uma copa e as casas de banho e salas de vestuário dos colaboradores.

Em consequência da situação pandémica que se vive nos últimos anos, para além destas instalações, o SYNLABHEALTH ALENTEJO possui ainda novas instalações adjacentes ao laboratório central, onde se realizam apenas colheitas de amostras nasofaríngeas para deteção de SARS-COV-2, agente viral que provoca a doença COVID-19 responsável pela pandemia.

A equipa de trabalho do SYNLABHEALTH ALENTEJO, sob a direção técnica do Doutor Fernando Calisto, é constituída por 4 Farmacêuticos especialistas em Análises Clínicas, 15 Técnicos de Diagnósticos e Terapêutica e 9 administrativos. Além destes, vários enfermeiros e Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica realizam colheitas nos diversos postos de colheitas.

3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O SYNLABHEALTH ALENTEJO é um laboratório central em que, além das colheitas realizadas neste, recebe ainda amostras de 54 postos de colheitas abrangendo os distritos de Évora, Beja e Portalegre.

O laboratório possui um horário de funcionamento de segunda a sexta-feira das 8h às 18h, e aos sábados entre 9h e o 12h, recebendo uma média de amostras diárias de cerca de 500 a 600 utentes. Todo o procedimento que envolve a análise de amostras, desde a sua colheita até à emissão dos resultados é, de uma forma generalizada e sucinta, o seguinte: as amostras biológicas são colhidas e rececionadas no laboratório, passam pelo processo de triagem e posteriormente são separadas e enviadas para os diversos setores do laboratório, onde são realizadas todas as análises requisitadas. Numa fase final, os resultados são obtidos, validados por profissionais qualificados e enviados ao utente. Este processo é descrito com maior detalhe em seguida.

3.1 Fase Pré - Analítica

No SYNLABHEALTH ALENTEJO tanto no laboratório central como nos postos de colheitas, o primeiro contacto do utente com o laboratório é a receção. Nesta é feita a inscrição do utente e, previamente à colheita de produtos biológicos, é verificada a credencial

médica e confirmadas todas as análises requeridas pelo médico, bem como o cumprimento de todos os requisitos necessários para a realização das análises pretendidas.

Na sequência da inscrição, a cada utente é atribuído uma identificação de três letras e quatro números, *exemplo: XXX 0000*, sendo as três letras correspondentes ao local de colheita (cada local de colheita possui um código representativo do mesmo) e os números correspondentes à identificação do utente. Esta identificação vai ser o método de codificação que irá acompanhar todas as amostras de cada utente desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica. Após a inscrição, confirmação de credenciais e verificação de cumprimento de requisitos necessários à realização das análises é posteriormente realizada a colheita das amostras biológicas.

COLHEITA DE AMOSTRAS





Neste laboratório a colheita de amostras sanguíneas é feita pelo método de colheita aberta, no qual é utilizada uma seringa e agulha e colhido o volume de sangue adequado para a distribuição por todos os tubos necessários. Deve sempre ser respeitada uma ordem específica de distribuição pelos diversos tubos sendo essa a seguinte: o primeiro tubo deverá ser o tubo de soro, em seguida o tubo de citrato de sódio, o tubo de fluoreto de potássio e por fim o tubo de EDTA K3. A amostra obtida e as análises executadas de cada amostra estão descritas na Tabela I.

Além de colheita de amostras sanguíneas podem ser realizadas colheitas de outros tipos de amostras como urina, fezes ou exsudatos. A colheita de urina, nomeadamente a colheita de urina ocasional corresponde à recolha da primeira urina da manhã, uma vez que é a mais concentrada, para um contentor estéril sem conservantes, devendo a amostra ser refrigerada no período entre a colheita e a entrega no laboratório. A colheita de urina assética utilizada para execução de análises bacteriológicas, deve ser realizada de forma estéril em que, após a lavagem da zona genital o primeiro jato de urina é rejeitado e o restante é colhido para um contentor estéril. Para além destas, pode ainda ser colhida a urina de 24h, que consiste na recolha de todas as urinas realizadas num período de 24h, desprezando a primeira urina da manhã do dia inicial e incluindo a primeira urina da manhã do dia de término.

A colheita de fezes utilizada para pesquisa de sangue oculto ou para realização do exame parasitológico consiste na recolha de amostras fecais em 3 dias diferentes para contentores estéreis que devem ser conservados entre 2 - 8°C até ao prazo máximo de cinco dias. Para a realização da coprocultura é necessária também a colheita de amostras de fezes,

no entanto estas têm de ser colocadas num recipiente que contém meio de transporte, sendo este fornecido pelo laboratório.

Tabela I - Descrição sumária dos tubos utilizados com indicação do produto obtido e os testes executados de cada amostra

COR DO TUBO	ANTICOAGULANTE	PRODUTO	DETERMINAÇÕES
	ATIVADOR DA COAGULAÇÃO	Soro	Bioquímica, Imunologia e Serologia
	CITRATO DE SÓDIO	Plasma	Provas da Coagulação Tempo de Trombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado e Fibrinogénio
	FLUORETO DE POTÁSSIO	Plasma	Glicose
	EDTA K3 (Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico)	Sangue Total	Hematologia Hemograma, Velocidade de Sedimentação, Reticulócitos, HbA1c, Eletroforese de Hemoglobinas e Tipagem Grupo Sanguíneo ABO

A colheita de exsudatos vaginais é realizada com recurso a uma zaragatoa que é rodada sob a mucosa vaginal. No caso do exsudato vaginal e anal, o procedimento de colheita é idêntico ao do exsudato vaginal incluindo também a inserção da zaragatoa no canal anal. A colheita de exsudatos uretrais é realizada com uma zaragatoa fina, que é inserida no orifício da uretra do utente e rodada sob as paredes da mesma. A colheita de exsudatos faríngeos, nasais e auriculares é realizada de forma semelhante com inserção e rotação da zaragatoa nos respetivos locais. Em todos estes tipos de exsudatos, com exceção do exsudato vaginal e anal, são sempre colhidas 2 zaragatoas. A primeira zaragatoa é utilizada para a realização de esfregaços em lâmina, feitos em duplicado no ato de colheita, em que uma das lâminas é visualizada “a fresco” e a outra lâmina é visualizada após coloração. A segunda zaragatoa é colocada num meio de transporte para posteriormente se executar a cultura em diversos meios (descritos no Anexo A). No exsudato vaginal e anal é colhida apenas uma zaragatoa que é colocada em meio de transporte para semear em meios de cultura.

RECEÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras biológicas vindas dos postos de colheitas, chegam ao laboratório central onde é feito um rigoroso controlo das mesmas. Estas amostras vêm acondicionadas em contentores térmicos e, ao chegarem ao laboratório, é avaliada a temperatura das amostras, que não pode exceder 20°C, e dos termoacumuladores que vêm no interior de cada contentor térmico, que não pode exceder os 8°C, permitindo controlar a temperatura a que as amostras foram transportadas. A acompanhar as amostras, é enviado um relatório com a indicação de qual é o posto de colheitas, quem fez a colheita das amostras e quantas amostras correspondem a cada utente (amostras de sangue, urina, fezes, exsudatos, entre outras) permitindo assim fazer o controlo de que todas as amostras colhidas de cada utente chegam ao laboratório (Figura 1).

TRIAGEM DE AMOSTRAS

Após realizada a colheita de amostras biológicas, o processo de triagem das mesmas é iniciado. Nesta etapa as amostras são rececionadas, sofrem um tratamento pré-analítico e são depois enviadas para os diferentes setores do laboratório (Figura 1). A receção de produtos biológicos é feita através do sistema informático através da leitura do código de barras de cada amostra, permitindo controlar de forma eficaz a execução de todas as análises de cada utente.

Nesta fase é verificada a conformidade das amostras e se a mesma está de acordo com os critérios estabelecidos pelo laboratório para a aceitação das amostras. Apesar de todo o controlo realizado, nem sempre as amostras estão de acordo com os parâmetros necessários para a aceitação das mesmas, e por isso estão definidos critérios para a rejeição de amostras. Os critérios mais frequentes para a rejeição de amostras neste laboratório são amostra insuficiente, amostra hemolisada, amostra coagulada e amostra não adequada à análise pretendida.

Após verificação da conformidade das amostras, é iniciado o tratamento pré-analítico das amostras biológicas. As amostras sanguíneas posteriormente à colheita necessitam de aguardar cerca de 15 minutos antes de serem centrifugadas. Os tubos de soro são centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos a 20°C. Os tubos de citrato de sódio e de fluoreto de potássio são centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos a 20°C.

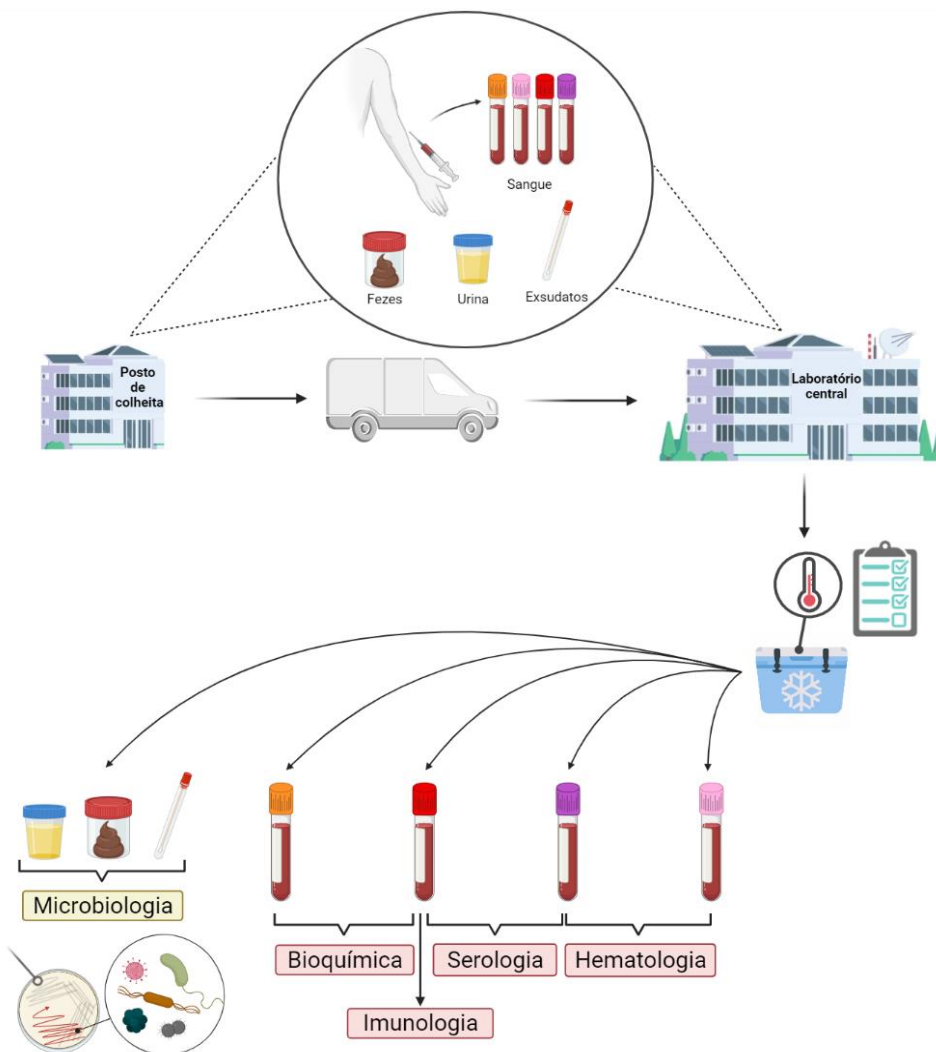


Figura I - Fluxograma representativo da Colheita, Recepção e Triagem das amostras.

3.2 Fase Analítica

A fase analítica engloba os procedimentos laboratoriais, nomeadamente de execução laboratorial e validação técnica dos resultados. A esta fase do procedimento laboratorial corresponde a menor percentagem de erros que ocorre a nível laboratorial e isto deve-se, em parte, à automatização da maioria dos ensaios realizados e por outro lado, à existência de um controlo de qualidade bastante rigoroso.¹ Além disso, a participação deste laboratório em programas de avaliação externa da qualidade permite a garantia de uma elevada exatidão dos resultados obtidos. O laboratório possui as valências de Bioquímica, Microbiologia, Hematologia e Imunologia, sendo que esteve presente na fase analítica em todas estas áreas. Os equipamentos utilizados em cada setor deste laboratório estão descritos na Tabela II.

Tabela II - Equipamentos utilizados no laboratório SYNLABHEALTH ALENTEJO.

SETOR	EQUIPAMENTOS	PARÂMETROS ANALÍTICOS
Microbiologia	VITEK® 2 Compact	Identificação de Microrganismos Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
	ADVIA® 1800 <i>Chemistry System</i>	Parâmetros Bioquímicos
Bioquímica	Variant II Turbo <i>Hemoglobin Testing System</i>	HbA1c
	AUTION MAX™ AX – 4280	Análise de Urinas
	HYDRASIS da Sebia	Eletroforese de Hemoglobinas Eletroforese de Proteínas
Hematologia	SYSMEX XN – 550	Hemograma Contagem de Reticulócitos
	VES MATIC CUBE 80	Velocidade de Sedimentação
	SYSMEX CA – 620	Provas da Coagulação
	IMMULITE 2000	Anticorpos
Imunologia	ADVIA® CENTAUR XP <i>Immunoassay System</i>	Marcadores tumorais Hormonas
	Mini VIDAS	Confirmação de resultados de anticorpos IgM positivos
	Banjo ID Reader	Grupos Sanguíneos e Teste de Coombs Indireto

3.3 Fase Pós - Analítica

A fase pós analítica corresponde à última etapa de todo o processo analítico. Esta compreende a validação biopatológica dos resultados e a emissão do boletim de resultados. A validação dos resultados engloba a análise das condições de execução dos ensaios e procedimentos operativos, tendo em consideração a avaliação do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a conformidade dos resultados obtidos com a história clínica do utente.

A análise dos resultados obtidos a nível laboratorial fornece dados decisivos e importantes para a correta prestação de cuidados de saúde e por isso, a validação dos resultados é apenas executada por médicos ou farmacêuticos especialistas. Após a validação dos resultados pelo clínico estes são enviados e entregues ao utente.

4. CONTROLO DE QUALIDADE

Os laboratórios de análises clínicas devem fornecer serviços de elevada qualidade, produzindo resultados exatos, precisos e relevantes que permitam obter um diagnóstico clínico e tratamento do utente. A qualidade é definida como a capacidade que um produto ou serviço tem para satisfazer as necessidades do cliente. Por isso, assegurar que se trabalha com

qualidade no laboratório de análises clínicas é um parâmetro crucial e essencial ao seu funcionamento.

Considerando que qualquer decisão médica depende dos resultados obtidos, a garantia da qualidade deve ser a preocupação central e constante de todos os colaboradores do laboratório. O desenvolvimento de um sistema da qualidade é imprescindível para o desenvolvimento de atividades e correto desempenho profissional nos laboratórios de análises clínicas ou de patologia clínica. Com esse objetivo, e de forma a garantir que todos os laboratórios trabalhem de forma uniforme, rigorosa e com elevada qualidade foi criado o Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL) de acordo com o Despacho 10009/2019 de 5 de Novembro. De acordo com o MBPL, *“a garantia da qualidade engloba um conjunto de ações preestabelecidas e sistemáticas necessárias para se obter a garantia de que um produto ou serviço, satisfaz determinadas exigências de qualidade”*.²

O SYNLABHEALTH ALENTEJO mantém os níveis de qualidade de acordo com as Normas ISO 9001, ISO 15189 e Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL), permitindo assim disponibilizar os melhores serviços aos seus clientes.

4.1 Controlo de Qualidade Interno

Encontra-se atualmente implementada a existência de um programa de Controlo de Qualidade Interno (CQI) definido pela Organização Mundial de Saúde como *“um conjunto de procedimentos que permitem avaliar de forma contínua o trabalho laboratorial e os resultados obtidos”*.¹ Para isso, no laboratório, o responsável de cada secção realiza diariamente a análise de amostras controlo, sendo estas amostras com uma composição qualitativamente e quantitativamente definida, que tem como principal objetivo avaliar a precisão e exatidão dos resultados laboratoriais obtidos.² Estas amostras controlo são processadas previamente e nas mesmas condições das amostras biológicas. Os resultados obtidos do CQI são transferidos automaticamente para o sistema informático de controlo da qualidade que se encontra implementado no laboratório, o programa *Unity Real Time* da BioRad. Este programa tem estabelecidos limites de aceitação de amostras controlo, começando com os limites inscritos nas bulas e calculando limites próprios com base numa média móvel obtida ao longo do tempo. A análise das cartas de controlo é feita utilizando as Regras de Westgard e, sempre que o resultado de um controlo de qualidade interno não esteja de acordo com os limites estabelecidos nas Regras de Westgard, são aplicadas medidas corretivas com o objetivo de assegurar a garantia da qualidade. Algumas dessas medidas passam pela calibração da técnica.

No SYNLABHEALTH ALENTEJO a gestão da política de qualidade está a cargo da Dra. Maria Gabriel Barroca.

4.2 Avaliação Externa da Qualidade

Para além de avaliar o nível de precisão dos resultados obtidos, através da avaliação do CQI, é necessário avaliar a exatidão da técnica. A participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) permite assegurar a exatidão dos resultados obtidos através da comparação inter-laboratorial. Esta avaliação que consiste na análise de amostras enviadas por entidades organizadoras com valor conhecido pela entidade organizadora e desconhecido para os laboratórios participantes, sendo estas analisadas de forma semelhante e paralela a amostras presentes no normal funcionamento do laboratório. Os resultados obtidos são posteriormente enviados para a entidade organizadora. Esses resultados são analisados, revistos e avaliados por especialistas e comunicados aos participantes, sendo que, sempre que estes resultados não estejam de acordo com os critérios de desempenho da entidade organizadora, deverão ser aplicadas medidas corretivas e uma avaliação posterior da eficácia das mesmas.

O SYNLABHEALTH ALENTEJO participa em programas de AEQ nacionais e internacionais, nomeadamente o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), o programa *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), *Sociedad Espanhola de Hematologia y Hemoterapia* (SEHH) e *Sociedad Española de Quimica Clínica* (SEQC).

5. BIOQUÍMICA

A bioquímica é uma área multidisciplinar que permite explorar e avaliar processos químicos e físico-químicos com o objetivo de avaliar a composição e concentração de diversos analitos no organismo.

O analisador automatizado utilizado neste laboratório para a determinação de parâmetros bioquímicos é o ADVIA® 1800 *Chemistry System* da SIEMENS. Este equipamento está acoplado ao ADVIA® CENTAUR XP *Immunoassay System* através de um braço robótico, o VERSACELL® X3, que permite a interligação dos dois equipamentos. As amostras utilizadas neste setor são o soro e a urina, utilizados para determinações bioquímicas e o plasma fluoretado, utilizado para a determinação da concentração sérica de glicose.

O ADVIA® 1800 *Chemistry System* utiliza a espectrofotometria para a determinação dos parâmetros alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (γ -GT), bilirrubina direta, bilirrubina indireta, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, ácido úrico, creatinina, ureia, amílase, ferro, ferritina, capacidade total de fixação do ferro (TIBC), cálcio, magnésio, fósforo, glicose, colesterol total, *high density lipoprotein* (HDL), *low density lipoprotein* (LDL), triglicéridos, creatina cinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), fator reumatóide (RF), proteína C reativa (PCR) e a antiestreptolisina-O (ASO). O aparelho permite ainda o cálculo de parâmetros como a taxa de filtração glomerular (TFG). O ionograma, que inclui a quantificação de sódio, potássio e cloreto, é determinado através da utilização de elétrodos seletivos de íões (ISE).

A quantificação da hemoglobina glicada (HbA1c), realizada pelo aparelho Variant Turbo II *Hemoglobin Testing System* da BioRad é realizada por cromatografia líquida de alta performance por troca iônica (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*). A eletroforese de proteínas séricas é realizada pelo equipamento Hydrasis da Sebia, sendo a quantificação de cada uma das classes de proteínas determinada por densitometria.

Para além de todas estas determinações, deste setor faz parte a análise bioquímica de urinas tipo II, realizada pelo equipamento AUTION MAX™ AX – 4280 da Menarini. Este aparelho utiliza tiras-teste que permitem a determinação de parâmetros bioquímicos como o pH, leucócitos, sangue, glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos e nitritos, para além de efetuar também uma avaliação da cor e turvação da amostra.

Durante a minha permanência neste setor foi possível participar de forma ativa na rotina, adquirindo conhecimentos sobre o funcionamento e manutenção destes equipamentos, aplicação de CQI e amostras da AEQ e gestão de *stock* de reagentes e consumíveis. Ainda foi possível perceber que o doseamento de parâmetros como a glicémia, o colesterol, os triglicéridos e o ionograma são as determinações que fazem parte de quase todos os perfis de rotina e por isso constituem os parâmetros bioquímicos mais pedidos na rotina laboratorial. Adicionalmente, foi ainda possível perceber que amostras cujos valores estejam muito distantes dos valores do intervalo de referência é necessário confirmar com um duplo ensaio de forma a garantir a fiabilidade do resultado.

6. MICROBIOLOGIA

A microbiologia é área da ciência que se dedica ao estudo de todos os microrganismos como bactérias, vírus, fungos e parasitas. Neste setor são rececionadas amostras para pesquisa de diversos microrganismos, nomeadamente amostras de urina, fezes ou exsudatos sendo que, a marcha analítica difere mediante o produto biológico e o tipo de microrganismo que se pretende avaliar.

A deteção de infeções urinárias é feita a partir da colheita de amostras de urina assética, que são utilizadas para a urocultura. Esta análise é dividida em duas partes: o exame direto e o exame cultural. O exame direto consiste na análise do sedimento urinário para deteção e quantificação de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, presença de cristais, bactérias ou fungos. O exame cultural consiste na inoculação de meios de cultura para avaliar o crescimento de microrganismos patogénicos (descritos no Anexo A, Tabela VI). As amostras de urina ocasional são utilizadas para o diagnóstico imunológico da gravidez (DIG), feito através de testes rápidos imunocromatográficos.

As amostras de fezes rececionadas podem ter diversas finalidades como a pesquisa se sangue oculto, o exame parasitológico, que tal como nome indica permitem identificar a presença de sangue ou parasitas respetivamente, ou ainda a coprocultura. A coprocultura tem como principal finalidade a deteção de microrganismos causadores de infeções gastrointestinais, sendo para isso inoculados vários meios de cultura (Anexo A, Tabela VII).

O diagnóstico de infeções urogenitais pode ser feito através da análise de exsudatos vaginais, exsudatos vaginais-anais e/ou exsudatos uretrais. Esta análise compreende três partes: o exame direto a fresco, o exame direto após coloração e o exame cultural. No exame cultural estes produtos são semeados em meios de cultura mediante o local de colheita da amostra, o produto biológico em questão, o microrganismo de suspeita e de acordo com o sexo e idade do utente (descritos no Anexo A, Tabela VIII). Com menos frequência, são ainda rececionados produtos como exsudatos faríngeos, nasais, auriculares e amostras de pus ou expetoração. A análise de cada uma destes é feita de acordo com o pedido do médico e o agente patogénico que se suspeita, passando pela análise de um exame direto após coloração e exame cultural que compreende a inoculação de vários meios de cultura (Anexo A, Tabela VIII).

Na presença de um exame cultural positivo, para qualquer uma das amostras referidas anteriormente, a identificação do agente patogénico é feita de forma automatizada pelo equipamento VITEK® 2 Compact da Biomérieux, através de cartas de identificação de

microrganismos. Para além da identificação do microrganismo, é realizado também o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos que permite auxiliar no tratamento da infeção.

Neste setor pude participar de forma ativa em várias fases dos procedimentos que englobam a marcha analítica de cada produto biológico, nomeadamente a preparação das amostras para a execução das análises necessárias, tendo sido possível a realização de sementeiras de amostras de urina, fezes e exsudatos, realização de pesquisa de sangue oculto nas fezes, exames parasitológicos, visualização de sedimentos urinários, realização de antibiogramas e identificação de microrganismos.

7. HEMATOLOGIA

A Hematologia é a área da ciência que se dedica ao estudo do sangue. O sangue é um fluído constituído por um componente celular e um componente acelular. Os glóbulos vermelhos ou eritrócitos, os glóbulos brancos ou leucócitos e as plaquetas ou trombócitos constituem os elementos celulares do sangue, sendo estes transportados num líquido complexo designado de plasma que constitui o componente acelular do sangue.³ Cerca de 55% da constituição do sangue é plasma e os restantes 45% correspondem à fração dos elementos celulares, sendo que cerca de 99% dos elementos celulares do sangue corresponde aos eritrócitos e apenas cerca de 1% corresponde aos leucócitos e plaquetas.⁴ O plasma é maioritariamente constituído por água (90%) e diversas substâncias como proteínas, lipoproteínas, metabolitos, fatores de coagulação, glicose e outras numa menor concentração, como por exemplo iões.⁵

7.1 Hematopoiese

A hematopoiese é o processo contínuo e regulado de formação, desenvolvimento, renovação e diferenciação dos diversos tipos de células sanguíneas.³ Os precursores das células sanguíneas são as células estaminais hematopoiéticas (HSC, do inglês *Hematopoietic Stem Cell*) que se encontram na medula óssea. Estas células conseguem responder a fatores de crescimento hematopoiéticos que permitem a estimulação da diferenciação e maturação bem como interferem na função de células sanguíneas maduras.⁷ De cada célula estaminal hematopoiética, e por ação dos fatores de crescimento, ocorre a proliferação de células precursoras da linhagem mieloide ou de células precursoras da linhagem linfoide (Figura 2).³ O precursor da linhagem mieloide dá origem às linhagens eritroide que origina os eritrócitos, o da linhagem granulocítica origina os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, o da linhagem

monocítica origina os monócitos e o da linhagem megacariocítica origina as plaquetas. Por outro lado, a linhagem linfóide origina linfócitos T (do inglês *Thymus*) que sofrem maturação no timo, os linfócitos B (do inglês *Bone Marrow*) que sofrem maturação na medula óssea e as células NK (do inglês *Natural Killer*).³

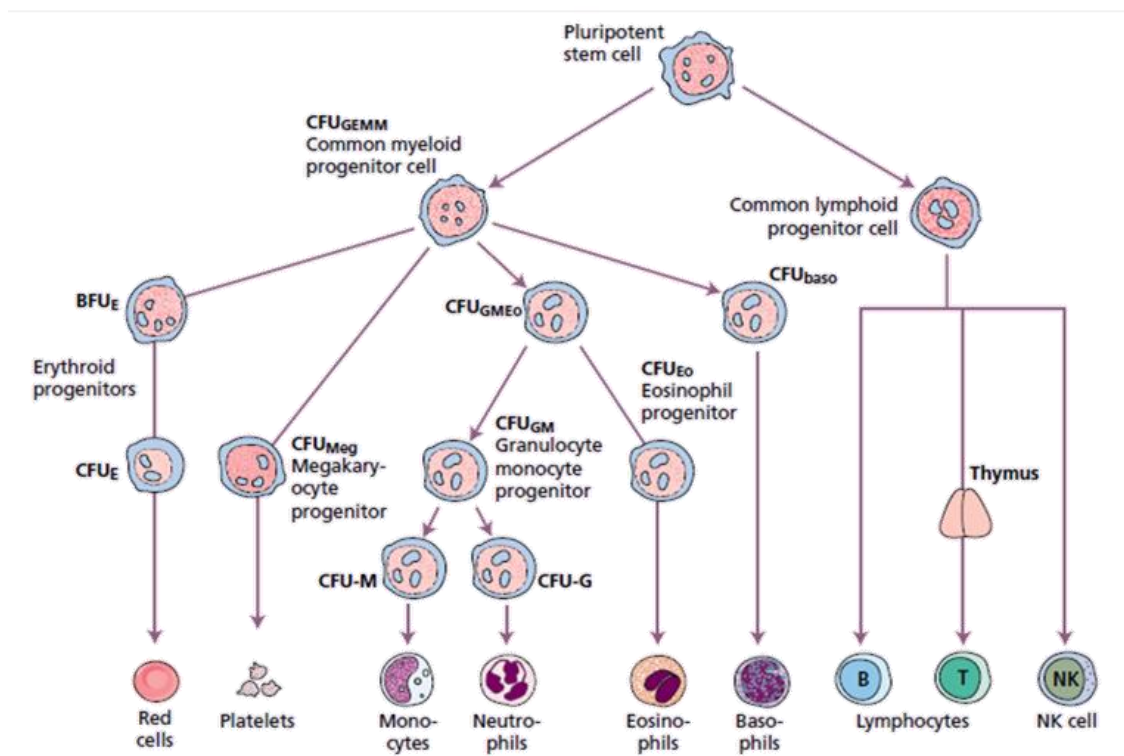


Figura 2 - Diagrama esquemático da hematopoiese com representação das células precursoras e células maduras de cada linhagem (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

7.2 Hemostase

A hemostase é um processo fisiológico complexo que tem como finalidade a manutenção do sangue no estado líquido e, quando necessário ocorrer a formação de um coágulo para cessar a hemorragia. O processo é constituído por três mecanismos: a hemostase primária, a hemostase secundária e a fibrinólise.³ Na presença de uma lesão ocorre a ativação da vasoconstrição e a formação do agregado plaquetar que atuam numa fase inicial e de forma rápida constituindo o mecanismo designado por hemostase primária. No entanto, para controlar hemorragias de grandes dimensões, este mecanismo isoladamente não é eficaz a longo prazo, e por isso o coágulo tem de ser reforçado com fibrina. O mecanismo designado de hemostase secundária corresponde à ativação de uma série de proteínas plasmáticas pró-coagulantes, designadas de fatores da coagulação, que circulam na corrente sanguínea, inativos,

na forma de proenzimas. Na presença de uma lesão, ocorre a exposição ao fator tecidual, desencadeando a ativação de um processo denominado por cascata de coagulação (Figura 3).³

A cascata de coagulação é um mecanismo complexo que envolve várias reações, sendo constituída por três vias: a via extrínseca, a via intrínseca e a via comum (Figura 3).³ A via extrínseca é constituída pelos fatores I, II, V, VII, X, sendo o tempo de protrombina (TP) o parâmetro utilizado para avaliar esta via. A via intrínseca é constituída pelos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, sendo o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) o parâmetro utilizado para avaliar esta via. Estas duas vias têm em comum os fatores I, II, V e X que constituem uma terceira via designada de via comum, uma vez que contém os fatores comuns à via extrínseca e intrínseca. As vias extrínsecas e intrínsecas levam à ativação do fator X que inicia a via comum que tem como finalidade a formação de trombina, uma enzima que converte o fibrinogénio (fator I) em fibrina formando assim o coágulo de fibrina. A fibrinólise é o evento final do mecanismo da coagulação em que ocorre a degradação e remoção do coágulo de fibrina, à medida que a lesão vai cicatrizando.³

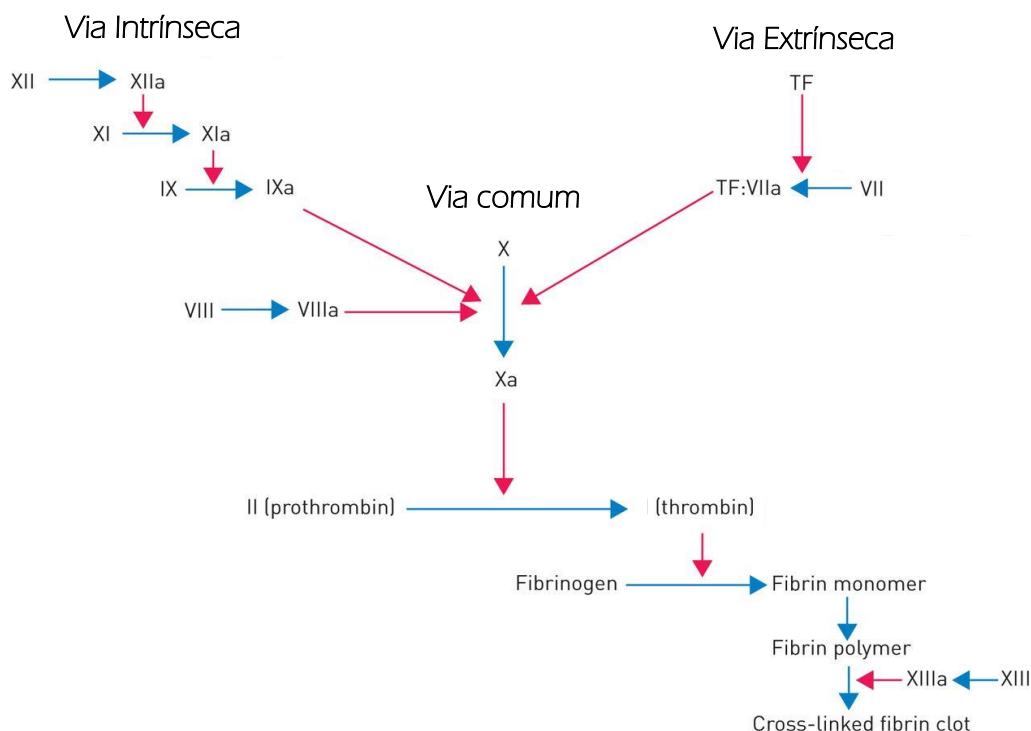


Figura 3 - Esquema simplificado do mecanismo de ativação da Cascata de Coagulação. A via extrínseca é constituída pelos fatores I, II, V, VII, X e a via intrínseca é constituída pelos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII. As vias extrínsecas e intrínsecas levam à ativação do fator X que inicia a via comum que tem como finalidade a formação do coágulo de fibrina culminando na formação do coágulo de fibrina. (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

7.3 Amostras

O sangue total é a amostra utilizada no setor de Hematologia para a realização dos hemogramas, velocidade de sedimentação e contagem de reticulócitos. As amostras são colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico - EDTA K3 uma vez que este anticoagulante através da sua ação quelante de iões Ca^{2+} , inibe a cascata de coagulação. Este é o anticoagulante de eleição em hematologia pois permite a preservação dos componentes celulares do sangue.⁶ A quelação de iões Ca^{2+} pelo EDTA K3 é uma reação irreversível, e por isso, estas amostras não podem ser utilizadas para os testes da coagulação. Por esse motivo, para a realização das provas de coagulação o anticoagulante utilizado é o citrato de sódio. Este é também um agente quelante de iões Ca^{2+} mas, ao contrário do EDTA K3, a reação é facilmente reversível pela adição de iões Ca^{2+} .³ O volume de sangue que deve ser colhido para os tubos de EDTA K3 e citrato de sódio deve ser o volume indicado no tubo de forma a manter a proporção entre o volume de sangue e de anticoagulante. No entanto, este é um aspeto crítico no caso dos tubos de citrato de sódio uma vez que os analisadores automáticos adicionam quantidades de Ca^{2+} em função do volume de sangue colhido.⁶

7.4 Equipamentos e Métodos

SYSMEX XN-550

O SYSMEX XN-550 é um equipamento automatizado utilizado para determinação do hemograma e contagem de reticulócitos, permitindo efetuar uma análise qualitativa e quantitativa dos elementos celulares constituintes do sangue em que, para além dos parâmetros habituais, permite ainda a determinação de parâmetros como a contagem de eritrócitos nucleados (NRBC, do inglês *Nucleated Red Blood Cells*) e granulócitos imaturos (IG, do inglês *Immature Granulocytes*). Este equipamento utiliza uma combinação de várias metodologias para efetuar a determinação destes parâmetros, estando estas descritas em seguida.

IMPEDÂNCIA ELÉTRICA E FOCAGEM HIDRODINÂMICA

A quantificação de eritrócitos e plaquetas é feita utilizando o método de impedância elétrica e focagem hidrodinâmica, baseado no princípio de Coulter. Este princípio baseia-se na deteção e medição de alterações de corrente elétrica provocada pelo aumento da resistência momentâneo conferido pela passagem de células numa abertura entre dois eléctrodos com cargas opostas.⁶ O aumento da resistência origina um sinal eléctrico proporcional ao tamanho da célula sanguínea e o número de sinais eléctricos gerados é proporcional ao número de

células presentes num determinado volume de sangue. O aparelho converte os sinais elétricos, gerados num determinado período de tempo, em representações gráficas, nomeadamente curvas de distribuição de volumes, designados de histogramas.^{3,6}

MÉTODO DO SULFATO LAURIL DE SÓDIO-HEMOGLOBINA (SLS-Hb)

A determinação da concentração da hemoglobina é feita através de um método espectrofotométrico em que, após a adição de um composto com ação surfactante, o Lauril Sulfato de Sódio (SLS, do inglês *Sodium Lauryl Sulfate*), este liga-se à hemoglobina formando o complexo SLS-Hb, cuja absorvância é medida a 555 nm, sendo esta diretamente proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra.^{3,8}

CITOMETRIA DE FLUXO COM FLUORESCÊNCIA

A quantificação total de leucócitos e a contagem diferencial são efetuadas com base na metodologia de citometria de fluxo com fluorescência. Numa etapa inicial, um reagente induz a formação de poros na membrana celular dos leucócitos e os ácidos nucleicos são marcados com um corante fluorescente. Uma radiação monocromática incide em cada célula, sendo a luz dispersa detetada a vários ângulos por três detetores, permitindo avaliar e classificar as diversas subpopulações leucocitárias.⁹ A luz dispersa frontalmente é designada de FSC (do inglês *Forward-Scattered light*) e é diretamente proporcional ao tamanho celular. A luz dispersa lateralmente é designada de SSC (do inglês *Side-Scattered light*) e permite avaliar a estrutura interna e complexidade celular numa relação de proporcionalidade direta. A luz de fluorescência lateral é designada de SFL (*Side-Fluorescence light*) e permite avaliar a concentração de ácidos nucleicos presentes na célula.⁹ O equipamento possui três canais distintos, o canal WDF (*White Blood Cell Differential*) que permite quantificar e diferenciar neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos e células imaturas, o canal WNR (*White Cell Nucleated*) permite efetuar a contagem do número total de leucócitos, basófilos e eritrócitos nucleados (NRBC) e o canal WPC (*White Percursor and Pathological Cell Channel*) permite a deteção de blastos e células anormais da linhagem linfocítica.^{9,10}

VES MATIC CUBE 80

O VES MATIC CUBE 80 é o equipamento automatizado que efetua a determinação da velocidade de sedimentação (VS) através do método de Westergren modificado. O equipamento procede à agitação das amostras que posteriormente ficam em repouso e, através de um sistema de sensores ótico-eletrónicos o equipamento determina a velocidade

de sedimentação dos eritrócitos. O resultado é determinado em 20 minutos e convertido em valores do método de Westergren, sendo este o método de referência.¹¹

SYSMEX CA - 620 da Siemens Healthineers

O *SYSMEX CA - 620* é o equipamento utilizado para determinar os parâmetros da coagulação (TP, TTPa e fibrinogénio) através de um método turbidimétrico. O equipamento efetua a deteção foto-ótica de coágulos formados pela conversão do fibrinogénio a fibrina, que origina a turvação da amostra. A turvação provoca alterações na intensidade de luz dispersa detetada por um foto-detetor que a converte em sinais elétricos utilizados para contabilizar o tempo de coagulação da amostra.³ A determinação da taxa de protrombina e da concentração de fibrinogénio é feita através de curvas de calibração que correlacionam o tempo de coagulação da amostra com a concentração de analito na amostra, convertendo-o em % ou g/dL, respetivamente.

7.5 Determinações Analíticas

No setor de Hematologia deste laboratório as determinações realizadas são o Hemograma, a Velocidade de Sedimentação (VS), a Contagem de Reticulócitos, o Esfregaço de Sangue Periférico (ESP) e as provas de coagulação, que incluem a determinação do Tempo de Protrombina (TP) e *International Normalized Ratio* (INR), do Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa) e do Fibrinogénio. O estudo das hemoglobinopatias é realizado através da Eletroforese de Hemoglobinas.

7.5.1 Hemograma

O hemograma engloba um conjunto de testes realizados numa amostra de sangue que incluem a análise de vários parâmetros que fornecem informações sobre os eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O hemograma contribui para o diagnóstico de alterações das células sanguíneas tendo como objetivo a identificação de patologias e assim orientar a prescrição de tratamentos adequados.

Eritrócitos

Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos (RBC, do inglês *Red Blood Cell*) são células vermelhas, anucleadas, flexíveis com forma de disco bicôncavo que medem 7 a 8 µm de diâmetro e têm uma vida média de cerca de 120 dias. A principal função dos RBC é realizar o

transporte de oxigênio para as células e o retorno do dióxido de carbono para os pulmões, efetuando assim, as trocas gasosas entre os tecidos e os pulmões, sendo este um processo realizado por uma proteína especializada, que se encontra no interior dos eritrócitos, a hemoglobina.^{3,7} A contagem de RBC é expressa em número de células por litro (L), sendo que o intervalo de referência sofre alterações mediante a idade e o sexo, com valores de referência que variam entre 4,5 a 6,5 x10¹²/L para os homens e 3,9 a 5,6 x10¹²/L para as mulheres.⁷

Hemoglobina

Como referido anteriormente, a hemoglobina (Hb) é uma proteína existente nos RBC que tem como principal função efetuar as trocas gasosas entre os tecidos e os pulmões. No entanto, esta proteína também desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base. Cada eritrócito possui cerca de 640 milhões de moléculas de hemoglobina, sendo cerca de 99% do eritrócito ocupado por esta proteína.^{3,7} A hemoglobina é uma molécula composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo cada uma destas constituída por um grupo heme, perfazendo um total de quatro grupos heme em cada molécula de hemoglobina. A síntese do grupo heme ocorre na mitocôndria, através de uma série de reações bioquímicas estimuladas pela eritropoietina. O grupo heme é constituído pela protoporfirina IX combinada com um átomo de ferro no estado ferroso (Fe²⁺).^{3,7}

As hemoglobinas presentes no adulto, em condições normais são a hemoglobina A (Hb A) que corresponde a cerca de 95% do total, a hemoglobina F (Hb F) que constitui cerca de 1 a 2% e a hemoglobina A₂ (Hb A₂) que constitui até 3,5%.⁷ O intervalo de referência da hemoglobina varia mediante a idade e o sexo, sendo que os valores de referência variam entre 13,5-18 g/dL para homens e 12-15 g/dL para mulheres.³ Uma diminuição da concentração de hemoglobina, de acordo com os valores estabelecidos para a idade e sexo, é designada por anemia. A redução da hemoglobina é usualmente acompanhada por uma redução de RBC e uma redução do hematócrito. Uma redução do volume de plasma, como ocorre na desidratação, pode levar a que uma situação de anemia não seja detetada. Ao invés, um aumento do volume plasma, como acontece na gravidez, pode originar uma falsa anemia. Um caso clínico referente a uma condição anémica encontra-se descrito no Anexo B.

As anemias podem ser classificadas com base nos índices eritrocitários, o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (Tabela III), em anemias microcíticas hipocrómicas (Figura 4), anemias normocíticas normocrómicas e anemias macrocíticas (Figura 5).^{3,7}

Tabela III - Classificação das anemias com base nos índices eritrocitários. (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013. *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

MORFOLOGIA	ÍNDICES ERITROCITÁRIOS	CAUSAS
Microcítica Hipocrômica	VCM < 80 fL HCM < 26 pg	Anemia por Deficiência em Ferro Anemia da Doença Crónica Talassémias Anemia Sideroblástica
Normocítica Normocrômica	VCM 80 - 100 fL HCM 26 - 34 pg	Anemia Hemolítica Anemia da Doença Crónica Hemorragia Aguda Doença Renal Crónica Aplasia Medular
Macrocítica	VCM > 100 fL	Anemia Megaloblástica - Deficiência em Vitamina B12 ou Ácido Fólico Excesso Álcool e Doença Hepática Síndrome Mielodisplásica Esferocitose Hereditária

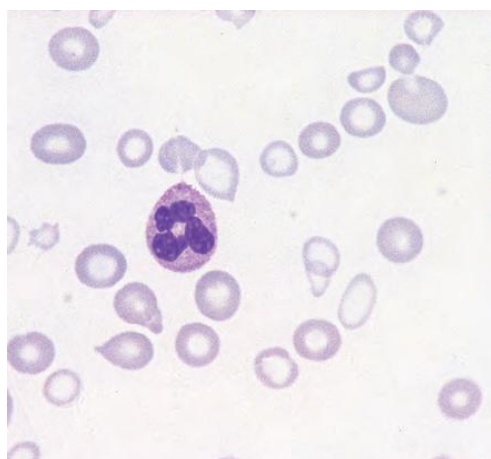


Figura 4 - Observação microscópica de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, referentes a um doente com anemia por deficiência em ferro, numa coloração de May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Bain, B.J., 2015, *Blood Cells: A Practical Guide*. 5th. edition. New Jersey, Wiley Blackwell).



Figura 5 - Observação microscópica de eritrócitos macrocíticos, referentes a um doente com doença hepática, numa coloração de May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Bain, B.J., 2015, *Blood Cells: A Practical Guide*. 5th. edition. New Jersey, Wiley Blackwell).

O aumento da concentração de hemoglobina, e conseqüentemente de RBC e hematócrito (HCT) é designado por policitemia. As principais causas que levam à policitemia são a hipoxia crónica (fumadores), o aumento da síntese de eritropoietina provocado por tumores renais ou policitemia vera.¹² A policitemia vera é uma neoplasia mieloproliferativa

que induz o aumento da produção de eritrócitos, granulócitos e plaquetas.^{3,12} No entanto, policitemias podem ocorrer como resultado da diminuição do volume plasmático, como acontece em queimaduras ou desidratação, sendo designadas de pseudo-policitemia.¹²

Hematócrito

O Hematócrito (HCT) ou *Packed Cell Volume* é o parâmetro que corresponde à razão do volume ocupado pelos eritrócitos em relação ao volume total de sangue, expresso normalmente em percentagem (%). Este parâmetro é calculado através do valor cumulativo do número de sinais elétricos individuais em função do volume total de eritrócitos.³ A determinação do HCT deve ser efetuada até 6 horas após a colheita, uma vez que este sofre um aumento gradual em função do tempo.¹³

O intervalo de referência do HCT varia de 40-54% para homens e 35-49% para mulheres.³ Para além da sua utilidade no diagnóstico de anemias, onde se verifica uma diminuição do hematócrito, este também se encontra diminuído em doentes com patologias renais, inflamações crónicas ou na gravidez devido ao aumento do volume sanguíneo. A sua utilidade passa também pela avaliação do estado de hidratação, sendo que na desidratação o HCT encontra-se aumentado.¹⁴

Volume Corpuscular Médio

O Volume Corpuscular Médio (VCM) corresponde ao volume médio de cada eritrócito. Este parâmetro é calculado diretamente pelo equipamento, utilizando os valores do HCT e de RBC através da seguinte fórmula: $VCM = HCT / RBC$. Este é expresso em fentolítros (fL) e o intervalo de referência do VCM varia entre 80 a 100 fL.³ O VCM permite classificar morfológicamente as anemias como microcíticas (< 80 fL), normocíticas (80-100 fL) e macrocíticas (> 100 fL).^{3,7}

Hemoglobina Corpuscular Média

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) representa o conteúdo médio de hemoglobina presente em cada eritrócito. O valor de HCM tende a ser proporcional ao VCM, uma vez que o tamanho da célula é em parte determinado pelo conteúdo em hemoglobina.³

O HCM é calculado pelo aparelho, utilizando os valores de RBC e Hb através da seguinte fórmula: $HCM = Hb / RBC$. Este parâmetro é expresso em picogramas (pg) e o intervalo de referência para adultos varia entre 26 e 34 pg.³ Este parâmetro permite classificar os eritrócitos em normocrómicos, quando apresentam um valor de HCM dentro dos valores

do intervalo de referência, e hipocrômicos quando apresentam um valor de HCM diminuído, compatíveis com anemias por deficiência em ferro ou síndromes talassêmicas. Um valor elevado de HCM está associado a anemias macrocíticas.¹⁴

Concentração Hemoglobina Corpuscular Média

A Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) corresponde à concentração média de hemoglobina presente em cada eritrócito.¹⁴ Este parâmetro é calculado pelo equipamento, em função dos valores de HCT e de Hb, utilizando a seguinte fórmula: $CHCM = Hb / HCT$. O valor de CHCM é expresso em gramas por decilitro (g/dl) e o intervalo de referência deste parâmetro varia entre 32 a 36 g/dL.³ Valores de CHCM superiores a 38 g/dL devem ser investigados para averiguar a possibilidade de erros no valor de Hb. Além disso, um CHCM elevado pode ocorrer devido à presença de aglutininas frias (*cold agglutinins*), sendo necessária a incubação da amostra a 37°C durante 15 minutos, e posteriormente efetuar novamente a contagem, para descartar essa hipótese.^{3,15}

Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW)

O RDW, do inglês *Red Blood Cell Distribution Width* é uma medida quantitativa da variabilidade do volume dos eritrócitos que permite determinar o índice de anisocitose eritrocitária.¹⁴ Este parâmetro é determinado através dos histogramas obtidos pelo equipamento. Este parâmetro pode ser expresso em fentolítros (fL) ou em percentagem (%).³ O RDW expresso em fentolítros é denominado de RDW-SD sendo calculado pela largura a 20% da altura da curva do histograma assumindo o pico do gráfico como sendo 100%. Este apresenta um intervalo de referência de 37 a 54 fL. O RDW expresso em percentagem é denominado de RDW-CV e calculado como coeficiente de variação do volume dos eritrócitos, apresentando um intervalo de referência que varia entre 11,5% e 14,5%.³

Este parâmetro é utilizado para principalmente no diagnóstico diferencial de anemias, sendo que um RDW com valores normais é característico de síndromes talassêmicas, anemia da doença crônica, hemorragias agudas e esferocitose hereditária. Ao invés, um RDW aumentado, indicativo de uma maior variabilidade no tamanho dos eritrócitos, é compatível com anemia por deficiência em ferro, vitamina B12 ou folato, drepanocitose, síndrome mielodisplásica e doença hepática.^{3,14}

Leucócitos

Os leucócitos, também designados de glóbulos brancos (WBC, do inglês *White Blood Cell*), são um dos elementos celulares do sangue, sendo a principal função a de mediadores de imunidade, conferindo proteção contra infecções. A contagem de WBC, expressa em células por litro (L), apresenta um intervalo de referência que varia de $4,5 \times 10^9/L$ a $11,5 \times 10^9/L$, sendo utilizada para avaliar inúmeras patologias como infecções, alergias, doenças autoimunes e leucemias.^{3,14} Uma diminuição do número de WBC é designada de leucopenia e a leucocitose é referente a um aumento de WBC. No entanto, a contagem de WBC por si só não tem muita relevância clínica, sendo de maior relevância as alterações referentes aos diversos tipos de leucócitos. Os leucócitos podem ser classificados como linfócitos, neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos. Cada uma das subclasses de leucócitos é apresentada com um valor em porcentagem e um valor absoluto.³

Os neutrófilos medem 12-15 μm e são a subclasse de leucócitos mais abundantes no sangue periférico, com uma prevalência de 50 a 70% (em números absolutos $2,3$ a $8,1 \times 10^9/L$). Possuem um citoplasma acidófilo com muitos grânulos. O núcleo possui cromatina condensada dividida em 2 a 5 lóbulos através de filamentos (Figura 6). Os neutrófilos fazem parte do sistema imune inato, sendo a sua função principal a de fagocitose e de destruição de bactérias e fungos. Na presença de uma infecção bacteriana, ocorre um aumento dos neutrófilos, designado de neutrofilia. A neutropenia corresponde a uma diminuição do número de neutrófilos e pode ter várias causas como infecções virais ou a ingestão de alguns medicamentos.^{3,12}

Os linfócitos possuem um citoplasma escasso e pouco basófilo, com uma coloração azul-claro e possuem um diâmetro de 10-16 μm . O núcleo é redondo e contém cromatina condensada (Figura 7).¹² Os linfócitos constituem 18 a 42% ($0,8$ a $4,8 \times 10^9/L$ em números absolutos) dos leucócitos presentes no sangue periférico. Estes podem dividir-se em 3 grupos: os linfócitos T, os linfócitos B e as células *Natural Killer* (NK). Os linfócitos T e B constituem a grande maioria dos linfócitos e estão associados à resposta imune adquirida. Os linfócitos B são mediadores de imunidade humoral e sintetizam anticorpos. Ao invés, os linfócitos T e as células NK são mediadores

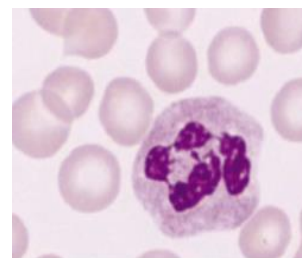


Figura 6 - Observação microscópica de um neutrófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

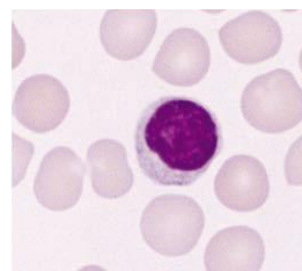


Figura 7 - Observação microscópica de um linfócito num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

de imunidade celular. Uma diminuição desta subclasse de leucócitos é designada de linfopenia e está associada a imunodeficiência ou terapias com fármacos. A linfocitose, referente a um aumento de linfócitos, está frequentemente associada a infecções virais ou leucemias.³

Os monócitos são as células do sangue periférico com maior dimensão, com um diâmetro de 12-20 μm . Possuem um núcleo irregular e lobulado e um citoplasma azul-acinzentado com grânulos azurófilos (Figura 8). Os monócitos constituem 2 a 11% dos leucócitos presentes em circulação. Nos tecidos, estes diferenciam-se em macrófagos. A monocitose, referente a um aumento de monócitos está associada a infecções ou leucemias agudas ou crônicas.^{3,12}

Os eosinófilos são constituídos por um núcleo bilobado e possuem grânulos esféricos, significativamente maiores que os dos neutrófilos, que lhes conferem uma cor vermelha-alaranjada (Figura 9). Estas células têm um diâmetro que varia entre 12 a 17 μm e contabilizam 1 a 3% (até $0,4 \times 10^9/\text{L}$ em números absolutos) dos leucócitos presentes no sangue periférico.¹² Os eosinófilos possuem um papel importante na regulação imune e a eosinofilia, referente a um aumento de eosinófilos, é considerada um importante marcador de alergia, estando também associado a infecções por parasitas helmintas.³

Os basófilos são os leucócitos menos frequentes no sangue periférico, com uma prevalência de 0 a 2% dos leucócitos.³ Possuem 10-14 μm de diâmetro e grânulos irregulares roxo-escuro, com um tamanho intermédio que varia entre os dos neutrófilos e dos eosinófilos (Figura 10).^{3,12} O papel desempenhado por estas células não é muito conhecido, no entanto sabe-se que desempenham um papel importante nas respostas alérgicas, através da secreção de substâncias granulares, como a histamina.³

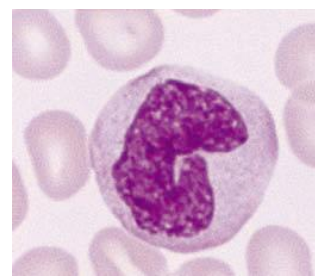


Figura 8 - Observação microscópica de um monócito num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell.)

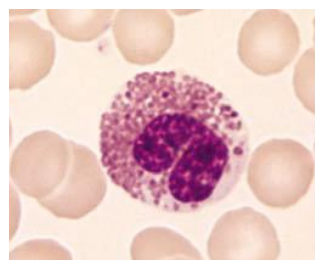


Figura 9 - Observação microscópica de um eosinófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

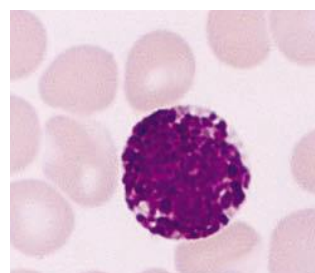


Figura 10 - Observação microscópica de um basófilo num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

Plaquetas

As plaquetas são células sanguíneas complexas, anucleadas produzidas a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos e possuem 2 a 3 µm de diâmetro. Estas células são formadas a partir dos megacariócitos que são estimulados por fatores de crescimento, como a trombopoietina a formar as plaquetas, processo esse designado por trombocitopoiese. As plaquetas têm uma vida média de 8 a 9 dias e desempenham um papel importante na hemostase primária. O valor de referência da contagem de plaquetas varia entre 150 e 400 x10⁹ células por litro. Este valor é geralmente superior nas mulheres em relação aos homens, e sofre uma diminuição gradual e ligeira, em ambos os sexos, a partir dos 65 anos. O valor referido corresponde a apenas 2/3 da quantidade de plaquetas no organismo, o restante 1/3 corresponde a plaquetas que estão sequestradas no baço. Na presença de lesões, processos inflamatórios agudos ou após procedimentos cirúrgicos, as plaquetas sequestradas no baço são libertadas, ocorrendo um aumento do número de plaquetas, designado por trombocitose. A trombocitose é um forte indicador de patologias mieloproliferativas, que são a principal causa de trombocitemia essencial (primária). A trombocitose reativa (secundária) é resultante de infeções, processos inflamatórios ou patologias malignas. As trombocitopenias, caracterizadas por uma diminuição do número de plaquetas, podem ter várias etiologias como a diminuição de síntese pela medula óssea, aumento da destruição ou uma anormal distribuição plaquetária.³

Plaquetócrito

O Plaquetócrito (PCT) é, à semelhança do hematócrito, uma razão entre o volume ocupado pelas plaquetas em relação ao volume total de sangue. Este parâmetro é expresso em percentagem e não providência informação com significado clínico.¹³

Volume Plaquetar Médio

O Volume Plaquetar Médio (VPM) indica o volume médio de cada plaqueta. O VPM é determinado a partir do histograma de distribuição de volumes das plaquetas sendo especialmente útil em utentes com trombocitopenias ou trombocitoses.^{13,16} Este parâmetro é expresso em femtolitros e possui um intervalo de referência que varia entre 7,5 a 11,5 fL.¹⁶

Em pacientes com trombocitose, um VPM elevado é sugestivo de trombocitose essencial (primária) e um VPM diminuído é sugestivo de trombocitose reativa (secundária).^{3,16} Em pacientes com trombocitopenias, um VPM elevado é sugestivo de purpura trombocitopénica imune, coagulação intravascular disseminada (CID) ou sépsis.¹⁶

Índice de Distribuição Plaquetário

O Índice de Distribuição Plaquetário (PDW, do inglês *Platelet Distribution Width*) é um indicador da anisocitose plaquetária. Este é calculado da mesma forma que o RDW, ou seja, através da distância a 20% da altura do pico, sendo expresso em fL.^{3,13} A determinação do PDW é útil no diagnóstico diferencial de trombocitemia essencial onde se verifica um PDW aumentado e a trombocitose reativa que apresenta um PDW normal.¹³

7.5.2 Reticulócitos

Os reticulócitos são as células precursoras dos eritrócitos. Estes contêm pequenas quantidades de RNA e organelos e permanecem geralmente dois dias na medula óssea antes de se desenvolverem em eritrócitos. A contagem de reticulócitos é efetuada pelo equipamento por citometria de fluxo com fluorescência. O aparelho efetua a distinção entre eritrócitos e os reticulócitos através das diferenças na SFL, uma vez que os reticulócitos que apresentam maior intensidade de SFL devido à presença de RNA e organelos celulares. O valor da contagem de reticulócitos é expresso em percentagem, com um intervalo de referência que varia entre 0,5 a 2,5%.³

A contagem destas células permite avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea em resposta à diminuição do número de eritrócitos e poderá ser útil no diagnóstico diferencial de anemias.¹⁴ Um aumento do número de reticulócitos, designado por reticulocitose, ocorre geralmente na presença de perdas de sangue agudas e anemias hemolíticas, devido a uma elevada destruição de eritrócitos.^{3,12} Em doentes com patologias renais crónicas, a contagem de reticulócitos encontra-se geralmente diminuída devido à diminuição da síntese de eritropoietina.¹⁴

7.5.3 Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação (VS) é uma determinação que avalia a distância percorrida pelos eritrócitos sob a influência da gravidade, no período de 1 hora, sendo esta expressa em mm/h.^{3,13}

Em condições normais, os eritrócitos repelem-se devido às cargas negativas da superfície celular. Porém, essa repulsão tem tendência a ser neutralizada quando ocorre um aumento de proteínas de fase aguda carregadas positivamente, tal como o fibrinogénio e a Proteína C Reativa (PCR), devido à ocorrência de um fenómeno designado de fenómeno de *rouleaux*. O fenómeno de *rouleaux* é caracterizado pela agregação eritrocitária sendo que,

eritrócitos agregados sedimentam mais rapidamente do que eritrócitos isolados.^{3,11} Considerando estes aspetos, este parâmetro é solicitado especialmente para deteção e monitorização de processos ou doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, infeções ou patologias malignas onde se verifica um aumento da VS.¹¹ Um aumento da VS verifica-se também em patologias que não estão associadas a aumentos de proteínas de fase aguda como a anemia, por alterações da proporção de eritrócitos e plasma ou em condições fisiológicas como a gravidez e a idade avançada. No entanto, a VS é um parâmetro inespecífico, uma vez que a sua alteração pode estar associada a inúmeras patologias¹¹ e por isso, a determinação da PCR é considerada um indicador mais fiável e de maior utilidade na deteção de processos inflamatórios e infeções.^{3,13}

O intervalo de referência da VS varia entre 0 a 15 mm/h para homens e 0 a 20 mm/h para mulheres e aumenta ligeiramente com a idade.³

7.5.4 Esfregaço de Sangue Periférico

O Esfregaço de Sangue Periférico (ESP) consiste na avaliação morfológica e contagem diferencial de células sanguíneas através da observação microscópica. A realização do ESP é efetuada sempre que pedida na requisição médica ou quando os resultados do hemograma suscitam dúvidas. Para a execução do ESP, a amostra é homogeneizada e colocada uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina (Figura 11).³ Com um movimento rápido e contínuo faz-se deslizar outra lâmina sobre a anterior, num ângulo de cerca de 30-40°. É necessário que o esfregaço de sangue periférico possua determinadas características que permitam uma boa observação e distinção de células sanguíneas.

Posteriormente procede-se à coloração do esfregaço, sendo a coloração de May-Grunwald Giemsa a coloração utilizada no laboratório. Esta coloração utiliza dois corantes: o corante May-Grunwald e o corante Giemsa. Numa fase inicial, as lâminas são submersas numa solução de May-Grunwald contendo eosina (corante ácido), responsável por corar os componentes básicos da célula de rosa-avermelhado, e azul de metileno (corante básico) responsável por corar o núcleo e os componentes ácidos de azul arroxeadado.^{3,13,17} O corante Giemsa é uma solução de azul de metileno que permite a coloração de granulações azurófilas de roxo-avermelhado.^{3,17}

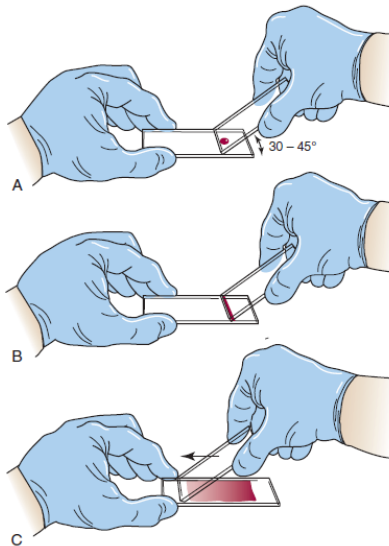


Figura 11 - Realização do Esfregaço de Sangue Periférico. (Adaptado de Keohane, E.M., Smith, L.J., Walenga, J.M., 2016, *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 5th edition, USA, Elsevier Saunders).

No SYNLABHEALTH ALENTEJO o ESP é observado ao microscópio por especialistas que avaliam parâmetros como alterações da morfologia celular permitindo por exemplo observar a presença de poiquilocitose (Figura 12) ou a presença de células percussoras imaturas (Figura 13).

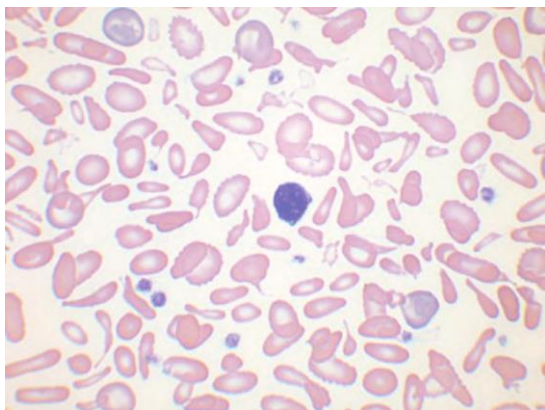


Figura 12 - Poiquilocitose acentuada observada num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa. (Adaptado de Bain, B.J., 2015, *Blood Cells: A Practical Guide*. 5th. edition. New Jersey, Wiley Blackwell).

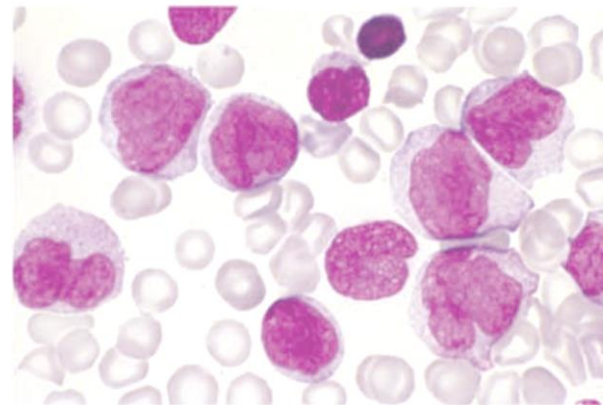


Figura 13 - Células imaturas referentes a uma Leucemia Mieloide Aguda observadas num esfregaço de sangue periférico corado por May - Grunwald Giemsa. (Adaptado de Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., 2013, *Essencial Haematology*. 6th edition Wiley-Blackwell).

7.5.5 Eletroforese de Hemoglobinas

No SYNLABHEALTH ALENTEJO o estudo das hemoglobinopatias é feito através da eletroforese de hemoglobinas realizada no equipamento HYDRASIS da Sebia. As hemoglobinopatias são as patologias genéticas mais comuns, sendo originadas por mutações em genes que codificam as proteínas que constituem a hemoglobina, afetando assim a síntese

de hemoglobina. As hemoglobinopatias podem ser classificadas como quantitativas, quando ocorre um déficit de uma ou várias cadeias globínicas e conseqüentemente ocorre o aumento da síntese de cadeias globínicas não afetadas pela mutação (talassémias) ou qualitativas, quando existe alteração de aminoácidos constituintes das cadeias globínicas, ocorrendo alterações da estrutura da molécula de hemoglobina.³

A eletroforese de hemoglobinas é uma técnica que permite a separação e identificação de diversos tipos de hemoglobinas como a Hb A, Hb F e a Hb A₂ e ainda variantes de hemoglobinas como a Hb S. O princípio desta técnica é baseado na diferença da mobilidade eletroforética das hemoglobinas, mediante a sua carga e tamanho, quando aplicadas num gel e expostas a um campo elétrico. A pH alcalino, as moléculas de hemoglobina assumem uma carga negativa e, quando sujeitas a um campo elétrico, migram em direção ao ânodo (polo positivo). As variantes estruturais de hemoglobina que contenham alterações de carga de superfície vão ter mobilidades eletroforéticas distintas o que possibilita a sua separação da hemoglobina A.¹³ O gel é corado e posteriormente lido por densitometria que permite obter o doseamento das frações de hemoglobina, expresso em %.³

No laboratório pode ainda ser realizado o teste da solubilidade, para a pesquisa de hemoglobina S. O teste consiste na adição de uma solução tampão contendo ditionito, que permite a conversão da hemoglobina na sua forma desoxigenada, e saponina que promove a hemólise dos eritrócitos. Quando presente, a hemoglobina S desoxigenada origina a turvação da solução, ao contrário do que acontece com amostras sem presença de hemoglobina S que permanecem límpidas.³

7.5.6 Provas de Coagulação

A hemostase é um processo complexo que é avaliado por um conjunto de testes designados de provas de coagulação. A cascata da coagulação é um processo complexo que engloba várias vias (intrínseca, extrínseca e comum) (Figura 3). A identificação de alterações nestas vias é feita no laboratório através da análise de parâmetros como o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa). Para além destes é ainda possível efetuar o doseamento da concentração de fibrinogénio.

Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) permite avaliar alterações dos fatores das vias extrínseca e comum, nomeadamente os fatores I, II, V, VII e X, no entanto apresenta uma maior sensibilidade na deteção de deficiências do fator VII.^{3,7} O TP é determinado pela

quantificação do tempo, em segundos, que decorre entre a adição de tromboplastina e cálcio ao plasma do utente até à formação do coágulo de fibrina.⁷

A determinação do TP é utilizada especialmente na monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, nem especial a varfarina, devido à elevada variabilidade de resposta entre indivíduos a este fármaco.⁶ Esta determinação também é útil na deteção de deficiências genéticas ou adquiridas dos fatores de coagulação da via extrínseca e na avaliação da capacidade de síntese hepática, uma vez que o fígado é o principal responsável pela síntese dos fatores de coagulação. Assim, este parâmetro é o marcador mais relevante de prognóstico de doenças hepáticas agudas e normalmente é o primeiro teste de função a sofrer alteração aquando da evolução da hepatite crónica para cirrose, verificando-se nestes casos um prolongamento do TP.^{3,6} Em deficiências de vitamina K e na coagulação intravascular disseminada (CID) também é característico um TP prolongado.³

O TP apresenta elevada variabilidade em função do equipamento utilizado, do reagente de tromboplastina e da população alvo do laboratório e, por isso, existe a necessidade de normalizar esses resultados. O *International Normalized Ratio* (INR) é a forma de expressar o TP que permite a padronização inter-laboratorial deste parâmetro, tendo especial utilidade em doentes sujeitos a terapêutica com anticoagulantes orais.⁶ O INR é calculado através da razão entre o TP doente e o TP médio da população normal, elevado ao ISI (Índice de Sensibilidade Internacional).³ O intervalo de referência típico do TP é de 12,6 a 14,6 segundos³, no entanto este varia mediante a população alvo do laboratório. Este parâmetro pode ser ainda expresso em %, como taxa de protrombina com valores que variam entre 70% - 134%. O intervalo de referência do INR é variável com a condição patológica do doente, sendo que para doentes sujeitos a terapêutica com anticoagulantes orais o valor estabelecido varia entre 2 a 3.³

É necessário ter ainda em consideração que vários aspetos podem alterar o valor de TP como a presença de lipémia ou icterícia. A colheita de um volume de amostra inferior ao especificado no tubo poderá originar um aumento do TP. Amostras hemolisadas originam uma diminuição do TP.³

Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

O Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa) permite avaliar a via intrínseca e comum, através da avaliação dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI e XII.⁷ Para efetuar a determinação deste parâmetro, ao plasma do utente são adicionados fosfolípidos, um ativador superficial que permite a ativação dos fatores de coagulação da via intrínseca, e Ca^{2+} que inicia

o processo de coagulação. O TTPa corresponde ao tempo que decorre entre a adição dos íons de Ca^{2+} até à formação do coágulo de fibrina.^{3,7} A determinação do TTPa permite a monitorização da terapêutica com heparina não fracionada, a deteção da presença do anticorpo lúpico (LA, do inglês *Lupic Antibody*) e permite ainda avaliar a presença de deficiências congénitas ou adquiridas destes fatores.³

Um prolongamento do TTPa verifica-se na presença de deficiências dos fatores da via intrínseca e comum, nomeadamente nos défices do fator VIII (Hemofilia A) e défices do fator IX (Hemofilia B) e na presença do LA.³

O intervalo de referência varia mediante a população alvo, o tipo de reagente e o equipamento utilizado, sendo que o intervalo estabelecido é de 26 a 38 segundos.³

Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda positiva, e constitui o componente final do sistema da coagulação. A remoção de uma pequena parte desta proteína, por ação da trombina, faz com que ocorra a agregação do fibrinogénio levando à formação de fibrina, sendo por isso a manutenção da concentração adequada desta proteína importante para prevenir hemorragias. Baixas concentrações de fibrinogénio, designadas de hipofibrogenia, resultam da utilização excessiva desta proteína, tal como se verifica em hemorragias extensas e em desregulações do sistema da coagulação (CID).⁶ A insuficiência hepática severa está também associada à hipofibrogenia, resultando numa menor síntese desta proteína.³ Um aumento na concentração de fibrinogénio está frequentemente associado a doenças inflamatórias crónicas.^{3,6} O fibrinogénio é um dos principais componentes que contribui para a viscosidade sanguínea, devido ao seu elevado tamanho e estrutura, e por isso um aumento de fibrinogénio está associado a um aumento do risco de doença cardiovascular.⁶

O fibrinogénio é determinado pelo tempo que decorre entre a adição de trombina e a formação de fibrina, sendo o tempo de coagulação inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio na amostra.³ Os resultados são determinados em segundos e convertidos em mg/dL, sendo que o intervalo de referência varia entre 150 – 350 mg/dL.⁶

8. IMUNOLOGIA

O sistema imunológico é um sistema complexo, constituído por um conjunto de moléculas, células, tecidos e órgãos que funcionam coletivamente para proporcionar a proteção e defesa do organismo contra microrganismos patogénicos, substâncias potencialmente prejudiciais e células cancerígenas, sendo a imunologia o estudo destes mecanismos e componentes. Na presença destas situações é desencadeada uma ação coordenada de células e moléculas contra substâncias estranhas designada de resposta imunológica. A imunidade pode ser distinguida em dois componentes: um menos específico - a imunidade inata e um componente mais específico - a imunidade adaptativa, que funcionam de forma interativa e cooperativa, uma vez que a ativação da resposta imunológica inata produz sinais que estimulam a resposta imunológica adaptativa, permitindo que ocorra uma resposta imunológica eficaz.^{18,19}

A imunidade inata ou imunidade natural é considerada a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogénicos, sendo constituída por mecanismos celulares e moleculares existentes no hospedeiro previamente ao contacto com o agente infeccioso, sendo por isso menos específica. Em indivíduos saudáveis, a imunidade inata consegue providenciar uma resposta efetiva e neutralizante do agente infeccioso, dentro de um curto espaço de tempo, e por isso não será necessária a ativação da imunidade adquirida.¹⁹

Quando o sistema imunológico inato não consegue controlar e eliminar a infeção, ocorrendo a persistência do antigénio, é ativada a resposta imunológica adquirida. A imunidade adquirida ou imunidade adaptativa é desencadeada com o objetivo de eliminar o agente infeccioso através da ativação e ação de mecanismos com elevada especificidade e eficácia, ocorrendo cerca de 5 a 6 dias após a exposição inicial ao antigénio. Esta resposta imune é executada por linfócitos T e B mediadores de imunidade celular e humoral respetivamente, e anticorpos.^{19,20}

Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas presentes na superfície de membrana dos linfócitos B, que lhe conferem especificidade antigénica e permitem a ligação a antigénios. Quando um linfócito B *naive* contacta com um antigénio (endógeno ou exógeno) que se ligue ao seu anticorpo de superfície, ocorre a diferenciação deste em linfócitos B de memória ou linfócitos B efetor designado de plasmócito. Os plasmócitos sintetizam anticorpos que são secretados e que circulam no sangue, onde atuam como mediadores de imunidade humoral através neutralização de antigénios ou marcação de antigénios para posterior eliminação.^{19,20}

Os anticorpos são formados por um total de quatro cadeias peptídicas ligadas entre si, sendo duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas.^{19,20} Os anticorpos possuem a estrutura clássica de um Y o que lhes confere a capacidade de se ligarem a dois antígenos.²¹ Cada uma das cadeias leves e cadeias pesadas é constituída por uma região constante e por uma região variável.¹⁹ A região variável apresenta sequências com elevada variabilidade que conferem elevada especificidade aos anticorpos. Ao contrário, a região constante apresenta uma variabilidade limitada e isso permite diferenciar dois subtipos de cadeias leves (kappa e lambda) e cinco subtipos de cadeias pesadas (γ , μ , α , ϵ , e δ) que diferem na sequência de aminoácidos e determinam a nomenclatura das diferentes imunoglobulinas respetivamente IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.¹⁹

A IgG é um monómero e constitui a classe de imunoglobulinas mais abundante no soro, com uma prevalência de cerca de 80%.¹⁹ Existem 4 subclasses desta imunoglobulina: a IgG1, a IgG2, a IgG3 e a IgG4. Esta é a única imunoglobulina que consegue atravessar a placenta e proteger o feto.²⁰ A molécula de IgM é um pentâmero constituída por 5 subunidades (monómeros) e constitui a imunoglobulina de maior tamanho presente no soro. Esta é a terceira imunoglobulina mais prevalente no soro (5-10%) e é a primeira imunoglobulina a ser sintetizada pelos plasmócitos após contactarem com um antígeno. As moléculas de IgA são dímeros e representam as imunoglobulinas predominantes nas secreções externas como o leite materno, a saliva, as lágrimas e o muco dos tratos gastro-intestinal, genito-urinário e brônquico. A IgA é a segunda imunoglobulina mais frequente no soro (10-15%). A IgE apresenta uma estrutura monomérica e, de todas as sub-classes de imunoglobulinas, esta é a que possui a menor concentração sérica, com cerca de 0,3 $\mu\text{g/mL}$. A IgE participa nas reações alérgicas e na defesa contra doenças parasitárias por helmintas. A IgD é um monómero e apresenta uma concentração sérica de 30 $\mu\text{g/ml}$ o que constitui cerca de 0,2% do total de imunoglobulinas no soro. Até ao momento, não foi identificada qualquer função biológica associada a esta imunoglobulina.^{19,20}

8.1 Amostras

A amostra utilizada para todas as determinações imunológicas automatizadas e manuais é o soro. Na execução da tipagem de grupos sanguíneos é utilizado o sangue total e o plasma.

8.2 Equipamentos e Métodos

No setor de Imunologia os equipamentos utilizados são o IMMULITE 2000 e o ADVIA CENTAUR XP sendo que ambos os equipamentos utilizam ensaios imunoquimioluminescentes (CLIA, do inglês *Chemiluminescent Immunoassays*) para a determinação de todos os parâmetros referidos na Tabela V. Esta técnica consiste na detecção de imunocomplexos (complexos antigénio-anticorpo) através da quantificação de energia emitida sob a forma de luz resultante de uma reação química, denominada de quimioluminescência. Uma molécula quimioluminescente, utilizada como marcador é adicionada à reação ocorrendo a ligação desta aos imunocomplexos, sendo através da emissão e quantificação de luz possível detetar e quantificar o analito pretendido.⁶ Os ensaios CLIA são uma das técnicas com maior especificidade e sensibilidade disponíveis na atualidade, sendo por isso largamente utilizadas uma vez que permitem a detecção de concentrações muito mais baixas de analitos comparativamente a outras técnicas.²¹

IMMULITE 2000

O IMMULITE 2000 é um analisador automatizado que permite a determinação de vários parâmetros através de CLIA. O aparelho utiliza, como fase sólida, esferas revestidas na sua superfície com anticorpos ou antigénios direcionados para o analito alvo. A reação ocorre num tubo de reação onde é colocada uma esfera em contacto com a amostra do utente. Este equipamento utiliza como marcador quimioluminescente, a fosfatase alcalina, que se liga ao imunocomplexo. Após a remoção do antigénio ou anticorpo excedente, por rotação do tubo de reação, é adicionado o substrato enzimático (fosfato de dioxetano adamantil) que por ação da fosfatase alcalina, origina um composto instável que emite luz. A luz emitida é quantificada e posteriormente convertida em concentração de analito.^{22,23} O equipamento utiliza vários formatos desta metodologia para quantificar analitos, nomeadamente o ensaio competitivo (*tipo sandwich*) e o ensaio não competitivo, descritos posteriormente.

ADVIA CENTAUR XP

O ADVIA CENTAUR XP é um analisador automatizado que, como já referido permite a quantificação de analitos através dos CLIA. Estes ensaios utilizam como marcador quimioluminescentes os ésteres de acridina (EA).²⁴ Os EA são oxidados pelo peróxido de hidrogénio em meio alcalino, emitindo luz que é quantificada a 426 nm.^{6,21,25} O equipamento utiliza como fase sólida partículas paramagnéticas (PPM) de óxido de ferro que contêm na sua superfície anticorpos ou antigénios direcionados ao anticorpo ou antigénio que se pretende dosear.^{24,26} O anticorpo ou antigénio alvo liga-se às PPM e quando a cuvette onde ocorre a

reação é exposta a um campo magnético, as PPM ligadas ao analito alvo são atraídas por imanes que mantêm as esferas seguras enquanto o sistema efetua a lavagem da amostra para remover todos os componentes que não estão ligados às esferas.^{24,26} Tal como o IMMULITE 2000, este equipamento utiliza vários imunoenaios desta metodologia para detetar antigénios ou anticorpos alvo, nomeadamente o ensaio não competitivo, o ensaio competitivo e o ensaio de captura de anticorpos.

ENSAIO NÃO COMPETITIVO (*tipo sandwich*)

O ensaio não competitivo tipo *sandwich* é um ensaio onde um anticorpo (designado de anticorpo de captura) se encontra em excesso ligado à fase sólida. Posteriormente, o antigénio que se pretende dosear vai ligar-se ao anticorpo de captura, e subseqüentemente, ocorre a ligação de um anticorpo marcado (com EA ou fosfatase alcalina) que se liga ao complexo antigénio-anticorpo previamente formado (Figura 14). O excesso de anticorpo marcado é removido e é determinada a quantificação de luz emitida, sendo esta proporcional à concentração de antigénio alvo.^{6,27} Quando o analito que se pretende dosear é um anticorpo, a metodologia é semelhante à descrita anteriormente, no entanto, à fase sólida está acoplado um antigénio direcionado ao anticorpo alvo ao qual se liga posteriormente um anticorpo marcado (Figura 15).²⁷

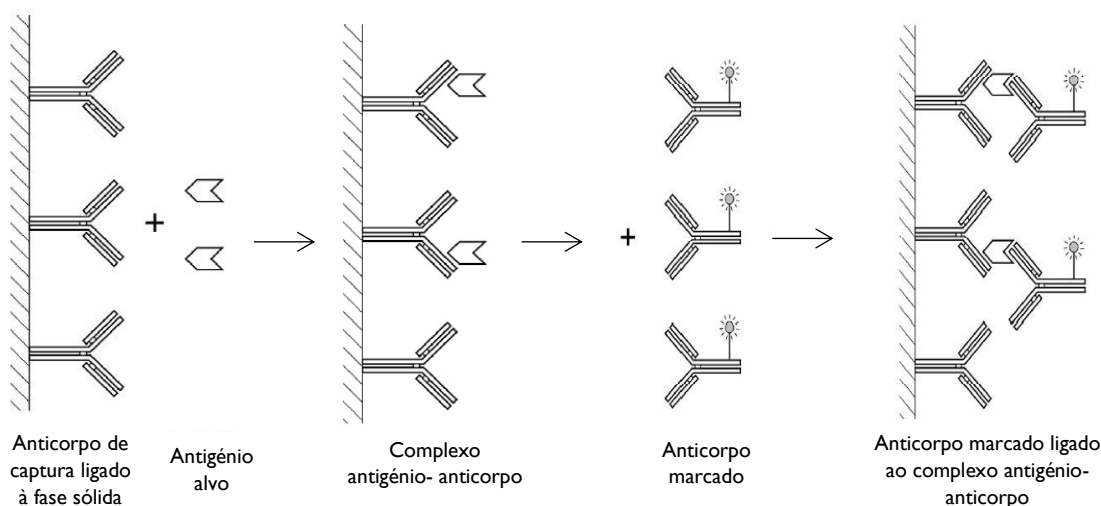


Figura 14 - Detecção de antigénios pelo ensaio não competitivo (tipo *sandwich*). (Adaptado de Davies, C, 2013., *Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA) I*. The Immunoassay Handbook).

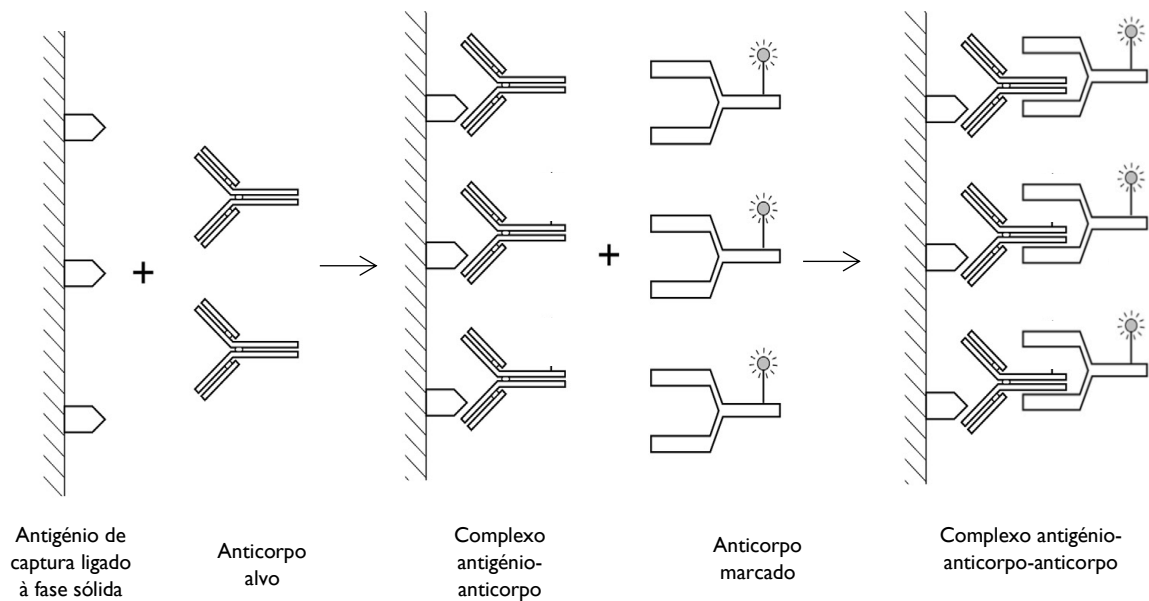


Figura 15 - Detecção de anticorpos pelo ensaio não competitivo (tipo sandwich). (Adaptado de Davies, C., 2013, *Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA) I*. The Immunoassay Handbook.)

ENSAIO COMPETITIVO

No ensaio competitivo o antígeno marcado (EA ou fosfatase alcalina) compete com o antígeno que se pretende dosear por locais de ligação limitados do anticorpo, que se encontra acoplado à fase sólida. Quanto maior for o número de antígenos que se pretende dosear presentes na amostra, menor é o número de antígenos marcados ligados (Figura 16). Neste caso a concentração de antígeno e a emissão de luz são inversamente proporcionais, por isso quanto maior for o número de antígenos alvo ligados ao anticorpo, menor é o número de antígenos marcados que está ligado ao anticorpo e menor será a emissão de luz.^{6,27}

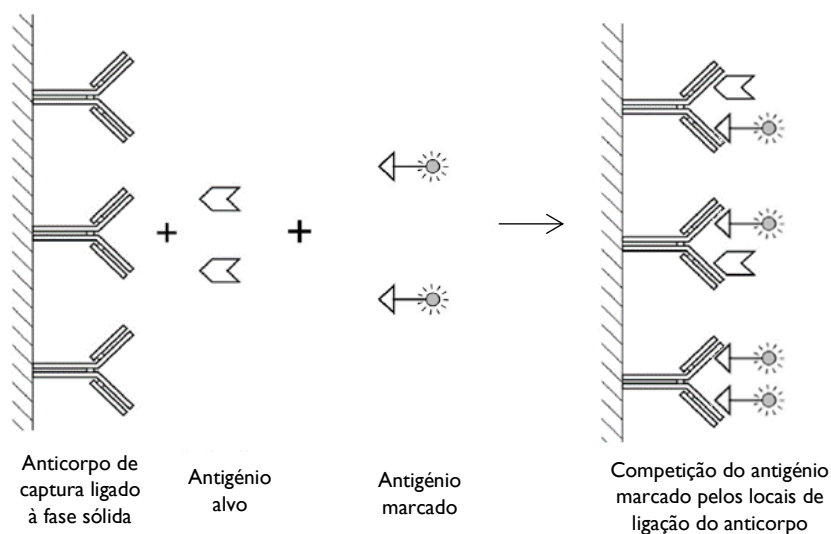


Figura 16 – Detecção de antígenos pelo ensaio competitivo. (Adaptado de Davies, C., 2013, *Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA) I*. The Immunoassay Handbook).

ENSAIO DE CAPTURA DE ANTICORPOS

O formato de captura de anticorpos é utilizado pelo ADVIA CENTAUR XP quando o analito a ser quantificado é um anticorpo. As PPM contêm o anticorpo na sua superfície ao qual se liga o anticorpo alvo. Posteriormente são adicionados antígenos marcados com EA que se ligam ao complexo anticorpo-anticorpo (Figura 17). Neste tipo de formato a emissão de luz e a concentração de anticorpo que se pretende dosear apresentam uma relação de proporcionalidade direta sendo que, quanto maior for a emissão de luz maior será a concentração do anticorpo alvo presente na amostra.²⁷

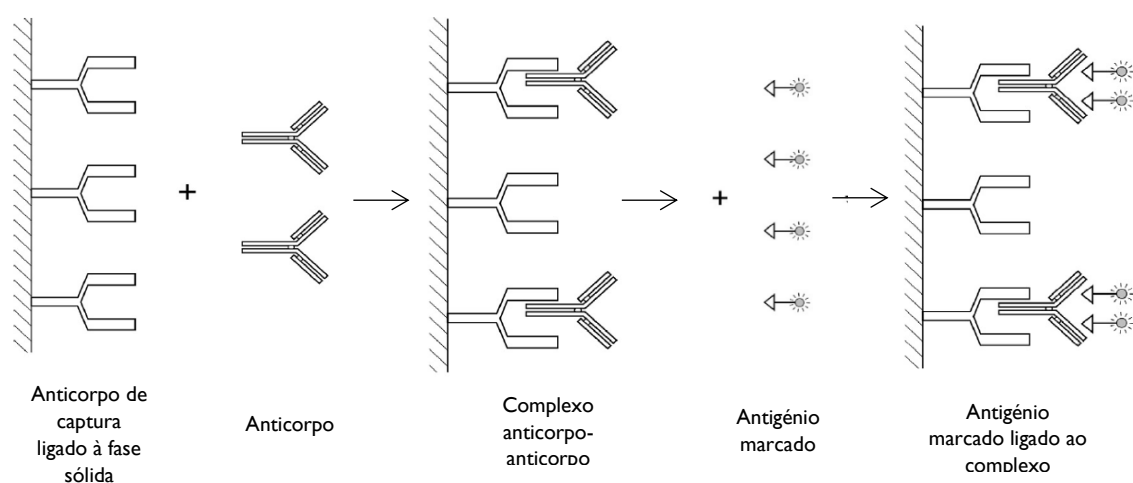


Figura 17 - Detecção de anticorpos pelo ensaio de captura de anticorpos (Adaptado de Davies, C., 2013., *Principles of Competitive and Immunoassays (Including ELISA) I*. The Immunoassay Handbook).

Mini VIDAS

O mini VIDAS da *Biomérieux* é um equipamento compacto e automatizado utilizado para confirmação de resultados positivos para anticorpos anti-vírus da Hepatite C, anticorpos e antígenos anti-HIV, antígeno de superfície da Hepatite B (HBs Ag), *Toxoplasma gondii* IgM, Rubéola IgM e Citomegalovirus IgM. O equipamento utiliza a metodologia *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) para quantificar o analito alvo uma vez que, comparativamente aos CLIA, esta metodologia apresenta uma maior sensibilidade.²⁶ Estes são imunoenaios do tipo não competitivo (tipo *sandwich*) que contém uma fase sólida com os antígenos ou anticorpos direcionados ao analito alvo. A este complexo ligam-se antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima, a fosfatase alcalina, ocorrendo posteriormente a adição do substrato (*4-methyl-umbelliferyl phosphate*). A fosfatase alcalina leva à desfosforilação do substrato e origina um produto que emite radiação fluorescente que é detetada e quantificada a 450 nm.^{26,28} A concentração de antígeno ou anticorpo alvo é proporcional à fluorescência emitida.²⁶

8.3 Determinações Analíticas

A detecção de microrganismos causadores de infeções pode ser feita com recurso a técnicas microbiológicas que consistem na recuperação, isolamento e identificação do microrganismo responsável pela infeção. No entanto, este é um mecanismo complexo e moroso e por isso o recurso a técnicas imunológicas que permitem a detecção de antigénios ou anticorpos sintetizados na sequência da infeção, constituem um meio de diagnóstico mais simples, rápido e com elevada eficiência. A detecção de anticorpos, e em especial da subclasse presente no soro, permite ainda determinar se a infeção se encontra na fase aguda, crónica ou em fase de resolução.

8.3.1 Manuais

As técnicas manuais executadas no laboratório têm por base o princípio da aglutinação, que consiste na interação entre um antigénio e um anticorpo com a formação de agregados visíveis a olho nu.¹⁹ São várias as técnicas realizadas como a reação de Paul-Bunnell para detecção de anticorpos anti-vírus de Espstein-Barr, o teste de Waller-Rose para detecção da presença de anticorpos anti-fator reumatóide, o teste de Rose Bengal para detecção de anticorpos anti-brucelose e o Teste de Coombs Direto para a detecção de anticorpos anti-D acoplados na membrana dos eritrócitos. No entanto, neste relatório apenas serão abordadas com maior detalhe as técnicas executadas com maior frequência nomeadamente o VDRL/RPR, a Tipagem de Grupos Sanguíneos e o Teste de Coombs Indireto. A realização destas técnicas é feita, como já referido, de forma manual e por isso a execução e rigor na sua realização é um aspeto de extrema relevância considerando a técnica e o número de amostras a executar diariamente e de forma paralela. Apesar de não ter sido possível a participação autónoma na realização destas técnicas, tive a possibilidade de presenciar a sua execução e participar na leitura e análise de resultados.

8.3.1.1 VDRL / RPR











A sífilis é uma doença sexualmente transmissível provocada por uma bactéria com forma de espiroqueta designada de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*.²⁹ A detecção laboratorial da infeção causada por esta bactéria é efetuada através de métodos serológicos nomeadamente testes treponémicos, que detetam anticorpos sintetizados contra as proteínas da bactéria, e os testes não treponémicos que detetam anticorpos sintetizados contra os antigénios lipídicos da bactéria.³⁰ Os testes não treponémicos são os mais utilizados uma vez que são mais rápidos e fáceis de executar comparativamente aos testes treponémicos. Os

testes não treponémicos mais utilizados são o *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e o *Rapid Plasma Reagin* (RPR), que permitem detetar a presença de anticorpos IgG e IgM.³⁰ No entanto, devido à complexidade de preparação do reagente e à dificuldade de leitura dos resultados, na grande maioria dos laboratórios é utilizado o RPR ao invés do VDRL²⁹, tal como acontece no laboratório SYNLABHEALTH ALENTEJO. O RPR permite detetar reaginas, anticorpos sintetizados na sequência da infeção por *Treponema pallidum*, utilizando antígenos de cardiolipina, lectina e colesterol que possuem acopladas partículas de carbono que permitem mais facilmente visualizar as reações de aglutinação.²⁹ Num cartão contendo círculos é colocado o soro do utente e uma gota de reagente contendo os antígenos associados a partículas de carbono, ocorrendo aglutinação se o soro do utente possuir anticorpos sendo assim o resultado positivo. Na presença de um resultado positivo é determinado o título de diluição que permite uma avaliação semi-quantitativa do grau da infeção.³⁰

8.3.1.2 Grupos Sanguíneos

O grupo sanguíneo é determinado mediante os antígenos presentes na superfície dos eritrócitos. Os principais sistemas de grupos sanguíneos são o sistema ABO e o sistema Rhesus, sendo que, o sistema ABO contém os grupos sanguíneos A, B, AB e O classificados mediante a presença ou ausência de antígenos A e B e o sistema Rhesus permite determinar a presença ou ausência do antígeno D na superfície dos eritrócitos, designado de Rh positivo ou Rh negativo respetivamente (Tabela IV).³¹

Tabela IV - Grupos Sanguíneos. (Adaptado de Dean L., 2005., *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).

Grupo sanguíneo	A	B	AB	O
				
Antígeno	 Antígeno A	 Antígeno B	 Antígeno A e B	Não há antígenos
Anticorpo	 Anti - B	 Anti - A	Não há anticorpos	 Anti - B Anti -A

A determinação do grupo sanguíneo é realizada por técnicas baseadas na aglutinação entre os antígenos de superfície dos eritrócitos e anticorpos. No laboratório são utilizados

os Card-ID DiaClon ABO/D + Reverse Grouping (Figura 18) que permitem a realização da prova direta, possibilitando a determinação dos antígenos de superfície presentes nos eritrócitos, e efetuar a prova reversa que identifica a presença ou ausência de anticorpos anti-A e/ou anti-B no soro do utente.³²

Cada *card* é constituído por seis microcolunas que contém uma matriz filtrante que permite a passagem de eritrócitos livres e a sua consequente sedimentação. Os complexos aglutinados mantêm-se à superfície da matriz e indicam um resultado positivo (Figura 18).^{32,33} Na coluna A e B é realizada prova direta sendo que nestas colunas é colocada uma solução de eritrócitos do utente (eritrócitos do utente misturados com um diluente que favorece as ligações antígeno-anticorpo) em contacto com anticorpos anti-A e anticorpos anti-B nas colunas A e B, respetivamente. A coluna C é utilizada para verificar a presença ou ausência do antígeno D e na coluna D é realizado o controlo. Nas colunas E e F é realizada a prova reversa, colocando o plasma do utente em contacto com antígeno A e antígeno B, respetivamente. Os *cards* são posteriormente centrifugados³³ e a leitura destes é realizada de forma automatizada pelo *Banjo ID-Reader* da BioRad.

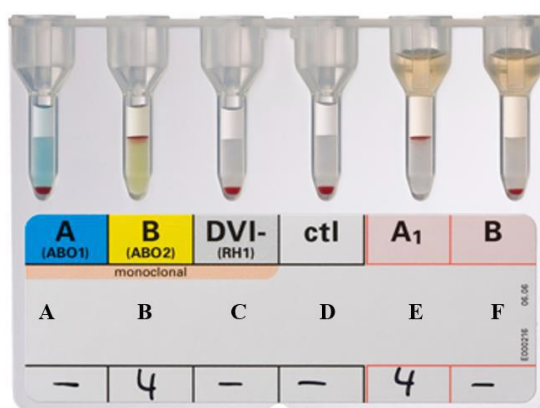


Figura 18 - Determinação do grupo sanguíneo pelo Card-ID DiaClon ABO/D + Reverse Grouping.

O resultado da prova direta é indicativo do grupo B, o fator Rh é negativo e a prova reversa indica a presença de anticorpos anti-A sendo esta concordante com a prova celular.

8.3.1.3 Teste De Coombs Indireto

O Teste de Coombs Indireto ou teste da antiglobulina indireto tem como objetivo detetar a presença de anticorpos anti-D livres no sangue.³¹ Para efetuar este teste são utilizados os Card-ID LISS/Coombs que possuem microcolunas contendo antiglobulina humana (soro de Coombs). Nestas microcolunas o soro do utente é colocado em contacto com células comerciais com antígenos de interesse (Rh positivos). Na presença de anticorpos anti-D estes ligam-se aos eritrócitos Rh positivos formando um complexo de aglutinados que

se mantém à superfície da matriz filtrante constituinte das microcolunas.³³ A execução do Teste de Coombs Indireto é particularmente relevante na avaliação de incompatibilidades do grupo Rh, com particular interesse em mulheres grávidas. Uma mulher grávida que possua anticorpos anti-D no sangue poderá transmitir esses anticorpos ao feto e, na presença de um feto Rh+ ocorre a ligação destes aos antígenos D presentes nos eritrócitos do feto levando à ocorrência de uma patologia designada de doença hemolítica do recém-nascido. Esta patologia pode ter várias complicações fetais como hepatoesplenomegália, icterícia ou hidrósia fetal que pode levar à morte do recém-nascido, seja durante a gestação ou mesmo após o nascimento, e por isso a relevância deste teste em mulheres grávidas.³¹

8.3.2 Automatizadas

A determinações analíticas automatizadas realizadas neste setor da Imunologia estão descritas na Tabela V, com indicação do equipamento onde são executadas. O setor de Imunologia é um setor com um elevado grau de automatização e por isso, a interferência humana é praticamente nula (com exceção para as técnicas manuais descritas anteriormente). No entanto, estes equipamentos necessitam de manutenção diária que inclui o abastecimento de reagentes e consumíveis e execução da calibração, sendo que durante o estágio tive a oportunidade de participar nestas tarefas. Para além disso, a aplicação de amostras de CQI e análise destas amostras faz parte da rotina diária a que o equipamento está sujeito na qual pude também participar de forma ativa.

Tabela V – Determinações analíticas realizadas nos automatizadores ADVIA CENTAUR XP e IMMULITE 2000.

	ADVIA CENTAUR XP	IMMULITE 2000
Vírus	Anticorpo Hepatite B (anti-Hbs)	Anticorpo anti - Citomegalovirus IgG
	Antígeno Hepatite B (HBs Ag)	Anticorpo anti - Citomegalovirus IgM
	Anticorpos anti – HCV	Anticorpo anti - Rubéola IgG
	HIV (p24 + HIV1/2)	Anticorpo anti - Rubéola IgM
Parasitas	-----	Anticorpo anti - <i>Toxoplasma gondii</i> IgG
		Anticorpo anti - <i>Toxoplasma gondii</i> IgM
Marcadores	α-Feto Proteína (AFP)	Antígeno Específico da Próstata total
	Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	(PSA total)
Tumorais	CA 19.9	Antígeno Específico da Próstata livre
	CA 125	(PSA livre)

Hormonas	Hormona Folículo Estimulante (FSH)	
	Hormona Luteinizante (LH)	
	Progesterona	Testosterona
	Prolactina	
	Hormona da Paratiroide (PTH)	
	Hormona Tiro Estimulante (TSH)	
	17- β Estradiol	
	Triiodotironina (T3)	Hormona Gonadotrofina Coriónica
	Triiodotironina (FT3)	(β hCG)
	Tiroxina (T4)	
Tiroxina livre (FT4)		
Outros	Vitamina B12	Proteína C Reativa ultra-sensível
		IgE total
	Ácido Fólico	Anticorpo anti - Tiroideus
		Anticorpo anti - Peroxidase

8.3.2.1 Infecções Virais e Parasitárias

Na generalidade das infeções, sejam bacterianas, virais ou parasitárias, é difícil isolar o agente patogénico e por isso a avaliação serológica constitui uma das principais ferramentas para a deteção destas infeções. A deteção passa pela quantificação de antígenos ou anticorpos em amostras sanguíneas. A deteção de anticorpos IgM ou IgG permite avaliar a presença de infeções ativas e agudas ou avaliar a presença de imunidade, respetivamente.³⁴

Citomegalovirus

O Citomegalovirus (CMV) é um vírus com um genoma de dsDNA que pertence à família *Betaherpesvirinae* e ao género *Cytomegalovirus*. As células infetadas por CMV tornam-se células gigantes com inclusões intranucleares e citoplasmáticas onde o vírus pode ficar latente e sofrer reativações futuras.^{35,36}

A infeção por CMV é considerada a infeção viral congénita mais comum em humanos e constitui uma importante causa de mortalidade em hospedeiros imunocomprometidos. No entanto, é geralmente assintomática em hospedeiros imunocompetentes. A deteção do CMV é particularmente importante em mulheres grávidas, uma vez que primoinfeções por CMV durante a gestação podem desencadear complicações graves ou morte fetal.^{35,36}

Uma vez que a maioria das pessoas, incluindo grávidas, são assintomáticas, a única forma de detetar a infeção primária ou reativação é através da deteção de anticorpos IgM.³⁶ Na presença de IgM positiva, o resultado é confirmado no equipamento *Mini VIDAS*. A deteção de anticorpos IgG indica uma infeção que ocorreu no passado, no entanto, no caso positividade para IgG deve ser realizado um teste de avidéz que permite efetuar uma datação relativa da infeção.³⁶ Contudo, o teste de avidéz não é realizado no laboratório SYNLABHEALTH ALENTEJO e as amostras são enviadas para um laboratório que pertence ao grupo.

Vírus da Hepatite B

A hepatite corresponde a uma inflamação e necrose das células hepáticas que pode resultar da infeção dos hepatócitos por diversos vírus nomeadamente o vírus da Hepatite B (HBV, do inglês *Hepatitis B Virus*) e o vírus da Hepatite C. O HBV é um vírus que pertence à família *Hepadnaviridae*. A infeção pelo vírus da Hepatite B constitui o maior problema de saúde pública a nível mundial.^{35,37} Cerca de 5% a 10% das pessoas com infeção por HBV evoluem para infeção crónica com predisposição para desenvolvimento de cirrose ou carcinoma hepatocelular.^{37,38}

O diagnóstico laboratorial desta infeção passa pela identificação do antígeno de superfície da Hepatite B (HBs Ag, do inglês *Hepatitis B Surface Antigen*) que indica uma infeção ativa e encontrando-se persistentemente positivo nas infeções crónicas, definidas pela presença de HBs Ag num período superior a 6 meses. A presença de anticorpos anti-HBs indica imunidade do hospedeiro contra a HBV, quer seja adquirida por uma infeção anterior ou como resultado da vacinação.³⁸ Os resultados positivos de HBs Ag são confirmados no MiniVIDAS.

Vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C (HCV, do inglês *Hepatitis C Virus*) é um vírus de cadeia simples de RNA (ssRNA) que pertence à família *Flaviridae* e ao género *Hepacivirus*.³⁸ A grande maioria dos casos (cerca de 80%), a infeção por HCV evolui para hepatite crónica com desenvolvimento de cirrose e carcinomas hepatocelulares.³⁵ Até ao momento não existe vacina disponível para prevenção da infeção por HCV.³⁸

A deteção da infeção por HCV é efetuada pela presença de anticorpos anti-HCV uma vez que os antígenos do HCV não são detetados no sangue.³⁸ Um resultado positivo para anticorpos anti-HCV é posteriormente confirmado no MiniVIDAS.

Vírus da Imunodeficiência Humana

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) é o agente viral que provoca a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, a SIDA. O HIV é um retrovírus que pertence à família *Retroviridae*. Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2 que apresentam 50% de homologia genómica, no entanto o HIV-1 é o responsável pela pandemia mundial, enquanto o HIV-2 está circunscrito à África Ocidental. O HIV infeta linfócitos T CD4+ induzindo nestes um efeito citopático resultando na destruição de linfócitos T CD4+ infetados e também não infetados, ocorrendo uma diminuição do número de linfócitos T CD4+. Os doentes com HIV são suscetíveis a infeções oportunistas que em doentes imunocompetentes são facilmente combatidas pelo sistema imune intacto. Uma vez infetado com HIV, no hospedeiro não o consegue eliminar e o vírus permanece latente no organismo.³⁸

A infeção por HIV pode compreender vários estadios diferentes. Numa fase inicial ocorre a infeção aguda ou primária que se caracteriza por ser geralmente assintomática ou pela presença de sintomas pouco característicos como cansaço, mal-estar, linfadenopatias e hepatoesplenomegália. Posteriormente segue-se a fase assintomática ou de latência clínica onde não há evidência de manifestações clínicas, no entanto o vírus pode ser detetado no sangue. O estadio de SIDA é classificado por uma redução drástica do número de linfócitos T CD4+ (inferior a 200/mm³), o que facilita a infeção por agentes patogénicos oportunistas. Isto significa que, um individuo infetado com HIV pode nunca desenvolver o estadio de SIDA.³⁸

A deteção da infeção por HIV é feita através da pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e do antígeno p24 presente na superfície da partícula viral. Na presença de uma amostra positiva para HIV este resultado é confirmado no MiniVIDAS.

Rubéola

O vírus da Rubéola é um vírus envelopado de cadeia simples de RNA (ssRNA) pertencente à família *Togaviridae* e ao género *Rubivirus*.³⁸ Das pessoas infetas pelo vírus da rubéola cerca de 30 a 60% desenvolvem sintomatologia que se manifesta pelo aparecimento de manchas vermelhas, febre, alterações respiratórias, artralguas e linfadenopatias. No entanto, a grande preocupação de infeção por este vírus ocorre principalmente em mulheres grávidas, em especial no primeiro trimestre de gestação, em que uma primoinfeção por este vírus poderá originar vasculite fetal ou placentária com comprometimento da oxigenação fetal, alterações cromossómicas, malformações congénitas e inúmeras outras complicações fetais.

A ocorrência de uma primoinfeção no curso da gravidez faz com que a maioria dos fetos infectados permaneçam com uma infecção crônica.³⁸

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da rubéola é por isso, de extrema importância em mulheres grávidas e faz parte dos testes de rotina em grávidas, passando pela detecção de anticorpos IgM e IgG indicativos de uma infecção aguda ou imunidade, respectivamente. Uma vez infectadas as pessoas adquirem imunidade para toda a vida.³⁸

Toxoplasma gondii

O parasita *Toxoplasma gondii* é um parasita protozoário intracelular obrigatório e é o agente etiológico da toxoplasmose. Cerca de 50% da população mundial apresenta imunidade para a toxoplasmose. A infecção pode manifestar-se de várias formas sendo que nos doentes imunocompetentes apenas uma pequena parte (10%) são sintomáticos normalmente apresentam manifestações clínicas ligeiras. Nos doentes imunodeprimidos geralmente é sintomática e pode mesmo ser fatal.³⁸

As primoinfeções em mulheres grávidas representam um grave problema, uma vez que podem ser responsáveis pela transmissão da toxoplasmose ao feto o que poderá ter consequências graves e fatais. Existe uma correlação entre a gravidade da doença fetal e o tempo de gestação em que ocorre a infecção sendo que quando mais cedo a infecção for adquirida maior será a severidade da doença fetal. Os fetos que sobrevivem na grande maioria dos casos apresentam alterações neurológicas e oculares graves e um prognóstico reservado quando a primoinfeção ocorreu no 1º e 2º trimestre de gravidez.⁸

O diagnóstico da toxoplasmose é feito com recurso à detecção de anticorpos IgM e IgG. A presença de anticorpos IgM é indicativa de infecção aguda (ou reativação) e a presença de anticorpos IgG é indicativa de uma infecção passada e normalmente imunidade adquirida para toda a vida.^{38,39} Um resultado positivo para IgM é confirmado no MiniVIDAS. Na presença de um resultado positivo de IgG a amostra é enviada para outro laboratório do grupo para realização do teste da avididade que permite efetuar uma datação relativa da infecção. A interpretação de anticorpos encontra-se descrita e exemplificada com mais detalhe no caso clínico descrito no Anexo C.

8.3.2.2 Hormonas

Hormona Tiro Estimulante (TSH)

A Hormona Tiro Estimulante (TSH, do inglês *Thyroid Stimulating Hormone*) é uma glicoproteína sintetizada pela adenohipófise que promove o crescimento da tiroide e a síntese e secreção de hormonas tiroideias pela tiroide. O doseamento desta hormona é relevante na avaliação da função tiroideia e na identificação de disfunções tiroideias. A determinação da concentração da TSH, conjuntamente com o doseamento de Triiodotironina (T3) e da Tetraiodotironina (T4), permite auxiliar na distinção de hipotiroidismo primário ou secundário e do hipertiroidismo primário ou secundário.⁶

O hipotiroidismo primário é caracterizado por uma diminuição das concentrações de T3 e T4 e um aumento da concentração de TSH, indicativos de uma resposta hipofisária normal e de patologia da glândula tiroideia. Ao invés, o hipotiroidismo secundário é caracterizado por uma diminuição das concentrações de T3 e T4 e uma diminuição da concentração de TSH, indicativos de uma resposta hipofisária anormal e por isso sugestivo de patologia hipofisária.⁶ O hipertiroidismo primário é caracterizado por um aumento das concentrações de T3 e T4 e uma diminuição da concentração de TSH, indicativos de uma resposta hipofisária normal e de alterações tiroideias. O hipertiroidismo secundário é caracterizado por um aumento das concentrações de T3 e T4 e um aumento das concentrações de TSH, indicativos de uma resposta hipofisária anormal e por isso sugestivo de patologia hipofisária. Um aumento de TSH, tal como se verifica no hipertiroidismo secundário pode ser causado por adenomas libertadores de TSH ou derivados de patologias autoimunes como é o caso da Doença de Graves.⁶

Tetraiodotironina ou Tiroxina (T4)

A Tetraiodotironina (T4, do inglês *Total Thyroxine*) é uma hormona sintetizada pela tiroide, no entanto o mecanismo que desencadeia a libertação desta hormona é iniciado no hipotálamo. Diversos estímulos, como o stress ou a hipotermia, estimulam a libertação de *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) pelo hipotálamo, que conseqüentemente promove a libertação de TSH pela adenohipófise. A TSH é a hormona que permite a regulação da libertação de T3 e T4 pela tiroide.⁶

Na tiroide, o iodeto que advém da dieta é armazenado e posteriormente incorporado na tiroglobulina. A tiroglobulina, sintetizada pelas células foliculares da tiroide, possui vários resíduos de tirosina que podem ser iodados e originam a monoiodotirosina (que contém um

ião iodeto) e a diiodotirosina (que contêm 2 iões iodeto). A junção de uma molécula de monoiodotirosina e uma molécula de diiodotirosina origina a triiodotirosina (T3). A junção de duas moléculas de diiodotirosina origina a tiroxina (T4) sendo esta a hormona formada em maior quantidade. Cerca de 1/3 desta T4 é convertida a T3 nos tecidos. Mais de 99% das moléculas de T3 e T4 circulam na corrente sanguínea ligadas a proteínas, como a albumina e a *Thyroxine-Binding Globulin* (TBG), no entanto estas hormonas são biologicamente inativas.⁶

A T3 e a T4 exercem a sua função em diversos locais do organismo e participam na regulação de inúmeros processos fisiológicos, como regulação da temperatura corporal, do ritmo cardíaco e do trânsito GI e principalmente das variações no estado de humor.⁶

O doseamento de T4 é principalmente utilizado para avaliar a função tiroideia. Uma diminuição da função tiroideia, avaliada pela diminuição de T3 e T4 é designada de hipotiroidismo sendo a principal causa desta alteração a Tiroidite de Hashimoto (em países desenvolvidos em que o consumo de iodo é adequado). O aumento da concentração de T3 e T4 é característico do hipertiroidismo, sendo a principal causa de hipertiroidismo a Doença de Graves e o adenoma tóxico.⁶

Tiroxina Livre (FT4)

A tiroxina livre (FT4, do inglês *Free Thyroxine*) é a hormona tiroxina que circula livre na corrente sanguínea e constitui apenas uma pequena fração da hormona T4. O doseamento da FT4 é o parâmetro mais frequentemente pedido para avaliação da função tiroideia.⁶

Triiodotironina (T3)

A Triiodotironina (T3, do inglês *Total Triiodothyronine*) é a principal hormona tiroideia ativa, sendo cerca de 20% desta é sintetizada pela tiroide e a restante é sintetizada pela transformação de T4 em T3 nos tecidos periféricos. O mecanismo de formação da T3 ocorre paralelamente e de forma semelhante ao da T4.⁶

Triiodotironina Livre (FT3)

À semelhança do que acontece com a FT4, a Triiodotironina Livre (FT3, do inglês *Free Triiodothyronine*) representa a fração da T3 que circula livre, representando menos de 1% do total de T3 porque, a grande maioria da triiodotironina se encontra ligada a proteínas.⁶

Hormona Luteinizante (LH)

A Hormona Luteinizante (LH, do inglês *Luteinizing Hormone*) é uma glicoproteína sintetizada pela adenohipófise (pituária anterior) em resposta à hormona à *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) libertada pelo hipotálamo. Tanto a LH como a Hormona Folículo Estimulante (FSH, do inglês *Follicle Stimulating Hormone*) têm um papel fundamental na manutenção da funcionalidade normal dos sistemas reprodutores masculinos e feminino, sendo a libertação destas hormonas regulada por mecanismos de *feedback* negativo. Um aumento da concentração das hormonas libertadas pela glândula alvo induz a diminuição de libertação de hormonas LH e FSH pela hipófise.⁶

Nas mulheres, a LH atua especialmente em glândulas endócrinas como gónadas. Conjuntamente com a FSH vai promover a ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo e secreção de progesterona. Cerca de 3 a 36 horas antes da ovulação as concentrações de LH atingem um pico e por isso o doseamento desta hormona pode ser relevante para prever a data da ovulação. Após a menopausa os valores de concentração de LH sofrem um aumento. Níveis elevados de LH podem estar associados ao Síndrome do Ovário Poliquístico (SOP) ou a hipofunção ovárica.⁶

Nos homens a hormona LH tem um papel importante na estimulação do desenvolvimento e funcionalidade das células de Leydig testiculares e consequentemente estimulação da produção de testosterona. Uma diminuição das concentrações de testosterona e de LH caracteriza o hipogonadismo hipogonadotrófico (secundário). Esta síndrome é caracterizada por uma diminuição da função hipofisária com diminuição dos níveis de LH e FSH e consequentemente de testosterona e estradiol.⁶

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

A Hormona Folículo Estimulante (FSH, do inglês *Follicle Stimulating Hormone*) é também uma hormona sintetizada pela adenohipófise sob o controlo da GnRH e atua especialmente nas gónadas sexuais masculinas e femininas nomeadamente os ovários e os testículos. Nas mulheres a FSH promove a estimulação do crescimento e maturação dos folículos ováricos e, em conjunto com a LH, promove a secreção de estrogénio. O aumento das concentrações de FSH verifica-se no início da fase folicular. Valores de FSH persistentemente elevados são sugestivos de hipogonadismo hipergonadotrófico (primário), menopausa ou hipofunção ovárica primária. Em contrapartida, uma diminuição nos valores de FSH é sugestiva de hiperfunção ovárica.⁶

Nos homens, a principal função desta hormona é a de estimulação da espermatogénese e por isso, sempre que se verifique uma contagem do número de espermatozoides inferior a 5-10 milhões/mL é recomendado o doseamento da concentração de FSH. Um aumento dos valores de FSH poderá ser indicativo de hipofunção testicular primária. Em ambos os sexos, e à semelhança do que se verifica com a LH, a diminuição dos níveis de FSH está associada ao hipogonadismo hipogonadotrófico (secundário).⁶

Testosterona

A testosterona é a principal hormona androgénica produzida nos testículos pelas células de Leydig e libertada sob regulação da LH. Esta é uma hormona esteróide e por isso, a grande maioria da testosterona circula na corrente sanguínea ligada a proteínas e, apenas cerca de 2 a 3% circula na corrente sanguínea livre. Esta hormona desempenha um papel importante na diferenciação sexual, espermatogénese e na estimulação e manutenção da maturidade dos órgãos sexuais na puberdade. Em homens a partir dos 40 anos a concentração desta hormona vai sofrendo um decréscimo gradual ao longo dos anos, devido a uma diminuição da função testicular e, apesar desta ser uma condição fisiológica, em alguns casos pode estar associada a situações patológicas como o hipogonadismo. A testosterona constitui assim o parâmetro mais utilizado para a identificação desta patologia. O doseamento paralelo da LH deverá ser efetuado para o diagnóstico diferencial de hipogonadismo hipogonadotrófico (diminuição de LH) ou hipergonadotrófico (aumento de LH). Na suspeita de hipogonadismo hipogonadotrófico, em que a alteração ocorre a nível do hipotálamo ou hipófise, a determinação da concentração sérica de prolactina poderá ser útil, uma vez que a prolactinémia poderá ser a causa do hipogonadismo. O hipogonadismo hipergonadotrófico é caracterizado por uma alteração primária das gónadas (testículos), sendo a principal manifestação clínica a disfunção erétil.⁶

Em mulheres os níveis de testosterona são muito inferiores aos encontrados nos homens, no entanto, níveis elevados desta hormona em mulheres poderão estar relacionados com SOP ou tumores ovários.⁶

Cortisol

O cortisol é o principal glucocorticoide sintetizado pela zona fasciculada do córtex adrenal da glândula supra-renal. A libertação de cortisol e o seu consequente aumento é determinado por diversos estímulos como o stress, infeções, gravidez, exercício físico e a hipoglicemia. Estes estímulos atuam a nível hipotalâmico promovendo a síntese e libertação

de hormona libertadora de corticotrofina (CRH, do inglês *Corticotropin Releasing Hormone*), que por sua vez atua na hipófise e estimula a libertação da hormona adrenocorticotrópica (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*). A ACTH atua na supra-renal, através da ligação a recetores do córtex adrenal e estimula a síntese e libertação de cortisol. O mecanismo de libertação desta hormona é também regulado por mecanismos de *feedback* negativo. O cortisol circula na corrente sanguínea maioritariamente ligado à *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG) ou à albumina (mais de 97%) e o restante (cerca de 2 a 3%) circula livre, designado de cortisol livre. As concentrações de cortisol sofrem variações com o ritmo circadiano sendo que se verificam concentrações mais elevadas de manhã e concentrações mais baixas de noite. O stress induz o aumento da libertação de cortisol.⁶

Para avaliação da função hipofisária e adrenal pode-se recorrer a provas de estimulação ou frenação. As provas de estimulação, como é o caso da prova da cosintropina, são executadas para avaliar a capacidade de síntese das glândulas adrenais. A prova da consintropina consiste na administração desta molécula (análoga da ACTH) que, em indivíduos saudáveis, induz o aumento das concentrações de cortisol. A execução desta prova deve ser feita quando se verificam baixas concentrações de cortisol ou na suspeita da Doença de Addison caracterizada pela insuficiência adrenal. As provas de frenação, como é o caso da prova da dexametasona, consistem na administração deste glucocorticoide sendo que em indivíduos saudáveis é esperada uma diminuição das concentrações séricas de cortisol. Uma alteração na prova de frenação poderá ser sugestiva de Síndrome de Cushing (hipercortisolismo) ou de produção ectópica de ACTH tal como se verifica no carcinoma de pequenas células do pulmão.⁶

Hormona Gonadotrofina Coriónica - β hCG

A Hormona Gonadotrofina Coriónica (β hCG, do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*) é uma glicoproteína sintetizada principalmente pelas células da placenta, no entanto quantidades residuais desta hormona podem ser sintetizadas pelas glândulas pituárias em pessoas idosas. A principal função desta hormona é estimular os ovários a produzir progesterona numa fase inicial da gravidez. O doseamento de β hCG é frequentemente determinado para diagnosticar e datar a gravidez uma vez que 8 a 10 semanas após a conceção a concentração da hormona atinge valores máximos.⁶ A determinação sérica dos níveis desta hormona permite detetar a gravidez mais cedo do que os testes de DIG devido a uma maior sensibilidade da técnica. Os testes quantitativos de β hCG permitem ainda relevar deficiências fetais no início da gravidez.⁶

Para além de identificação e datação da gravidez a determinação da concentração de β hCG pode ser usada para avaliar uma gravidez ectópica, detetar a presença de tumores secretores de β hCG ou prever o risco de síndrome de Down ou trissomia 18. Resultados positivos de β hCG, ainda que baixos, podem verificar-se antes e após a menopausa e não estão em nada relacionados com a gravidez.⁶

17 β – Estradiol

O 17 β - estradiol é uma hormona estrogénica produzida nas mulheres pelos ovários e pela placenta durante a gravidez, desempenhando um papel importante no ciclo menstrual. Nos homens esta hormona é sintetizada em pequenas quantidades pelos testículos e pela supra-renal. A grande maioria do estradiol circula na corrente sanguínea ligado a proteínas, como a albumina.⁶

Como a síntese do 17 β - estradiol é feita quase exclusivamente pelos ovários, o seu doseamento é utilizado para avaliar a hiperfunção ovárica seja primária ou secundária, sendo que níveis baixos de estradiol são indicativos de diminuição da função de síntese ovárica (hipofunção ovárica primária) ou a alterações no eixo hipotálamo-hipófise (hipofunção ovárica secundária). Após a menopausa a concentração sérica desta hormona sofre um decréscimo acentuado.⁶

Prolactina

A prolactina é uma hormona sintetizada pela adenohipófise que desempenha como principal função a estimulação da lactação no pós-parto. No entanto, esta hormona desempenha outras funções como o papel importante na manutenção da função do sistema imune e também na síntese de estrogénios pelo ovário. A libertação de prolactina, da mesma forma que todas as hormonas libertadas pela adenohipófise, encontra-se sob controlo hipotalâmico. O hipotálamo liberta a TRH que estimula a hipófise a libertar a prolactina.⁶

O aumento de prolactina, designado de hiperprolactinemia pode ter várias causas sendo a mais frequente a presença de prolactinomas na adenohipófise. Outras causas associadas ao aumento de prolactina são a amenorreia, a galactorreia e a SOP nas mulheres. Nos homens, os valores elevados de prolactina são sugestivos de hipogonadismo ou impotência. Tanto em homens como em mulheres, um excesso de prolactina pode ser devido à toma de determinados fármacos e pode causar infertilidade.⁶

Progesterona

A Progesterona é uma hormona esteróide feminina responsável pela preparação do útero para a implantação do óvulo fecundado e pela manutenção da gravidez, sendo por isso a principal hormona progestacional. A secreção da progesterona advém principalmente do corpo lúteo e da placenta durante a gravidez, embora concentrações residuais possam ser sintetizadas pela supra-renal. A libertação de progesterona ocorre pela estimulação das hormonas hipofisárias LH e da FSH e um aumento da concentração da progesterona induz uma ação inibitória na libertação de hormonas hipofisárias.⁶

A concentração da progesterona é residual durante a fase folicular do ciclo menstrual sofrendo um pico de concentração cerca de 8 dias após a ovulação. Senão ocorrer fertilização e implantação do óvulo a sua concentração sofre um decréscimo gradual, originando a ocorrência da menstruação. Contudo, se ocorrer fecundação e conseqüentemente gravidez, a concentração da progesterona sofre um aumento exponencial, permitindo manter a gestação. A determinação da progesterona é muito utilizada para avaliar a ocorrência da ovulação.⁶

Hormona da Paratiroide (PTH)

A Hormona da Paratiroide (PTH, do inglês *Parathyroid Hormone*) é uma hormona secretada pelas glândulas paratiroideias que atua diretamente no rim e ossos e indiretamente no intestino, através da ação da *1,25-hydroxyvitamin D*, sendo responsável pela regulação do metabolismo ósseo e mineral do cálcio e do fosfato. Baixas concentrações de cálcio (hipocalcemia) induzem a síntese de PTH que atua diretamente no rim promovendo a absorção de cálcio e a secreção de fosfato e induz a síntese de *1,25-hydroxyvitamin D*. Esta por sua vez atua a nível intestinal levando a um aumento da absorção de cálcio e fosfato. Por outro lado, níveis elevados de cálcio atuam nas glândulas paratiroideias induzindo a diminuição da secreção de PTH através de um mecanismo de *feedback* negativo.⁶

A determinação da PTH é útil no diagnóstico diferencial de hipercalcemia e hipocalcemia, para avaliação da função paratiroideia em doentes com insuficiência renal e na avaliação da função paratiroideia em patologias minerais e ósseas. Em doentes com hiperparatiroidismo primário as concentrações de PTH e cálcio encontram-se elevadas o que não se verifica na maioria dos doentes com hipercalcemia não paratiroideias que apresentam concentrações de PTH reduzidas. A principal causa do hiperparatiroidismo primário é a presença de adenomas secretores de PTH. O hiperparatiroidismo secundário está relacionado com um aumento das concentrações de PTH em resposta a baixas concentrações de cálcio

associado a outras causas como doentes com patologia renal crónica e doentes com deficiência em *1,25-hydroxyvitamin D*.⁶

8.3.2.3 Marcadores Tumorais

Antigénio Específico da Próstata Total e Livre (PSA Total e PSA Livre)

Um marcador tumoral é uma substância, que pode ser uma proteína, sintetizada pelo tumor ou sintetizada pelo organismo em resposta à presença do tumor. Os marcadores tumorais são utilizados para diferenciar tecido cancerígeno de tecido saudável ou para detetar a presença de um tumor através de determinações sanguíneas.^{6,40}

O Antigénio Específico da Próstata (PSA, do inglês *Prostate Specific Antigen*) é uma proteína sintetizada pela glândula prostática e também por tecido neoplásico tendo especial utilidade no diagnóstico e deteção de cancro da próstata em homens, permitindo também monitorizar a eficácia do tratamento e o aparecimento de recorrências após o diagnóstico inicial. O PSA circula no sangue maioritariamente ligado a inibidores da protease, denominado de PSA complexado, e o restante circula livre no sangue, que se denomina de PSA livre. A soma do PSA complexado e do PSA livre corresponde ao PSA total, sendo este o parâmetro mais frequentemente determinado.^{6,40}

A quantificação do marcador tumoral permite numa fase inicial classificar os tumores quanto ao seu estadio, uma vez que a concentração de PSA se correlaciona de forma direta com as dimensões tumorais. No entanto, aumentos das concentrações de PSA podem também estar associados à hiperplasia prostática benigna ou a outras condições que afetem a próstata e por isso nem sempre um aumento do PSA total está relacionado com neoplasias. A determinação do PSA livre permite aumentar a sensibilidade e especificidade de deteção do cancro da próstata. Homens com neoplasia prostática geralmente possuem valores de PSA livre menores e valores de PSA total mais elevados.^{6,40}

Antigénio Carcinoembrionário (CEA)

O Antigénio Carcinoembrionário (CEA, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*) é uma glicoproteína sintetizada durante a vida fetal, onde existem concentrações elevadas, ocorrendo um decréscimo para concentrações baixas ou indetetáveis após o nascimento. As glicoproteínas CEA e AFP são designadas de antigénios oncofetais. Em adultos saudáveis as concentrações destes antigénios oncofetais são mínimas e residuais e um aumento da sua concentração sérica está associado com o aparecimento de neoplasias, devido à reativação de

determinados genes como resultado de alterações celulares. O CEA é designado de carcinoembrionário uma vez que foi encontrado no tecido embrionário.^{6,40}

Este marcador é utilizado principalmente no diagnóstico de carcinomas colorretais, verificando-se concentrações 5 a 10 vezes superiores ao intervalo de referência, apresentando uma correlação direta entre a concentração de CEA e o estadió da doença. Apesar de utilizado principalmente para a deteção de carcinomas do cólon e do reto, o CEA encontra-se elevado em carcinomas gastrointestinais, pulmonares, mamários, pancreáticos e carcinomas do ovário e útero. Nos carcinomas de pequenas células do pulmão mais de 65% dos pacientes apresentam níveis de CEA elevados e nos doentes com cancro da mama níveis elevados de CEA estão associados à presença de metástases. No entanto, a concentração sérica deste marcador pode estar aumentada em patologias benignas como a cirrose, o enfisema pulmonar e a colite ulcerosa.⁶

CA 125

O CA 125 é um marcador utilizado para o diagnóstico e monitorização da terapêutica do cancro do ovário. Apesar deste marcador estar frequentemente associado ao cancro do ovário, a sua concentração encontra-se elevada em carcinomas do endométrio, pancreáticos, pulmonares, mamários, colorretais e gastrointestinais, apresentando uma concentração de CA 125 com uma correlação direta com o tamanho do tumor e o estadió da doença. Diversas condições benignas estão associadas a um aumento da concentração deste marcador como a cirrose, a hepatite, a endometriose e a pericardite, e situações fisiológicas como a fase folicular do ciclo menstrual e a gravidez. Na prática clínica, a determinação deste marcador é frequentemente utilizada para avaliar a resposta à terapêutica sendo que, valores elevados de CA 125 após quimioterapia são sugestivos de mau prognóstico.^{6,40}

CA 19.9

O CA 19.9 é um antígeno carbohidrato sintetizado pelas células pancreáticas e dos ductos biliares, gástricas, do cólon, endometriais e pelas células do epitélio salivar. É um marcador utilizado para diagnóstico e avaliação de tumores gastrointestinais e pancreáticos.⁶

Apesar do aumento da concentração deste marcador estar especialmente associado ao cancro pancreático, um aumento também se verifica em cancros gástricos, colorretais e hepáticos. A concentração do CA 19.9 correlaciona-se de forma direta com o tamanho e estadió do tumor.⁶

Alfa Fetoproteína (AFP)

A Alfa Fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína que, à semelhança do CEA faz parte do grupo dos antígenos oncofetais. Como referido anteriormente, estas são proteínas sintetizadas durante o desenvolvimento fetal e por isso existem em grandes quantidades durante o desenvolvimento fetal sendo que, a sua concentração diminui ou desaparece após o nascimento. Concentrações máximas de AFP ocorrem às 9 semanas de gestação. Um aumento dos níveis séricos desta glicoproteína permite detetar anormalidades fetais, como defeitos no tubo neural através da análise sanguínea em mulheres grávidas. Ao invés, valores de AFP em mulheres grávidas abaixo dos valores expectáveis podem indicar a presença de Síndrome de Down e Trissomia do 18. Em homens e mulheres não grávidas este marcador pode ser utilizado para deteção de vários tipos de cancro, tal como o carcinoma hepatocelular. No entanto, nem sempre está associada a patologias cancerígenas e a AFP pode encontrar-se elevada na corrente sanguínea quando associada a patologias como a hepatite e a cirrose. A AFP tem uma vida média de 5 dias e por isso, a sua determinação é útil na monitorização da terapêutica e na avaliação da efetividade da quimioterapia no tratamento do carcinoma hepatocelular.^{6,40}

Em adultos saudáveis, a sua concentração sérica é inferior a 10 µgramas/L.⁶

8.3.2.4 Vitaminas

Vitamina B12

A Vitamina B12 ou cianocobalamina é uma vitamina solúvel que possui um papel importante na hematopoiese, nomeadamente na maturação dos eritrócitos. A vitamina B12 advém exclusivamente da alimentação, nomeadamente da carne, peixe e marisco, sendo a sua absorção feita no intestino através de um processo complexo que envolve o fator intrínseco (IF, do inglês *Intrinsic Factor*). Após a absorção, a grande maioria desta vitamina é armazenada no fígado de onde vai sendo libertada mediante as necessidades fisiológicas. A deficiência da concentração desta vitamina está associada à anemia megaloblástica. No entanto, são diversas as causas associadas a deficiência de vitamina B12 nomeadamente neuropatias, doença inflamatória do intestino e infeção pelo HIV. A causa mais comum da deficiência de vitamina B12 é a anemia perniciosa, uma doença autoimune que provoca a diminuição da síntese IF pelas células parietais do estômago. Os efeitos hematológicos provocados por esta deficiência incluem anemia, neutrófilos hipersegmentados, macrocitose, leucopenia e trombocitopenia,

sendo todos estes reversíveis pela ingestão desta vitamina. Doentes sujeitos a gastrectomias ou remoção do íleo podem também desenvolver deficiência de vitamina B12.⁶

O intervalo de referência para a Vitamina B12 é superior a 200 ng/L, sendo valores inferiores considerados como deficiência desta vitamina.⁶

Ácido Fólico

O Ácido Fólico ou folato é uma vitamina que funciona como coenzima de diversas reações de transferência de unidades de carbono. A principal fonte desta vitamina é a alimentação nomeadamente através da ingestão de alimentos como fígado, espinafres e vegetais. O ácido fólico, tal como a vitamina B12, é um componente essencial na síntese de DNA e por isso, deficiências deste composto estão relacionadas com anemias macrocíticas com uma maturação anormal dos precursores eritroides. A principal manifestação da deficiência em ácido fólico é a anemia megaloblástica, caracterizada pela presença de eritrócitos de tamanho superior ao normal e nucleados na medula óssea. No entanto, a deficiência deste composto pode ter inúmeras causas como uma absorção intestinal deficiente, que acontece na doença celíaca, deficiência na ingestão de ácido fólico como se verifica em doentes com alcoolismo crónico ou um aumento nas necessidades deste como acontece na gravidez, doença hepática ou processos cancerígenos. Na gravidez existe uma necessidade superior de ácido fólico devido a um aumento na síntese de DNA sendo que, concentrações de ácido fólico reduzidas na gravidez aumentam o risco de desenvolvimento de patologias fetais tais como defeitos de formação do tubo neural.⁶

O intervalo de referência varia entre 2,6 a 12,2 µg/L. Valores abaixo de 1,4 µg/L são considerados como deficiência em ácido fólico.⁶

8.3.2.5 Proteína C Reativa Ultra Sensível

A Proteína C Reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda positiva sintetizada pelo fígado, que tem como principal função conferir proteção contra microrganismos externos ao homem e ajudar na eliminação desses microrganismos. A deteção de PCR em quantidades extremamente baixas designa-se por Proteína C Reativa ultra sensível (hsPCR do inglês *High Sensitivity Proteína C Reativa*), sendo para isso necessário o uso de técnicas com uma elevada sensibilidade e com um baixo limite de deteção como é o caso dos CLIA. A concentração sérica da PCR aumenta exponencialmente ao longo do tempo atingindo um pico cerca de 48 horas após o estímulo inicial. A determinação da hsPCR é frequentemente utilizada para avaliar a presença de infeções e processos inflamatórios, podendo também ser utilizada como

biomarcador cardíaco. O doseamento desta proteína permite avaliar a presença de processos ateroscleróticos e conseqüentemente de doença cardiovascular, sendo também um forte indicador da ocorrência de enfarte agudo do miocárdio. Para além da sua utilidade na deteção de patologias cardiovasculares é também útil na monitorização da atividade de doenças como a artrite reumatóide e da doença de Crohn.⁶

8.3.2.6 IgE Total

A IgE é uma imunoglobulina sintetizada após o contacto com antígenos, designados por alérgenos. Após o contacto com o alérgeno é induzida a síntese de IgE e esta imunoglobulina liga-se a recetores presentes na superfície dos mastócitos e basófilos processo este designado de sensibilização. Num segundo contacto com o alérgeno este liga-se à IgE presente na superfície dos mastócitos e basófilos originando a sua desgranulação com conseqüente libertação de histamina e outras moléculas biologicamente ativas que induzem as manifestações clínicas desde as mais localizadas como a asma, rinite alérgica, dermatite atópica e alergias alimentares até à anafilaxia sistémica. Por isso, a determinação da IgE total no soro é um parâmetro útil para avaliar reações de hipersensibilidade do tipo I como a asma e a alergia. Nas reações alérgicas verifica-se um aumento da concentração de IgE total mas também no eczema atópico, asma, e parasitoses por helmintas. Em fumadores, a concentração desta é geralmente superior em comparação com indivíduos saudáveis.^{6,19}

8.3.2.7 Anticorpos Anti - Tiroideus (Anti - Peroxidase e Anti - Tiroglobulina)

Os anticorpos Anti - Peroxidase (TPO Ab, do inglês *Thyroperoxidase Autoantibodies*) e anticorpos Anti - Tiroglobulina (TG Ab, do inglês *Thyroglobulin Autoantibodies*) são utilizados para avaliação de patologias autoimunes da tiroide nomeadamente a Tiroidite de Hashimoto e Doença de Graves. No entanto, a presença de TPO Ab e TG Ab não permite a distinção das duas patologias. A presença destes anticorpos no soro é suficiente para efetuar o diagnóstico de Tiroidite de Hashimoto, uma condição que se caracteriza pela diminuição da função tiroideia e conseqüentemente diminuição da síntese de hormonas tiroideias como FT4, T4, FT3 e T3 como resultado da síntese de anticorpos que atacam e destroem as células da tiroide. A Tiroidite de Hashimoto é a principal causa de hipotiroidismo primário. Os doentes com Doença de Graves, apresentam um hipertiroidismo em que, além da presença TPO Ab e TG Ab existe também em circulação anticorpos anti-recetor da TSH que não se encontram em doentes com Tiroidite de Hashimoto o que permite a distinção das duas patologias.⁶

9. CONCLUSÃO

A realização de um estágio curricular num laboratório de análises clínicas é parte integrante do plano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tendo este decorrido no SYNLABHEALTH ALENTEJO SA, na cidade de Évora.

A realização deste estágio profissional em contexto real, é uma etapa essencial para os alunos que frequentam este mestrado, contribuindo para o desenvolvimento de capacidades e competências laboratoriais e de relacionamento interpessoal, aliando a aplicação dos conhecimentos teóricos à prática laboratorial e permitindo a inicialização no mercado de trabalho.

Durante os meses de estágio tive a oportunidade de integrar a equipa de trabalho e participar na rotina laboratorial o que me permitiu não só aplicar os conhecimentos adquiridos nas componentes teóricas e práticas das unidades curriculares deste ciclo de estudos, mas também adquirir inúmeros conhecimentos relativos à prática clínica laboratorial como a manutenção de equipamentos, processamento de amostras, controlo de qualidade e capacidade de resposta a situações inesperadas.

De realçar ainda que a conclusão de um estágio bem sucedido não se deve apenas a todos os fatores referidos anteriormente, mas também, e acima de tudo, à componente interpessoal. Este foi sem dúvida um fator essencial para o sucesso deste estágio em que a disponibilidade, compreensão, simpatia e amabilidade de todos os colaboradores e funcionários deste laboratório foram o aspeto chave de todo este processo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kinns, H., Pitkin, S., Housley, D., & Freedman, D. B. (2013). **Internal quality control: best practice**. *Journal of Clinical Pathology*, 66(12), 1027- 1032.
2. Despacho n^o 10009/2019 de 5 de novembro.
3. Keohane, E.M., Smith, L.J., Walenga, J.M., (2016). **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 5th edition. USA, Elsevier Saunders.
4. Lazarovits, James & Chen, Yih & Sykes, Edward & Chan, Warren. (2014). **Nanoparticle-Blood Interaction: The Implications on Solid Tumour Targeting**. *Chem. Commun.* 51.
5. Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2017). **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7th Edition, W.H. Freeman and Company. ISBN-13: 978-1-4641-0962-1
6. Burtis, C., Bruns, D., (2015). **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 7th edition. USA, Saunders Elsevier.
7. Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., (2013). **Essencial Haematology**. 6th edition Wiley-Blackwell.
8. Oshiro, I., Takenaka, T., & Maeda, J. (1982). **New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS)**. *Clinical Biochemistry*, 15(2), 83–88.
9. Arneth, B. M., & Menschikowki, M. (2014). **Technology and New Fluorescence Flow Cytometry Parameters in Hematological Analyzers**. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 29(3), 175–183.
10. Kim, H., Hur, M., Choi, S.G., Oh, K.M., Moon, H.W., Yun, Y.M., (2015). **Comparison of White blood cell counts by WNR, WDF, and WPC channels in Sysmex XN hematology analyzer**. *International Journal of Laboratory Hematology*. 37, 869-875.
11. Cerutti, H., Muzzi, C., Leoncini, R., Scapellato, C., Cortelazzo, A., Furlani, E., & Guerranti, R. (2011). **Erythrocyte Sedimentation Rate measurement by VES Matic Cube 80 in relation to inflammation plasma proteins**. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25(3), 198–202
12. Bain, B.J., (2015). **Blood Cells: A Practical Guide**. 5th. edition. New Jersey, Wiley Blackwell.

13. Bain, B., Bates, I., Laffan, M., Lewis, S., (2011). ***Dacie and Lewis Practical Haematology***. 11th edition. USA, Elsevier.
14. Kundrapu, S., & Noguez, J. (2018). ***Laboratory Assessment of Anemia***. *Advances in Clinical Chemistry*, 197–225.
15. Wahed, A., & Dasgupta, A. (2015). ***Complete Blood Count and Peripheral Smear Examination***. *Hematology and Coagulation*, 1-14.
16. Schmoeller, D., Picarelli, M. M., Paz Munhoz, T., Poli de Figueiredo, C. E., & Staub, H. L. (2017). ***Mean Platelet Volume and Immature Platelet Fraction in Autoimmune Disorders***. *Frontiers in Medicine*, 4.
17. Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M.-F., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., ... Michiels, J.-F. (2015). ***Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa: revue de la littérature et apport de l'assurance qualité***. *Annales de Pathologie*, 35(4), 294–305.
18. Delves. P., Martin. S., Burton. D., Roitt. I. (2013). ***Roitt's Essencial Immunology***. 12 edition. Blackwell.
19. Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B., Kuby, J. and Kuby, J., (2007). ***Kuby Immunology***. 6th edition. W.H. Freeman. New York.
20. Frontmatter. (2009). In J. Zabriskie (Ed.), ***Essential Clinical Immunology*** (pp. I-IV). Cambridge: Cambridge University Press.
21. Clarke, W., Sokoll, L. J., & Rai, A. J. (2020). ***Immunoassays***. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 201–214.
22. Babson, A. L. (2013). ***IMMULITE® and IMMULITE 1000***. *The Immunoassay Handbook*, 571–574.
23. Babson, A. L. (2013). ***IMMULITE® 2000 and IMMULITE 2000 XPI***. *The Immunoassay Handbook*, 575–578.
24. Metzgar, J. (2013). ***ADVIA Centaur® XP***. *The Immunoassay Handbook*, 567–570.
25. Natrajan, A., Sharpe, D., Costello, J., & Jiang, Q. (2010). ***Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output***. *Analytical Biochemistry*, 406(2), 204–213.

26. Weeks, I., Kricka, L. J., & Wild, D. (2013). **Signal Generation and Detection Systems (Excluding Homogeneous Assays)**. *The Immunoassay Handbook*, 267–285.
27. Davies, C. (2013). **Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA) I**. *The Immunoassay Handbook*, 29–59.
28. Laze, Blerta & Lugaj, Arta. (2017). **Evaluation of an electrochemiluminescence immunoassay and an enzyme-linked fluorescent assay for detection of anti-cytomegalovirus IgM and anti-toxoplasma IgM antibodies in pregnant women.**
29. Mahon. C., Lehman. D., Manuselis. G. (2015). **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5th edition. Elsevier Inc.
30. Henao-Martinez, A. F., & Johnson, S. C. (2013). **Diagnostic tests for syphilis: New tests and new algorithms**. *Neurology: Clinical Practice*, 4(2), 114–122.
31. Dean L. (2005). **Blood Groups and Red Cell Antigens**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
32. Mujahid, A., & Dickert, F. (2015). **Blood Group Typing: From Classical Strategies to the Application of Synthetic Antibodies Generated by Molecular Imprinting**. *Sensors*, 16(1), 51.
33. Lapiere, Y., Rigal, D., Adam, J., Josef, D., Meyer, F., Greber, S., & Drot, C. (1990). **The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions**. *Transfusion*, 30(2), 109–113
34. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. (2001) **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th edition. New York: Garland Science;. Appendix I. Immunologists' Toolbox.
35. Zuckerman, A., Banatvala, J., Pattison J., Griffiths, P. and Schoub, B. (2004). **Principles and Practice of Clinical Virology**. 5th edition. John Wiley & Sons Ltd
36. Lazzarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, M., & Landini, M. P. (2011). **Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy**. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1285–1293.
37. Trépo, C., Chan, H. L. Y., & Lok, A. (2014). **Hepatitis B virus infection**. *The Lancet*, 384(9959), 2053–2063.

38. Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (2014). **Sherris Medical Microbiology**. New York: McGraw Hill Medical.
39. Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Evengård, B., Álvarez-Martinez, M. J., Petersen, E., Kortbeek, L. M., ... Pelloux, H. (2020). **Toxoplasma gondii-specific IgG avidity testing in pregnant women**. *Clinical Microbiology and Infection*.
40. Longo, D. (2013). **Harrison's Hematology and Oncology**. McGraw-Hill Companies, Inc.: New York.
41. Provan, D. (2018). **ABC of Clinical Haematology**. 4th Edition. Wiley Blackwell
42. Benner E.J. (1970). **Simple disposable method for quantitative cultures of urine**. *Applied Microbiol.*, Vol. 19, p. 409-412.
43. Murray P.R., (1995). Baron E.J., Pfaller M.A. and al. **Manual of Clinical Microbiology - 6th Ed.**- ASM Press,
44. Jung B, Hoilat GJ. (2021) **MacConkey Medium**. StatPearls Publishing.
45. Chapman G.H. (1945) **The significance of sodium chloride in studies of staphylococci** - *J. Bact.*, vol. 50, p. 201-203.
46. Martiny, D., Dediste, A., Anglade, C., Vlaes, L., Moens, C., Mohamed, S., & Vandenberg, O. (2016). **Performance of the chromID Salmonella Elite chromogenic agar in comparison with CHROMagar™ Salmonella , Oxoid™ Brilliance™ Salmonella and Hektoen agars for the isolation of Salmonella from stool specimens**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(2), 128–130.
47. J.E.L. Corry et al. (2003). **Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar**. *Progress in Industrial Microbiology*, 632–634.
48. LEIFSON E. (1936). **New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli** - *A. J. Hygiène*, vol. 24, p. 423-432.
49. Morita, T., Feng, D., Kamio, Y., Kanno, I., Somaya, T., Imai, K., ... Miyauchi, A. (2014). **Evaluation of chromID strepto B as a screening media for Streptococcus agalactiae**.
50. Baker C.J, Clark D.J., Barrett F.F. (1973). **Selective broth medium for isolation of group B streptococci**. – *Appl. Microbiol.*, vol. 26, n°6, p. 884-885.

ANEXO A

Tabela VI - Meios de Cultura utilizados para Inoculação de Amostras de Urina. ⁴²

MEIO	MICROORGANISMOS	COLÓNIAS
Cistina, Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED)	Isolamento de microrganismos do trato urinário	Colónias amarelas ou amarelas pálidas – Bactérias fermentadoras de lactose
		Colónias verdes, azuis ou incolores – Bactérias não fermentadoras de lactose

Tabela VII - Meios de Cultura utilizados para Inoculação de Amostras de Fezes. ^{43,44,45,46,47,48}

MEIO	MICROORGANISMOS	COLÓNIAS
Gelose Campyosel	Isolamento seletivo de <i>Campylobacter spp</i> (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>)	Colónias pequenas e acinzentadas - <i>Campylobacter spp</i>
Gelose Mac Conkey	Isolamento seletivo de enterobactérias e <i>Escherichia coli</i>	Colónias cor-de-rosa a vermelho - Bactérias fermentadoras de lactose
		Colónias incolores ou bege - Bactérias não fermentadoras de lactose
Gelose Chapman	Isolamento seletivo de <i>Staphylococcus spp</i>	Colónias amarelas - Bactérias que fermentadoras de manitol
Gelose chromID Salmonella Ellite	Isolamento seletivo de <i>Salmonella spp</i>	Colónias malva pálida ou malva - Bactérias fermentadoras de lactose
		Colónias de outras colorações - Bactérias não fermentadoras de lactose
Gelose XLD	Isolamento seletivo de <i>Salmonella spp</i> e <i>Shigella spp</i>	Colónias vermelhas - Bactérias que possuem descarboxilase
		Colónias com centro negro - Bactérias que produzem H ₂ S
		Colónias amarelo ou laranja - Bactérias fermentadoras de Xilose, Lactose ou Sacarose
Caldo Selenito F	Meio de Enriquecimento de <i>Salmonella spp</i> a partir das fezes	Colónias rosa ou vermelho – Bactérias não fermentadoras de Xilose, Lactose ou Sacarose
		*

* Após enriquecimento é realizada a repicagem do Caldo Selenito F para a Gelose XLD e Gelose chromID Salmonella Ellite.

Tabela VIII - Meios de cultura utilizados para inoculação de exsudatos, amostras de pus e expetoração. ^{43,49,50}

MEIO	MICROORGANISMOS	COLÓNIAS	AMOSTRA BIOLÓGICA
Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS)	Meio para crescimento de microrganismos exigentes (<i>Streptococcus spp</i> , <i>Listeria</i> , entre outros)	Zona esverdeada à volta da colónia – α hemólise Zona clara à volta da colónia – β hemólise	Exsudato vaginal, vaginal e anal, uretral, faríngeo, nasal, auricular, pus e expetoração
Gelose chromID Strepto B (STRB)	Isolamento seletivo de <i>Streptococcus</i> do grupo B (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	Colónias rosa-pálido a vermelho	Exsudato vaginal, vaginal e anal, uretral
Gelose Chocolate Haemophilus (HAE)	Isolamento seletivo de <i>Haemophilus spp</i>	Colónias opacas acinzentadas	Exsudato uretral, nasal, auricular, pus e expetoração
Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	Isolamento seletivo de bactérias do género <i>Neisseria</i> , <i>spp</i> e <i>Haemophilus spp</i> e de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colónias transparentes	Exsudato vaginal e anal, uretral, faríngeo e pus
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)	Isolamento seletivo de Leveduras e Bolores	*	Exsudato vaginal, uretral, faríngeo, nasal, auricular, pus e expetoração
Caldo Coração – Cérebro (BHI-T)	Crescimento de microrganismos aeróbios exigentes	**	Exsudato faríngeo, nasal, auricular, pus
Caldo TODD – Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Streptococcus</i> do grupo B e <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	***	Exsudato vaginal, vaginal e anal, uretral

* Realizada a prova da filamentação (+) para identificação de *Candida albicans*. A identificação dos restantes microrganismos é realizada pelo equipamento VITEK® 2 Compact.

** Após enriquecimento é realizada a repicagem do Caldo Coração - Cérebro para Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS).

*** Após enriquecimento é realizada a repicagem do Caldo TODD – Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) para Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS).

Nota: A identificação definitiva da espécie bacteriana responsável pela infeção é realizada pelo equipamento automatizado VITEK® 2 Compact, com exceção da identificação de *Staphylococcus aureus* que é identificado com recurso às provas da coagulase (+) e catalase (+).

ANEXO B

Caso Clínico

Os valores em seguida apresentados são referentes a um homem de 55 anos.

Tabela IX – Resultados Analíticos do Hemograma do utente.

	<i>Resultado</i>	<i>Intervalo de Referência</i>
Hemograma		
<i>Eritrócitos</i>	4,85 × 10 ¹² /L	4,50 – 5,90 × 10 ¹² /L
<i>Hemoglobina</i>	9,3 g/dL	13,5 – 17,5
<i>Hematócrito</i>	31,9 %	41 – 53
<i>VCM</i>	66 fL	80 – 100
<i>HCM</i>	19 pg	26 – 34
<i>CHCM</i>	29 g/dL	32 – 36
<i>RDW</i>	21,7 %	11,6 – 14,0 %
<i>Leucócitos</i>	5,44 × 10 ⁹ /L	4,00 – 10,00
<i>Neutrófilos</i>	2,34 × 10 ⁹ /L	1,8 – 7,0
<i>Eosinófilos</i>	0,07 × 10 ⁹ /L	< 0,5
<i>Basófilos</i>	0,04 × 10 ⁹ /L	< 0,1
<i>Linfócitos</i>	2,1 × 10 ⁹ /L	1,00 – 4,00
<i>Monócitos</i>	0,89 × 10 ⁹ /L	0,2 – 1,00
<i>Plaquetas</i>	251 × 10 ⁹ /L	150 – 400

Verifica-se que este utente possui uma concentração de hemoglobina bastante reduzida indicativa de uma anemia grave. Para além disso, o valor do hematócrito também se encontra bastante reduzido sendo compatível com a patologia anémica que o utente apresenta. Analisando os índices eritrocitários conclui-se que esta é uma anemia microcítica (VCM diminuído) e hipocrómica (HCM reduzido). A causa mais frequente de anemia microcítica e hipocrómica é a deficiência em ferro no entanto outras causas são possíveis como anemia devido a doença crónica ou síndromes talassémicas.⁴¹ O valor do RDW encontra-se bastante aumentado o que permite excluir a hipótese de síndrome talassémica, uma vez que nestas condições o valor do RDW é frequentemente normal ou diminuído. Para além disso, na eletroforese de hemoglobinas não se observam alterações, o que permite descartar, mais uma vez, a hipótese de síndromes talassémicas. Um valor aumentado do RDW é sugestivo de anemia por deficiência em ferro. Os parâmetros referentes às populações leucocitária e plaquetária não apresentam alterações.

Para avaliar a causa da anemia foram efetuados os doseamentos do ferro, ferritina e transferrina:

Tabela X – Resultados Analíticos do Doseamento de Ferro, Ferritina e Transferrina do utente.

	<i>Resultado</i>	<i>Intervalo de Referência</i>
<i>Ferro</i>	12 µg/dL	65 - 175
<i>Ferritina</i>	4,2 µg/L	20 - 250
<i>Transferrina</i>	412 mg/dL	215 - 365

Verifica-se que este utente apresenta uma concentração extremamente baixa de ferro (12 µg/dL) e de ferritina (4,2 µg/dL). A determinação da concentração de ferro sérico permite analisar o ferro disponível no organismo que neste utente se encontra bastante reduzido estando de acordo com a hipótese de anemia por deficiência em ferro.

A determinação da concentração de ferritina permite uma análise do ferro armazenado uma vez que todo o ferro em excesso no organismo encontra-se armazenado ligado a esta proteína intracelular. A diminuição acentuada da concentração de ferritina indica que as reservas de ferro também se encontram bastante reduzidas o que está de acordo com a hipótese de anemia por deficiência em ferro. Para além disso, a diminuição da ferritina permite ainda descartar a hipótese de anemia da doença crónica uma vez que a ferritina é uma proteína de fase aguda positiva.^{6,41}

A concentração de transferrina encontra-se bastante aumentada (412 mg/dL) o que também está de acordo com a hipótese de anemia por deficiência em ferro. Esta proteína tem como finalidade o transporte do ferro absorvido até à medula óssea para síntese de hemoglobina. A diminuição do ferro sérico induz o aumento da transferrina para possibilitar o aumento da absorção de ferro a nível intestinal de forma a normalizar a concentração de ferro sérica e por esse motivo se verifica um aumento da concentração de transferrina.^{6,41}

Verifica-se então que todos os parâmetros são concordantes com uma anemia por deficiência em ferro.

ANEXO C

Caso Clínico

Mulher de 37 anos grávida de 10 semanas faz análises previstas no acompanhamento pré-natal que incluem, para além de outras, as determinações presentes na tabela seguinte:

Tabela XI – Resultados Analíticos dos Parâmetros Imunológicos da utente.

	Resultado	Intervalo de Referência
HIV (Ag p24 + Ac HIV1/2)	Negativo	---
Hepatite B, Ag HBs	Negativo	---
Hepatite C, Ac anti-HCV	Negativo	---
Ac anti-Toxoplasma gondii IgG	Positivo (27,6 UI/mL)	Positivo > 8,0
Ac anti-Toxoplasma gondii IgM	Positivo (>10)	Positivo > 1,1
Ac anti-vírus da Rubéola IgG	Positivo (75,3 UI/mL)	Positivo > 10
Ac anti-vírus da Rubéola IgM	Negativo (0,71)	Positivo > 1,1
Ac anti-Citomegalovirus IgG	Negativo (0,25)	Positivo > 1,1
Ac anti-Citomegalovirus IgM	Negativo (0,35)	Positivo > 1,1

A presença de anticorpos anti-vírus da Rubéola IgG e a ausência de anticorpos IgM é indicativa da ocorrência de uma infeção no passado que confere à utente imunidade ao vírus da rubéola. Os anticorpos anti-Citomegalovirus IgG e IgM são negativos e por isso indicativos de que esta utente nunca teve contacto com o vírus, não apresentando infeção aguda nem imunidade para o Citomegalovirus. Por outro lado, os anticorpos anti-Toxoplasma gondii IgG e IgM são ambos positivos e por isso indicativos de uma infeção relativamente recente. Devido ao resultado IgG positivo foi realizado o teste de avidéz do anticorpo IgG que determina a força de ligação entre o antígeno e este anticorpo e permite efetuar uma datação relativa da primoinfeção.

Tabela XII – Resultados Analíticos do Teste da Avidéz da utente.

	Resultado	Intervalo de Referência
Avidéz do Anticorpo anti-Toxoplasma gondii IgG	67,8%	Avidéz fraca < 50 Avidéz intermédia 50 – 59,9 Avidéz forte > 60,0

A avidéz do anticorpo anti-*Toxoplasma gondii* IgG foi de 67,8% indicativa de uma avidéz forte, sugerindo assim que a primo-infeção ocorreu à mais de 4 meses. Uma vez que a utente está grávida de 10 semanas, a avidéz forte é sugestiva de que a primo-infeção ocorreu antes da conceção e por isso representativa de baixo perigo de transmissão da infeção ao feto não sendo necessária a administração de qualquer tratamento.³⁹