



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nelson João Carneiro Ventura

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e pela Professora
Doutora Ana Miguel Duarte Santos Silva e apresentado à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

NELSON JOÃO CARNEIRO VENTURA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e pela Professora Ana Miguel Duarte Santos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Realizado na Unidade Local de Saúde da Guarda

Setembro de 2022

Índice

I - INTRODUÇÃO	1
II – O SERVIÇO DE PATOLOGIA CLINICA DO HOSPITAL SOUSA MARTINS	1
III – HEMATOLOGIA	2
3.1 - Caracterização do Laboratório de Hematologia.....	2
3.2 - Amostras.....	2
3.3 - Hemograma	2
3.3.1 - Parâmetros que definem o hemograma	3
3.3.2 - Autoanalisador Sysmex XE 5000.....	3
3.3.2.1 - Citometria de fluxo com fluorescência:	4
3.3.2.2 - Impedância e Foco hidrodinâmico:.....	5
3.3.2.3 - Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS):	6
3.3.3 - Parâmetros de avaliação eritrocitária.....	7
3.3.3.1 - Concentração da hemoglobina:.....	7
3.3.3.2 - Contagem de eritrócitos:	7
3.3.3.3 - Hematócrito:	7
3.3.3.4 - Índices hematimétricos.....	7
3.3.3.5 - Interferências nos parâmetros eritrocitários	8
3.3.4 - Parâmetros de avaliação leucocitária	9
3.3.4.1 - Contagem total de leucócitos:.....	9
3.3.4.2 - Fórmula diferencial leucocitária:	9
3.3.4.3 - Granulócitos imaturos:	10
3.3.4.4 - Interferências nos parâmetros leucocitários.....	10
3.3.5 - Parâmetros de avaliação das plaquetas.....	10
3.3.5.1 - Contagem de Plaquetas:	10
3.3.5.2 - Interferências nos parâmetros plaquetários.....	11
3.3.5.3 - Volume plaquetário médio (MPV).....	11
3.3.5.4 - Fração de plaquetas imaturas (IPF) –.....	12
3.3.5.5 - Contagem de PLT pelo método ótico (PLT-O)	12
3.4 - Esfregaço de sangue periférico.....	13
3.4.1 - Coloração de May-Grünwald-Giemsa	15
3.4.2 - Avaliação da série vermelha.....	15
3.4.2.1 - Tamanho	16
3.4.2.2 - Forma.....	17
3.4.2.3– Cor	19
3.4.2.4 - Inclusões eritrocitárias.....	19
3.4.2.5 - Alterações na distribuição.....	20
3.4.3 - Avaliação leucocitária.....	21
3.4.3.1 - Alterações morfológicas dos leucócitos.....	22
3.5 - Estudo laboratorial das anemias	24
3.5.1 - Classificação das anemias	25
3.5.2 - Diagnóstico diferencial laboratorial.....	26
3.6 - Estudo das hemoglobinopatias	28

3.6.1 - Diagnóstico laboratorial.....	29
3.6.2 - Doseamento da hemoglobina glicosilada	30
3.7- Estudo da coagulação.....	32
3.7.1 - Hemostase	32
3.7.2 - ACL TOP 500.....	33
3.7.3 - Testes de Coagulação de rotina.....	34
3.7.3.1 - Tempo de Protrombina (PT).....	34
3.7.3.2 - Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT).....	35
3.7.3.3 - O tempo de trombina (TT)	35
3.7.3.4 - Fibrinogénio C	35
3.7.3.5 - Doseamento de D-Dímeros.....	36
3.7.4 - Estudo da trombofilia	36
3.7.4.1 - Parâmetros realizados no estudo da trombofilia	37
3.8 - Velocidade de sedimentação	38
3.8.1 - VES MATIC CUB80 DIESSE	38
3.9 – Controlo de qualidade.....	39
3.9.1 - Controlo de Qualidade Interno.....	39
3.9.2 – Controlo de qualidade externo.....	39
IV – IMUNOLOGIA	40
4.1 - Caracterização do Laboratório de Imunologia	40
4.2 - Equipamentos e metodologias	40
4.2.1 - ELISA	41
4.2.2 - Imunofluorescência Indireta (IFI)	41
4.2.3 – Imunoblots	42
4.2.4 - Quimioluminescência	42
4.2.5 - Ensaio fluoroenzimáticos (FEIA).....	43
4.3 - Doenças autoimunes.....	44
4.3.1 - Doenças autoimunes sistémicas.....	44
4.3.1.1 - Anticorpos Anti Nucleares (ANA).....	45
4.3.1.2 - Anticorpos anti-dsDNA	48
4.3.1.3 - Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)	49
4.3.1.4 - Anticorpos anti-fator reumatoide e anti-peptídeo citrulinado	50
4.3.1.5 - Anticorpos anti-cardiolipina e anti-β2-Glicoproteínas.....	52
4.3.2 - Doenças hepáticas Autoimunes	53
4.3.3 - Doença celíaca.....	54
4.3.4 - Gastrite autoimune e anemia perniciosa	56
4.3.5 - Doenças inflamatórias intestinais.....	56
4.4 - Alergologia.....	57
4.4.1- Diagnóstico laboratorial.....	58
4.4.1.1 - Quantificação de IgE total	58
4.4.1.2 - Quantificação de IgE específica	58
4.5 - Controlo de qualidade.....	59
4.5.1 - Controlo de Qualidade Interno.....	59
4.5.2 - Controlo de qualidade externo.....	59

V – BIOQUÍMICA.....	60
VI – MICROBIOLOGIA	61
6.1- Laboratório de Microbiologia.....	61
6.2 - Laboratório de Micobacteriologia	64
VII – CONCLUSÃO	65
VI - BIBLIOGRAFIA.....	66

Lista de Abreviaturas

ACL – anticorpos anti-cardiolipinas

AGH - anti globulina Humana

AMA - anticorpos anti-mitocondriais

ANA - anticorpos anti-nucleares

ANCA - anticorpos anti-citoplasma-dos-neutrófilos

Anti-LCI – anticorpos-anti-citosol-do-fígado-tipo-I

APTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

ASCA - anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*

ATIII – Antitrombina III

CCP- anticorpos anti-peptídeo-citrulinado-cíclico

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DAI - doenças autoimunes

DGS – Direção Geral de Saúde

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DPG - anticorpos anti-gliadina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMA - anticorpos anti-endomísio

ESP - Esfregaço de Sangue Periférico

FEIA - ensaios fluoroenzimáticos

FIB – Fibrinogénio

FR - fator reumatoide

FS – Foward-scattered

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HCT - Hematocrito

HGB – Hemoglobina

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

ICSH - International Council for Standardization in Haematology

ICTH - Comité Internacional sobre Trombose e Hemostase

IFI - Imunofluorescência Indireta

IPF – Fração de Plaquetas Imaturas

IRF – Fração de Reticulócitos Imaturos

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

LFL - Lateral Fluorescence Light

LKM-I - anticorpos anti-microsomas-do-fígado-tipo-I

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

LS – *Light-scattered*

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média

MPO - anticorpos anti-mieloperoxidase

NRBC - Eritroblastos

OMS – Organização Mundial de Saúde

PC – Proteína C

PDW - *Platelet Distribution Width*

PLT – Contagem de Plaquetas

PLT – O – Contagem de Plaquetas óticas

PR3 - anticorpos anti-proteinase

PS – Proteína S

RBC – Glóbulos vermelhos

RDW - *Red Cell Distribution Width*

RNA – Ácido ribonucleico

RNI – Ratio internacional normalizado

SLS - Sulfato Lauril de Sódio

SMA - anticorpos anti-músculo-liso-de-actina

β2GP - anti-β2-glicoproteína

TG - anticorpos anti-transglutaminase

TP - Tempo de Protrombina

ULS - Unidade Local de Saúde

VCM – Volume Corpuscular Médio

VPM – Volume Plaquetar Médio

VS – Velocidade de Sedimentação

WBC – Glóbulos Brancos

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema representativo da tecnologia de citometria de fluxo - Sysmex XE 5000

Figura 2 – Representação da caracterização leucocitária – Sysmex XE 5000.

Figura 3 – Diagramas de dispersão leucocitária – Sysmex XE 5000.

Figura 4 - Esfregaço de sangue periférico com um pequeno linfócito no centro.

Figura 5 - Hipocromia – Presença de eritrócitos com palidez central acentuada

Figura 6 - Policromasia. - Presença de células grandes ligeiramente azuladas

Figura 7 - Formação de *rouleaux*

Figura 8 - Aglutinação eritrocitária

Figura 9 - Leucócitos. A. neutrófilo B. eosinófilo C. basófilo D. monócito E. linfócito

Figura 10 - HPLC – Autoanalisador Tosoh G8.

Figura 11 – ACL TOP 500.

Figura 12 - VES MATIC CUB80 DIESSE

Figura 13 – Esquema ilustrativo de uma reação de imunofluorescência indireta

Figura 14 – Equipamento de ELISA automático – TRITURUS.

Figura 15 – Equipamento automático de processamento de lâminas de fluorescência por IFI – QUANTA LISER.

Figura 16 – Equipamento de Imunoblots - EUROBlotOne

Figura 17 – Equipamento de Quimioluminescência: BioFlash.

Figura 18 – Equipamento por FEIA – Immunocap 250.

Figura 19 – Algoritmo de trabalho para a pesquisa de ANA.

Figura 20 – Padrões de fluorescência observados nas células Hep2

Figura 21 – Algoritmo para a determinação de anticorpos anti-dsDNA.

Figura 22 – Resultado positivo para dsDNA por IFI.

Figura 23 – Algoritmo para a determinação de ANCA.

Figura 24 - Parâmetros de diagnóstico da artrite reumatoide.

Figura 25 - Testes laboratoriais para o deteção de anticorpos anti-fosfolípidos.

Figura 26 – Algoritmo de estudo das doenças hepáticas

Figura 27 – Teste realizados para o diagnóstico da doença celíaca.

Figura 28 – Anticorpos anti-endomísio – IFI.

Figura 29 – Parâmetros avaliados para o diagnóstico da gastrite autoimune e anemia perniciosa.

Figura 30 – Parâmetros avaliados para o diagnóstico de doenças inflamatórios intestinais.

Listas de tabelas

Tabela 1 – Metodologias e parâmetros determinados no Sysmex XE 5000

Tabela 2 – Principais causas de interferências nos parâmetros eritrocitários.

Tabela 3 – Principais interferências nos parâmetros leucocitários.

Tabela 4 – Principais interferências na contagem de PLT.

Tabela 5 – Critérios de validação patológica de hemogramas do setor de hematologia.

Tabela 6 - Alterações no tamanho do eritrócito - descrição e causas associadas.

Tabela 7 - Principais alterações na forma eritrocitária verificadas no ESP e descrição das causas associadas.

Tabela 8 - Principais Inclusões eritrocitárias verificadas no ES, descrição e causas associadas.

Tabela 9 - Alterações morfológicas dos leucócitos verificadas no ESP e descrição das causas associadas.

Tabela 10 – Valores de referência de hemoglobina e hematócrito de acordo com idade, segundo OMS.

Tabela 11 - Classificação fisiopatológica das anemias.

Tabela 12 – Classificação morfológica das anemias.

Tabela 13 – Exames laboratoriais realizados no diagnóstico diferencial das anemias.

Tabela 14 – Principais condições que afetam os testes de coagulação de rotina

Tabela 15 – Principais fatores de risco associados a eventos trombofílicos.

Tabela 16 – Principais DAI sistêmicas e anticorpos associados.

Tabela 17 – Imunoblots – Doenças sistêmicas.

Tabela 18 – Principais autoanticorpos associados às doenças hepáticas autoimunes.

Tabela 19 – Equipamentos e parâmetros realizados no laboratório de bioquímica

Resumo

O estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas decorreu de Janeiro de 2022 a Julho de 2022 no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda. Este serviço é constituído por sete unidades laboratoriais que sustentam as necessidades do serviço de urgência, internamentos hospitalares, consultas externas, bem como de todos os Centros de Saúde da área de abrangência da ULS da Guarda. Este relatório de estágio tem como principal objetivo realizar uma abordagem aprofundada sobre as áreas de Hematologia e Imunologia, tanto em relação à organização e funcionamento, como às tecnologias e metodologias analíticas aplicadas.

Palavras-chave: Análises Clínicas, laboratório, Hematologia, Imunologia.

Abstract

The curricular internship of the Master's Course in Clinical Analysis took place from December 2021 to June 2022 in the department of Clinical Pathology Service of the Local Health Unit of Guarda. This service consists of seven laboratory units that support the needs of the emergency department, hospital admissions, outpatient consultations, as well as all the Health Centers in the area covered by the ULS da Guarda. The main objective of this internship report is to carry out an in-depth approach to the areas of Hematology and Immunology, both in terms of organization and functioning, as well as the technologies and analytical methodologies applied.

Keywords: Clinical Analysis, laboratory, Hematology, Immunology.

I - Introdução

Estando em processo de conclusão do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o estágio curricular veio permitir a aquisição de conhecimentos teóricos e práticos essenciais a esta formação.

Neste contexto, realizei o estágio no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Sousa Martins da Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda, E.P.E., Portugal. A Diretora do Serviço é a Dra. Fátima Maria Madureira Vale, Técnica Superior de Saúde, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos, que assumiu a orientação do meu estágio.

O presente relatório apresenta sucintamente o local e a dinâmica das atividades desenvolvidas neste serviço relativamente aos procedimentos e à sua importância clínica, equipamentos, técnicas e metodologias, a importância do controlo da qualidade, tendo o laboratório em toda a sua atividade um comprometimento com o cumprimento e implementação dos requisitos de qualidade e competência para laboratórios de análises clínicas da norma NP EN ISO 15189, 2014 e o cumprimento do Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas. Contém também alusões, sempre que possível, à experiência pessoal contextualizada por explicações teóricas adquiridas ao longo do estágio e bibliografia consultada.

II – O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins

A ULS da Guarda abrange uma área correspondente aos vários conselhos do distrito da Guarda prestando cuidados de saúde primários, diferenciados e continuados. A unidade principal de cuidados de saúde está centrada no Hospital Sousa Martins – Guarda onde se situa o serviço de patologia clínica.

O serviço de patologia clínica engloba sete unidades de trabalho: Laboratório de Hematologia; Laboratório de Bioquímica; Laboratório de Imunologia; Laboratório de Microbiologia; Laboratório de Biologia Molecular; Laboratório de Imunohemoterapia. Encontra-se a laborar no 7 dias por semana 24 horas por dia de forma sustentar as necessidades do serviço de urgência, internamentos hospitalares, consultas externas, bem como de todos os Centros de Saúde da área de abrangência da ULS da Guarda.

III – Hematologia

3.1 - Caracterização do Laboratório de Hematologia

Dedica-se fundamentalmente ao estudo dos elementos figurados do sangue e às principais patologias associadas, e ao estudo da hemóstase. Recebe diariamente cerca de 400 a 500 pedidos de análises de utentes.

Está equipado com dois autoanalisados hematológicos e dois equipamentos de estudo da coagulação. Possui ainda um equipamento para a determinação da velocidade de sedimentação e um equipamento de cromatografia líquida de alta performance.

Quanto à equipa de trabalho esta é formada por Técnicos de Análises Clínicas com formação especializada para laborar neste sector onde desenvolvem tarefas referentes à fase pré-analítica e analítica, assistentes operacionais, administrativos e Técnicos Superiores de Saúde (especialistas) responsáveis por todo o processo de laboração do serviço, assumido as principais funções: interpretação de todos os parâmetros efetuados, visualização de esfregaços de sangue periférico (ESP), interpretação e validação da avaliação interna e externa da qualidade, validação biopatológica dos resultados e assegurar o apoio clínico solicitado.

3.2 - Amostras

Para as análises de hematologia são utilizados tubos com EDTA 3K e tubos com citrato de sódio (1:9) para o estudo da coagulação. Quando se suspeita de pseudotrombocitopenias induzidas pelo EDTA 3K o serviço dispõe de tubos de colheita com citrato de sódio e um tubo denominado de Tromboexact, que contém um composto à base de Mg adicionado de EDTA que funciona como desagregador de plaquetas e que é utilizado para contagens de plaquetas.

3.3 - Hemograma

O hemograma é utilizado como auxiliar no rastreio, diagnóstico e monitorização de diferentes patologias, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre o estado

hematológico dos utentes. O hemograma inclui a quantificação e a avaliação morfológica das células sanguíneas ⁽¹⁾.

3.3.1 - Parâmetros que definem o hemograma

O hemograma engloba a avaliação eritrocitária que inclui a contagem de eritrócitos (RBC), determinação da concentração de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e índices eritrocitários - volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), “red cell distribution width” (RDW). Avalia ainda a contagem dos leucócitos (WBC), fazendo-se a contagem total e a contagem diferencial, ou seja, estabelecendo o valor relativo e absoluto dos vários tipos de leucócitos. O estudo hematológico do hemograma inclui ainda a avaliação plaquetária, a contagem de plaquetas (PLT), avaliação do plaquetócrito (PCT) e a determinação dos índices plaquetários, como o volume plaquetário médio (MPV) e “platelet distribution width” (PDW) ⁽¹⁾.

3.3.2 - Autoanalisador Sysmex XE 5000

O autoanalisador hematológico Sysmex XE-5000 utiliza a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmico para quantificar e diferenciar as populações leucocitárias em amostras de sangue total e em amostras de líquidos biológicos. Utiliza a tecnologia de citometria de fluxo por fluorescência para a contagem de WBC, RET, PLT e NRBC, e o método de impedância para a contagem de RBC e PLT. Para o doseamento da hemoglobina utiliza laurilsulfato de sódio (SLS) sem cianeto (Tabela I) ⁽²⁾.

Tabela I – Metodologias e parâmetros determinados no Sysmex XE 5000.

Metodologia	Parâmetros Analíticos
Citometria de Fluxo	Diferencial leucocitária; Granulócitos imaturos; Eritrócitos nucleados; Reticulócitos; Fração imatura dos reticulócitos; Contagem das plaquetas ópticas; Fração imatura das plaquetas
Impedância e Foco hidrodinâmico	Contagem de plaquetas; Contagem de eritoblastos; Hematócrito
Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS)	Hemoglobina

3.3.2.1 - Citometria de fluxo com fluorescência: é utilizada para quantificar e analisar as propriedades físicas das células sanguíneas. Fornece informação sobre o tamanho e estrutura celulares bem como a diferenciação dos leucócitos através de marcação por fluorescência dos ácidos nucleicos. ^(2, 3)

No Sysmex XE 5000, o sangue é inicialmente aspirado e introduzido num fluxo contínuo que faz com que as células se alinhem individualmente, sendo posteriormente marcadas com um marcador fluorescente que se liga especificamente aos ácidos nucleicos. Um feixe de luz semiconductor é emitido para o fluxo de células atravessando-o perpendicularmente (90°), estando este alinhado com um detetor. Existem vários detetores colocados em diferentes posições relativamente ao laser, o detector “forward-scattered” (FS) colocado num ângulo de 2-10°, o “Side-scattered” (SS) colocado para uma leitura a 90° e ainda o “lateral fluorescence light” (LFL) também a 90° (figura 1) ^(2, 3, 4).

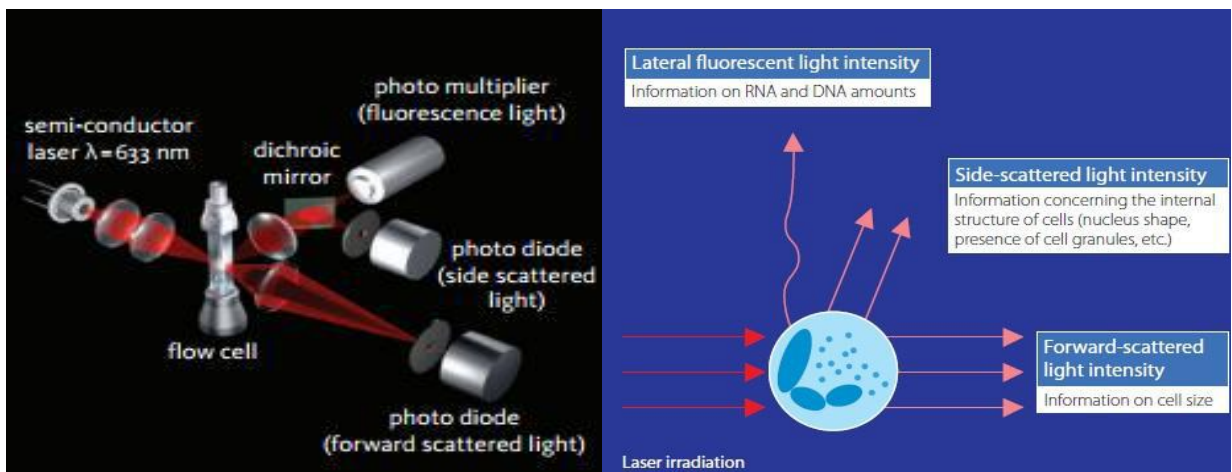


Figura 1 - Esquema representativo da tecnologia de citometria de fluxo - Sysmex XE 5000.

Figura 2 - Representação da caracterização leucocitária – Sysmex XE 5000.

O detector FS fornece informação sobre o tamanho e complexidade das células, enquanto que o detector SS capta a radiação dispersa num grande ângulo, fornecendo informação acerca da complexidade interna da célula. O LFL faz a medição da fluorescência emitida pelas células, fornecendo informação quanto ao tamanho do núcleo (figura 2). Estes dados são interpretados automaticamente e incorporados em diagramas de dispersão que permitem a diferenciação das diferentes populações leucocitárias (figura 3) ^(2, 3, 4).

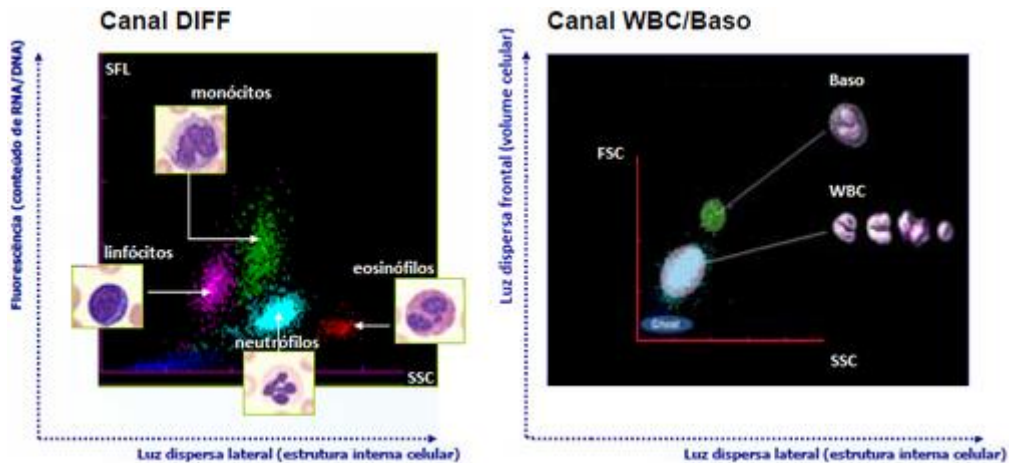


Figura 3 – Diagramas de dispersão leucocitária – Sysmex XE 5000.

3.3.2.2 - Impedância e Foco hidrodinâmico: é aplicada à contagem celular, sendo também designada por corrente direta e tem como base o princípio de “Coulter”. Esta metodologia tem como base a medição de alterações numa corrente elétrica durante a passagem de partículas, neste caso células sanguíneas (suspensas numa solução salina, isotónica, boa condutora), através de um pequeno orifício situado entre dois eléctrodos. Como as células não são condutoras de corrente elétrica, a passagem de cada célula através da abertura causa uma diferença de potencial entre os dois eléctrodos. Desta alteração da corrente gera-se um pulso elétrico proporcional ao volume da célula que lhe deu origem. Esta metodologia é utilizada essencialmente para contagem de RBC e PLT ^(1,2,3).

O número de pulsos gerados indica o número de células. O tamanho/amplitude do pulso representa o volume/tamanho da célula. Os pulsos são analisados e classificados pelo tamanho pelo autoanalisador. A soma dos impulsos de todas as células num volume específico é avaliada e representada em histogramas ^(1,4).

3.3.2.3 - Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS): método usado pelo Sysmex XE 500 para o doseamento da HGB. Utiliza laurilsulfato de sódio sem cianeto. O reagente hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra. A reação química inicia-se com a alteração da globina, oxidando depois o grupo heme. O grupo hidrofílico do SLS liga-se ao grupo heme, formando um complexo corado (SLS-HGB) que é quantificado através fotometria ⁽²⁾.

Os WBC são medidos num canal DIFF (contagem diferencial de WBC), em que um surfactante promove a lise dos RBC e permeabiliza as membranas dos WBC. Os WBC ficam com poros muito reduzidos na membrana, por onde entra um corante fluorescente (polimetina) que se liga ao ácido nucleico. São depois analisados por citometria de fluxo (com fluorescência), recorrendo aos detetores SS e LFL, em que a intensidade de fluorescência do RNA e DNA do núcleo e dos organelos citoplasmáticos das células, e a análise da complexidade da estrutura celular, permitem fazer a diferenciação dos diferentes tipos de leucócitos ^(2, 3).

No canal RET/PLT-O são contados os RET e as PLT (contagem ótica). Neste canal, da mesma forma, o surfactante lisa os RBC e permeabiliza as membranas das células permitindo a penetração do corante fluorescente, que se vai ligar ao ácido nucleico dos WBC, NRBC, RET e PLT. Com recurso aos detetores FS e LFL, são analisados os RET ⁽³⁾.

No canal IMI são detetadas seletivamente células imaturas de linhagem mieloide. Quando expostas a um reagente de lise (“Stromatolyser – IM”), as membranas das células maduras são destruídas devido ao seu grande teor lipídico. Uma vez que as membranas das células imaturas contêm menor quantidade de lípidos e uma grande concentração de ácidos gordos, o reagente de lise causa a formação de pequenos poros membranares sem causar destruição o que facilita a sua difusão para o interior das células fixando os componentes intracelulares. Recorrendo ao recorrendo aos detetores SS e FSS, o Sysmex consegue distinguir células blásticas, granulócitos imaturos (mielócitos, metamielócitos, prómielócitos e células em banda) ^(2, 3).

No canal de NRBC, os RBC e NRBC são lisados por um surfactante (“Stromatolyser – NR”) expondo o núcleo dos NRBC. O corante fluorescente (polimetina) migra e liga-se aos ácidos nucleicos e organelos celulares. O resultado desta análise serão duas populações distintas, que diferem na intensidade de fluorescência (WBC com maior fluorescência que os

NRBC). Este canal permite a correção automática da contagem de WBC na presença de NRBC ^(2, 3).

3.3.3 - Parâmetros de avaliação eritrocitária

3.3.3.1 - Concentração da hemoglobina: a HGB ocupa cerca de um terço do volume total da célula. A concentração de hemoglobina depende, principalmente, do número de células e também da quantidade de hemoglobina existente em cada eritrócito. É expressa em g/dl e os seus valores de referência variam principalmente de acordo com a idade e sexo. A sua concentração é o principal indicador de estados anémicos ^(4, 6).

3.3.3.2 - Contagem de eritrócitos: Um adulto apresenta cerca de 5 milhões de eritrócitos por microlitro de sangue, que representam cerca de 95 % do volume dos elementos figurados do sangue. A contagem de eritrócitos é expressa em número de células por microlitro e é um indicador da produção e tempo de semi-vida dos eritrócitos. Valores diminuídos (eritropenias) encontram-se principalmente em casos de aplasia medular e hemorragias graves. A desidratação e doenças mieloproliferativas constituem as principais causas de eritrocitose ^(4, 6).

3.3.3.3 - Hematócrito: refere-se à proporção do volume que os eritrócitos ocupam no total da amostra e é apresentado em percentagem ou em litro por litro. O seu valor depende principalmente, do número e tamanho dos eritrócitos. As alterações deste parâmetro devem-se às mesmas causas que provocam alterações na contagem de eritrócitos ^(4, 6).

3.3.3.4 - Índices hematimétricos

- **Volume Globular médio:** o VCM representa o volume médio de cada eritrócito, expresso em femtolitros (fL). Este parâmetro permite classificar morfologicamente as anemias como microcíticas (< 80 fL), normocíticas (80-100 fL) e macrocíticas (> 100 fL) ⁽⁶⁾.

- **Hemoglobina globular média:** refere-se à medida do conteúdo de hemoglobina por eritrócito. Pode ser obtida manualmente pelo quociente do valor de hemoglobina e o número de eritrócitos e é expresso em picogramas. É utilizado na avaliação das anemias hipocrômicas ^(4, 6).

- **Concentração média de hemoglobina globular:** representa a concentração média de hemoglobina eritrocitária. Este índice é usado na distinção entre normocromia (30-35 g/dl) e hipocromia dos eritrócitos. Valores aumentados (>36g/dl) estão associados a desidratação, lipêmias, hemólise, esferocitose hereditária e à presença de crioglobulinas⁽⁶⁾.

- **Índice de Distribuição Eritrocitária:** o RDW representa a heterogeneidade do volume dos eritrócitos presentes na amostra, refletindo o índice de anisocitose. Esta determinação é especialmente útil no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas⁽⁶⁾.

- **Contagem de reticulócitos:** são células que imaturas que são libertadas para a circulação possuindo ainda RNA e organelos. Em condições normais, estas células permanecem cerca de 1 dia na corrente sanguínea antes de originarem o eritrócito maduro. A sua contagem reflete a atividade eritropoiética da medula óssea, permitindo deste modo a caracterização das anemias em hiperrregenerativas ou hiporregenerativas⁽⁴⁾.

- **Fração de reticulócitos imaturos (IRF)** - Este parâmetro indica a proporção de reticulócitos imaturos presentes na circulação periférica. Como os reticulócitos imaturos são libertados na corrente sanguínea em períodos de eritropoiese acelerada, como acontece numa hemorragia, em algumas anemias hemolíticas e na terapêutica com estimuladores da eritropoiese, é um parâmetro útil na avaliação do grau de eritropoiese^(2, 3).

- **Eritroblastos (NRBC):** Os eritroblastos são células precursoras dos eritrócitos e, excetuando o período neonatal, são normalmente encontradas somente na medula óssea. A sua presença no sangue periférico não é frequente e é o reflexo de um aumento extremo da atividade eritropoiética, habitualmente com eritropoiese extramedular^(4, 6).

3.3.3.5 - Interferências nos parâmetros eritrocitários

Apesar de os autoanalisadores fornecerem cada vez mais resultados fidedignos nas contagens celulares, há situações que podem interferir nos resultados finais. Referem-se de seguida alguns fatores que podem alterar o eritrograma (tabela 2).

Tabela 2 – Principais causas de interferências nos parâmetros eritrocitários.

	Aumento	Diminuição
RBC	PLT gigantes Leucocitose Fibrina	Aglutininas RBC microcíticos Criglobulinas Hemólise
Hb	Lipémia Bilirrubinemia Leucocitose Hiperproteinémia	
Hct		Amostra coagulada RBC microcíticos Hemólise
MCV	Leucocitose Aglutininas Hiperglicemia Armazenamento prolongado da amostra (exposição ao EDTA)	
MCH	Lipémia Falso aumento da Hb Falsa diminuição dos RBC Aglutinação de RBC	
MCHC	Lipémia Criglobulinas Hiperbilirrubinémia Aglutininas Hemólise Amostra coagulada Diminuição do Hct (falseado)	Hiperglicemia PLT gigantes
RET	PLT gigantes Agregados PLT Inclusões citoplasmáticas	

3.3.4 - Parâmetros de avaliação leucocitária

3.3.4.1 - Contagem total de leucócitos: permite avaliar quadros de leucopenias ou de leucocitoses. As leucopenias surgem com maior frequência por falência medular após quimioterapia, fibrose medular e em alguns estados leucémicos. A leucocitose está frequentemente a infeções infeção, gravidez, pós-operatório e leucemias^(6,7).

3.3.4.2 - Fórmula diferencial leucocitária: a fórmula leucocitária fornece, em números absolutos e percentuais, a contagem de cada tipo de leucócito. No equipamento automático utilizado é possível avaliar a distribuição das cinco populações leucocitárias: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos^(4,7).

No caso de existirem células com baixa maturação que impossibilita o equipamento de as distribuir nas cinco populações normais, este emite um alerta da presença de blastos e ou Granulócitos imaturos. Cabe ao responsável do sector avaliar o ESP para verificar uma possível presença de doença linfoliferativa ou mieloproliferativa. Se for o caso e se o doente não apresentar histórico de doença, é recomendado junto do clínico prescritor um estudo mais alargado (Imunofenotipagem, medulograma).

3.3.4.3 - Granulócitos imaturos: os granulócitos imaturos correspondem aos precursores de granulócitos que incluem os promielócitos, mielócitos e metamielócitos. A presença de granulócitos imaturos no sangue periférico reflete a atividade da medula óssea em resposta a um processo inflamatório ou infeccioso como a sépsis. Este parâmetro é também importante no diagnóstico de leucemia mieloide crônica (LMC) e de outras hemopatias malignas. Na presença deste tipo de procede-se à contagem diferencial manual pela observação do ESP⁽⁸⁾.

3.3.4.4 - Interferências nos parâmetros leucocitários

Os resultados da contagem de leucócitos podem estar falsamente alterados devido a diversos fatores que são descritos em seguida na tabela 3.

Tabela 3 – Principais interferências nos parâmetros leucocitários

	Aumento	Diminuição
WBC	Agregados PLT PLT gigantes NRBC RBC resistentes à lise Fibrina, crioglobulinas e parasitas	Coagulação da amostra Agregados WBC Lise WBC (amostra envelhecida, WBC frágeis – leucemia) Leucemia em tratamento com quimioterapia (WBC frágeis e fragmentos podem ser contados como PLT)

3.3.5 - Parâmetros de avaliação das plaquetas

3.3.5.1 - Contagem de Plaquetas: determina o número de plaquetas circulantes expressas em número de células por microlitro de sangue permitindo assim a detecção de trombocitopenias ou trombocitoses.

As trombocitopenias podem dever-se a uma diminuída produção de plaquetas na medula, destruição periférica de PLT, ou a um aumento do consumo. A etiologia das trombocitopenias que não estão associadas à diminuição da sua produção, pode derivar de uma hemorragia aguda, esplenectomia, purpura trombocitopenia idiopática, purpura trombocitopenia trombótica ou trombocitopenia induzida pela heparina. As trombocitopenias que resultam de uma produção insuficiente de plaquetas podem ter como etiologia a aplasia medular, leucemia, mielofibrose medular ou síndrome mielodisplásico^(4, 6, 8).

3.3.5.2 - Interferências nos parâmetros plaquetários

São vários os fatores que podem interferir com as contagens de plaquetas (tabela 4) que podem levar a falsas trombocitopenias ou falsas trombocitoses. A validação biopatológica só é feita se os resultados estiverem de acordo com o histórico recente do doente. Caso ocorram discordâncias ou na ausência de histórico recente, inicialmente verifica-se a conformidade da amostra (volume, coágulos) e se esta tiver em conformidade procede-se à sua contagem pelo método ótico. Caso o valor se mantenha procede-se à observação do ESP para confirmação dos resultados. Caso a amostra não esteja em conformidade ou se o ESP apresentar agregados de PLT é solicitada nova amostra e os resultados são retidos.

Tabela 4 – Principais interferências na contagem de PLT.

	Aumento	Diminuição
PLT	Fragmentos RBC Fragmentos citoplasmáticos de células nucleadas Criglobulinas e fibrinogênio Bactérias e fungos Lípidos	Aglutinação PLT Satelitismo de PLT (PMN) PLT gigantes Coagulação da amostra

3.3.5.3 - Volume plaquetário médio (MPV)

Reflete o volume médio das PLT em circulação, sendo que estas podem variar de tamanho e atividade funcional. A sua interpretação assume elevada utilidade para diferenciar as trombocitopenias hiporregenerativas das trombocitopenias destrutivas. O aumento do MPV está associado ao aumento da produção de PLT acompanhado pela entrada de PLT maiores (mais jovens) em circulação que resulta da produção compensatória ao nível da medula óssea e que acontece nos casos de destruição periférica. Este parâmetro tem-se revelado útil na diferenciação de trombocitopenias de origem medular ou periférica. Na trombocitopenia de origem medular, o MPV está diminuído pois há uma menor produção de PLT e as que entram em circulação são mais maduras e de pequeno volume. Nas trombocitopenias periféricas acontece o oposto, já que o “turnover” elevado faz com que haja aumento de produção e, portanto, de macroplaquetas na circulação ⁽⁴⁾.

As plaquetas maiores são as mais jovens, mais reativas e produzem mais factores trombogénicos (maior conteúdo de tromboxano A₂, agregam mais facilmente *in vitro*, contêm mais grânulos densos, têm maior expressão dos recetores de membrana). Por isso, um aumento do MPV tem sido associado com morbidade cardiovascular e cerebrovascular, sendo proposto como um fator de risco independente para enfarte de miocárdio em pacientes com doença coronária; e também um fator de risco de mortalidade ou de eventos recorrentes isquémicos de enfarte de miocárdio.

3.3.5.4 - Fração de plaquetas imaturas (IPF) – reflete a atividade de produção na medula óssea. O IPF corresponde às PLT jovens presentes na circulação periférica, que contêm vestígios de material genético. É um parâmetro de avaliação similar aos RET para a linhagem dos RBC. Como se referiu, as PLT imaturas são mais reativas que as maduras. O seu valor contribui para a avaliação da atividade medular e do aumento do consumo ou destruição plaquetária. O valor de IPF aumenta quando há aumento da produção de PLT e diminui quando há falha na sua produção, sendo por isso útil no diagnóstico diferencial de trombocitopenias. Assim, o IPF apresenta valores aumentados quando há destruição ou consumo periférico em doenças como a Púrpura Trombocitopénica Trombótica ou a Púrpura Trombocitopénica Idiopática, e valores diminuídos quando há falência medular, ou seja trombocitopenias hiporregenerativas. Este parâmetro é usado para monitorizar a recuperação da produção de PLT pela medula óssea após quimioterapia ou radioterapia, uma vez que a IPF é um marcador de recuperação mais precoce que aumenta antes da recuperação do valor de contagem de PLT ^(2, 3).

3.3.5.5 - Contagem de PLT pelo método ótico (PLT-O) - a contagem de PLT efetuada pelo método ótico permite aumentar a exatidão da contagem de plaquetas periféricas, em comparação com o método de impedância. O método de impedância apresenta mais interferências durante a contagem de PLT, nomeadamente pela presença de parasitas, fragmentos de RBC ou microcoágulos. Na contagem por impedância as PLT são contadas e analisadas apenas pelo seu volume, enquanto que no método ótico para além da densidade ótica a complexidade plaquetária também é avaliada^(2, 3).

3.4 - Esfregaço de sangue periférico

Com o desenvolvimento de instrumentos automatizados sofisticados para contar e caracterizar as células sanguíneas, os ESP são cada vez realizados em menor número na rotina laboratorial. No entanto, a sua interpretação não deixa de ser uma ferramenta fundamental na avaliação da doença hematológica.

A decisão de efetuar o ESP tem em conta os resultados obtidos no hemograma, bem como o histórico do doente e as circunstâncias clínicas em que o mesmo se encontra. Na prática clínica o ESP só é efetuado nas situações em que seja justificável (tabela 5).

Tabela 5 – Critérios de validação patológica de hemogramas do setor de hematologia.

CRITÉRIOS PARA VALIDAÇÃO DO HEMOGRAMA				
RN	SEMPRE		Observar lâmina e fazer diferencial	
Crianças até 12 anos	SEMPRE		Observar lâmina e fazer diferencial	
WBC,RBC, HGB,PLT	Valores abaixo da linearidade do equipamento	Verificar se a amostra está coagulada ou hemodiluída	Solicitar nova amostra para confirmar resultados	Processar de novo
WBC	<4.0 $10^3/\mu\text{l}$ >15.0 $10^3/\mu\text{l}$		Observar lâmina e fazer diferencial	
PLT	<100 $10^3/\mu\text{l}$ >1000 $10^3/\mu\text{l}$		Observar lâmina	Trombocitopenia desconhecida - solicitar colheita em tubo Tromboexact para confirmar contagem de plaquetas.
PLT	<100 $10^3/\mu\text{l}$ *		Pesquisar coágulos na amostra.	Para Pseudotrombocitopenias excluir agregados plaquetares por
HGB	<7 g/dl >2 g/dl acima dos valores de referência para idade e sexo		Observar lâmina	
VCM	<75fl >105fl (adulto)		Observar lâmina	
MCHC	≥ 2 unidades acima do limite dos valores	lipemia,	Analisar amostra	Colocar na estufa durante 30 minutos se presença de

	de referência	hemólise, aglutinação dos RBC, esferócitos	Observar lâmina	aglutininas, diluir a 1/2 com cellpack se lipemia e multiplicar resultados por 2.
RDW	>22%		Observar lâmina	
	DIFERENCIAL			
Contagens sem diferencial ou dif.incompleto			Observar lâmina e fazer diferencial	
Neut #	<1.0 10 ³ /µl >20.0 10 ³ /µl		Observar lâmina	
Linf #	>5.0 10 ³ /µl (adulto) >7.0 10 ³ /µl (<12 anos)		Observar lâmina	
Mono #	>1.5 10 ³ /µl (adulto) >3.0 10 ³ /µl (<12 anos)		Observar lâmina	
Eos #	>2.0 10 ³ /µl		Observar lâmina	
Baso #	>0.5 10 ³ /µl		Observar lâmina	
NRBC	Qualquer valor		Observar lâmina	
Retics Valor absoluto #	>0.100 10 ⁶ /µl		Observar lâmina	
	ALARMES	(FLAGS)		
Fragmentos de RBC			Observar lâmina	
Dimorfismo			Observar lâmina	
RBC resistentes à lise			Observar lâmina	
Agregados plaquetares (clumps)			Pesquisar coágulos na amostra. Observar lâmina	Presença de agregados plaquetares - solicitar colheita em tubo Tromboexact
Alarme de Granulócitos imaturos			Observar lâmina e fazer diferencial	

Alarme de Desvio à esquerda			Observar lâmina e fazer diferencial	
Alarme de Linfócitos atípicos/variantes			Observar lâmina e fazer diferencial	
Alarme de Blastos			Observar lâmina e fazer diferencial	
Alarme de NRBC			Observar lâmina	

3.4.1 - Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Após a execução do ESP as lâminas são posteriormente coradas usando a técnica de MayGrünwald-Giemsa. Esta coloração baseia-se na coloração de Romanowsky que envolve a coloração dos diferentes componentes celulares de acordo com a sua natureza ácida ou básica ⁽¹⁾.

O processo de coloração envolve uma fixação inicial do ESP com metanol sendo este posteriormente corado pela eosina (corante ácido) que irá dar pigmentação a substâncias cujas características são básicas (citoplasma, filamentos citoplasmáticos, granulos e fibras extracelulares). De seguida, realiza-se a coloração com o corante MayGrünwald (azul de metileno), sendo este um corante básico irá corar as estruturas com características ácidas (grupos fosfato, ácidos nucleicos e granulos).

3.4.2 - Avaliação da série vermelha

O eritrócito, em situações normais, possui uma forma bicôncava, apresentando a parte central (cerca de um terço da célula) descorada com uma coloração mais densa na periferia. Pela observação do ESP é possível proceder à avaliação da morfologia e aspecto do eritrócito, sendo que em determinadas situações patológicas são observadas alterações ao nível do tamanho, forma, cor, presença de inclusões eritrocitárias ou da distribuição, cuja descrição se encontra de seguida. No que respeita à avaliação destas situações patológicas, é importante saber identificar o que é normal, por conseguinte na figura 4 encontra-se

evidenciado um esfregaço de sangue periférico normal com um pequeno linfócito, cujo tamanho do núcleo se assemelha ao tamanho de um eritrócito normal ^(5,8,9).

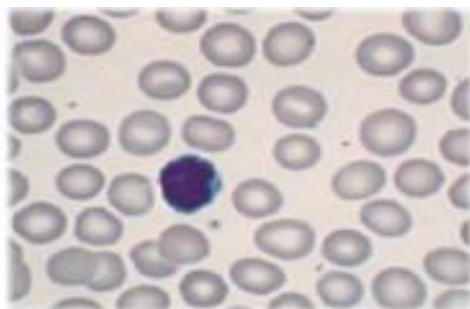


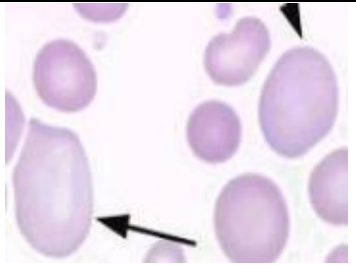

Figura 4 - Esfregaço de sangue periférico com um pequeno linfócito no centro.

3.4.2.1 - Tamanho

O eritrócito, em condições normais, apresenta um diâmetro médio de cerca de 7,2 μm , sendo denominado de normócito. O aparecimento de alterações no tamanho pode resultar em macrócitos (diâmetro superior a 8,2 μm) ou em micrócitos (diâmetro inferior a 6,2 μm), os quais se encontram representados na tabela 3. Deve se notar que a presença de micrócitos ou macrócitos no ESP pode tratar-se de uma alteração generalizada, quando se verifica uma alteração no VCM, ou restringir-se apenas a uma pequena população, não alterando o VCM. A coexistência de micrócitos e macrócitos pode resultar num valor de VCM normal uma vez que se trata de um valor médio ^(6, 7, 8).

É importante evidenciar que na presença de uma população dimórfica (após transfusões sanguíneas), devem ser reportadas as características de ambas as populações. A observação de uma heterogeneidade no tamanho celular é denominada de anisocitose, sendo caracterizada como uma anormalidade inespecífica, que pode ser comprovada pelo aumento do RDW ^(4, 6).

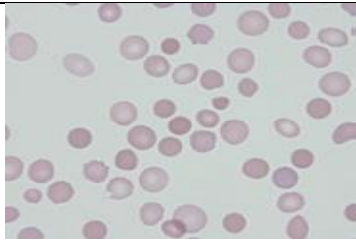
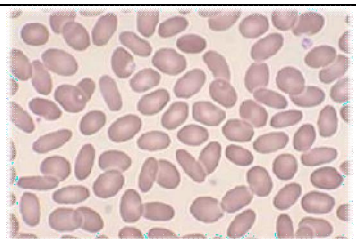
Tabela 6 - Alterações no tamanho do eritrócito - descrição e causas associadas.

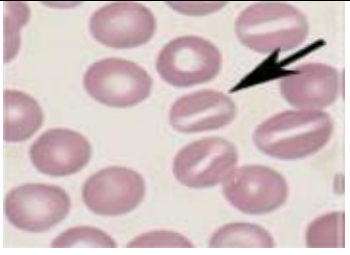

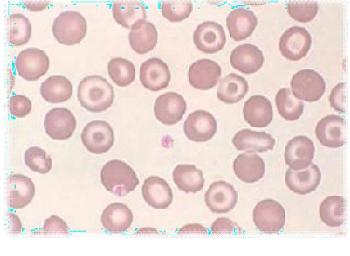
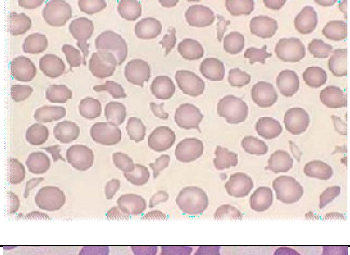
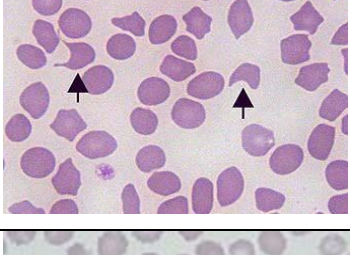

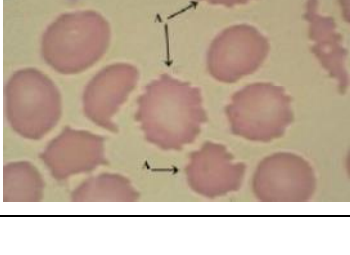
Imagens	Descrição
	<p>Macrócito: Eritrócito com um diâmetro superior a 8,2 µm</p> <p>Observado: Anemia megaloblástica, síndrome mielodisplásico, doenças hepáticas, alcoolismo, reticulocitose e em recém-nascidos (fisiológico)</p>
	<p>Micrócito: Eritrócito com um diâmetro inferior a 6,2 µm</p> <p>Observado: Anemia por ferropénica, anemia sideroblástica, anemia das doenças crónicas e hemoglobinopatias</p>


3.4.2.2 - Forma

Em condições normais, o eritrócito maduro apresenta, geralmente, uma forma bicôncava. No entanto, como resultado de uma eritropoiese ineficaz ou de danos após a formação, o eritrócito pode adotar formas anormais, passando a designar-se de poiquilócito. Estas formas anormais têm diferentes denominações e estão associadas a diferentes patologias, como exemplificado na tabela 7 ^(4, 6).

Tabela 7 - Principais alterações na forma eritrocitária verificadas no ESP e descrição das causas associadas.

Imagens	Descrição
	<p>Esferócito: eritrócito microcítico, redondo, e hiperocrômico</p> <p>Observados: Esferocitose hereditária, doença hemolítica do recém-nascido e anemia hemolítica autoimune</p>
	<p>Eliptócito: forma elítica</p> <p>Ovalócito: forma ovalada</p> <p>Observados: Eliptocitose/ovalocitose hereditária,, anemia ferropénica, anemia megaloblástica (macro-ovalócitos)</p>

	<p>Estomatócito: eritrócito com uma ampla fenda central</p> <p>Observados: Estomatocitose hereditária, alcoolismo, hepatopatia</p>
	<p>Drepanócito: eritrócito alongado, com extremidades pontiagudas que normalmente forma uma curvatura; “célula em forma de foice”</p> <p>Observados: Anemia falciforme</p>
	<p>Célula em alvo: eritrócito com hemoglobina concentrada no centro e na periferia.</p> <p>Observadas: Anemia ferropénica, doença hepática, hemoglobinopatias e pós-esplenectomia</p>
	<p>Esquizócito: Fragmentos de eritrócitos com forma e tamanho variável,</p> <p>Observados: Anemia hemolítica microangiopática, queimaduras graves.</p>
	<p>Queratócito: denominado de “bite cell”. Podem resultar da remoção dos corpos de Heinz ou danos mecânicos</p> <p>Observados: Anemia hemolítica microangiopática e dano oxidativo</p>
	<p>Acantócito: eritrócito com poucas espículas de formas variadas e distribuídas de forma irregular</p> <p>Observados: doença hepática grave e abetalipoproteinemia hereditária</p>
	<p>Equinócito: eritrócito com numerosas espículas curtas distribuídas de forma regular</p> <p>Observados: Deficiência de piruvato cinase, insuficiência renal</p>

	<p>Dacriócito: eritrócito com uma extensão pontiaguda (célula em forma de lágrima)</p> <p>Observados: Mielofibrose primária, talassémia.</p>
---	--

3.4.2.3– Cor

Os eritrócitos normais apresentam uma coloração mais intensa na periferia com a parte central descorada, sendo denominados de normocrômicos. A visualização de eritrócitos hipocrômicos (figura 5), em que o centro descorado ocupa mais de um terço do diâmetro da célula, ocorre principalmente devido á deficiência de ferro ou hemoglobnopia. A hiperocrômia é uma característica nemos frequente uma vez que o aumento da produção de hemoglobina acompanha o volume celular, no entanto nos casos de esferocitose esta situação não se verifica estabelecendo-se deste modo uma hiperocrômia eritrocitária. ^(6, 8, 9).

A alteração na cor dos eritrócitos está frequentemente relacionada com a presença de formas imaturas, denominada de policromatofilia (figura 6). Nesta situação, verifica-se a presença de células maiores com uma coloração citoplasmática azulada, conferida pela existência de RNA residual. O aumento destas células está associado a um aumento da atividade da medula óssea ^(6, 8).

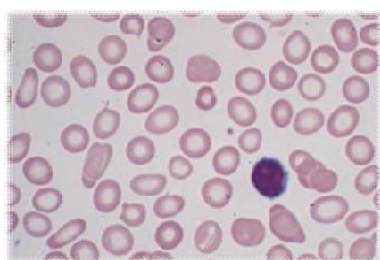


Figura 5 - Hipocromia – Presença de eritrócitos com palidez central acentuada

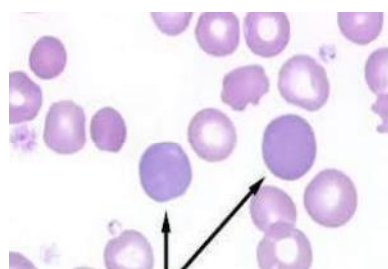
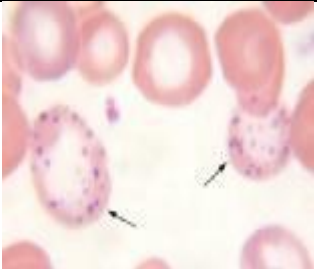
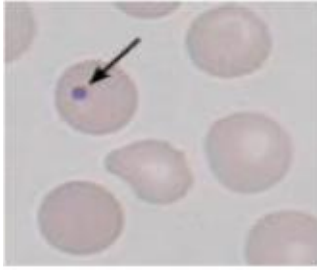
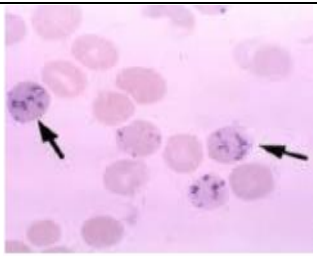


Figura 6 – Policromatofilia - Presença de células grandes ligeiramente azuladas

3.4.2.4 - Inclusões eritrocitárias

No esfregaço de sangue periférico podem ser observados vários tipos de inclusões eritrocitárias, algumas das quais evidenciadas na tabela 8.

Tabela 8 - Principais Inclusões eritrocitárias verificadas no ES, descrição e causas associadas.

	<p>Pontuado Basófilo: Numerosos grânulos basófilos, finos, dispersos pelo citoplasma.</p> <p>Composição: RNA precipitado</p> <p>Observado: Hemoglobinopatias, envenenamento por chumbo e anemias severas</p>
	<p>Corpos Howell-Jolly: Grânulos redondos, muito basófilos, geralmente 1 por célula</p> <p>Composição: DNA remanescente</p> <p>Observados: Hiposplenismo, pós-esplenectomia, anemia hemolítica e anemia megaloblástica</p>
	<p>Corpos Pappenheimer/siderócito: Aglomerados irregulares de pequenos grânulos basófilos, geralmente periféricos</p> <p>Composição: Ferro</p> <p>Observados: Anemia sideroblástica, pós-esplenectomia, síndrome mielo-displásico</p>

3.4.2.5 - Alterações na distribuição

A formação de rouleaux (figura 7) e a aglutinação (figura 8) são duas alterações na distribuição dos eritrócitos que podem ser avaliadas no esfregaço de sangue periférico. O fenômeno de rouleaux, em que os eritrócitos estão dispostos em pilha, está associado a um aumento das proteínas plasmáticas, em que as causas mais comuns são os processos inflamatórios, doenças de deposição proteica (amiloidose) e o mieloma múltiplo. A aglutinação eritrocitária, que se apresenta como um aglomerado de eritrócitos, resulta da presença de anticorpos que reagem contra os antígenos eritrocitários membranares, nomeadamente crioglobulinas ^(6, 8, 9).

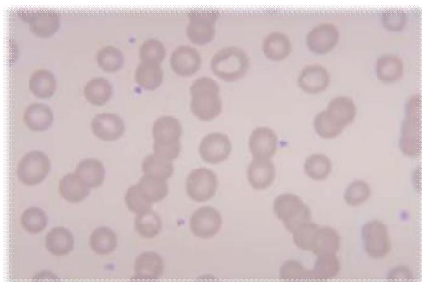


Figura 7 - Formação de rouleaux

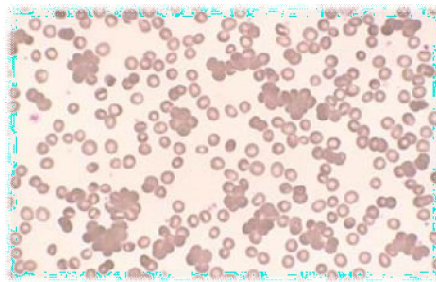


Figura 8 - Aglutinação eritrocitária

3.4.3 - Avaliação leucocitária

No sangue periférico, os leucócitos são caracterizados como mononucleares ou polimorfonucleares. As células mononucleares, monócitos e linfócitos, possuem núcleos não segmentados, com uma forma redonda, oval ou dobrada. Os polimorfonucleares englobam os granulócitos, que incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, os quais apresentam núcleos lobulados, com formas variadas, e grânulos citoplasmáticos com diferentes características de coloração, consoante a natureza ácido base. As granulações neutrófilas apresentam uma coloração rosa, devido a reagirem com ambos os corantes ^(4, 6, 8). Na figura 9 estão evidenciadas as cinco populações de leucócitos.

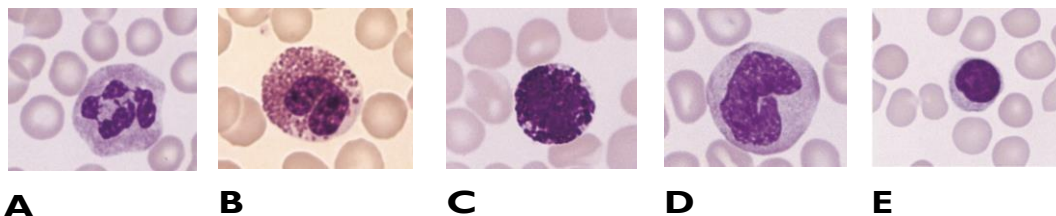


Figura 9 - Leucócitos. A. neutrófilo B. eosinófilo C. basófilo D. monócito E. linfócito

Neutrófilos

Os neutrófilos têm como principal função a fagocitose e destruição dos microrganismos, representando a defesa primária a uma infecção bacteriana. Estas células apresentam uma forma arredondada, com 10 a 14 μm de diâmetro, um núcleo lobulado constituído por dois a cinco lóbulos interligados por filamentos de cromatina e um citoplasma, normalmente, com grânulos finos com uma coloração rosa, dispersos de forma uniforme ao nível citoplasmático (figura 8A) ⁽⁶⁾.

Eosinófilos

Os eosinófilos são ligeiramente maiores que os neutrófilos, com 12 a 17 μm de diâmetro. O núcleo é, geralmente, bilobado e o citoplasma apresenta grânulos esféricos eosinófilos (alaranjados). Possuem diversas funções, destacando-se as respostas alérgicas, respostas antiparasitárias e na remoção de fibrina formada durante a inflamação. (figura 8B) ⁽⁶⁾.

Basófilos

Os basófilos são os leucócitos menos numerosos na corrente sanguínea. Apresentam cerca de 10 a 14 μm de diâmetro um núcleo denso e compacto e um citoplasma com grânulos grandes muito basófilos, que normalmente obscurecem o núcleo. (figura 8C). Encontra-se aumentados principalmente em reações alérgicas⁽⁶⁾.

Monócitos

Os monócitos são os maiores leucócitos no sangue periférico, com um diâmetro de 15 a 18 μm , possuem um núcleo grande e irregular com cromatina fina e um citoplasma azul acinzentado, frequentemente apresentam vacúolos e grânulos finos azurofílicos. Por vezes a sua distinção é dificultada pela presença de linfócitos atípicos (figura 8D). O aumento do número de monócitos ao nível do sangue periférico está muitas vezes associado a estados infecciosos (tuberculose, malária, bruceloses) e em leucemias monocíticas⁽⁶⁾.

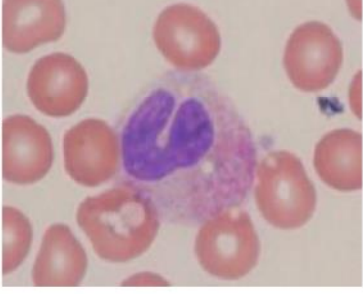
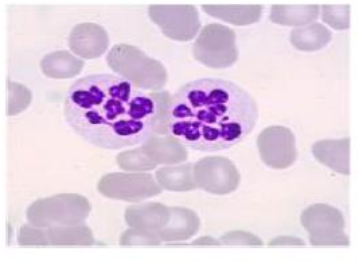
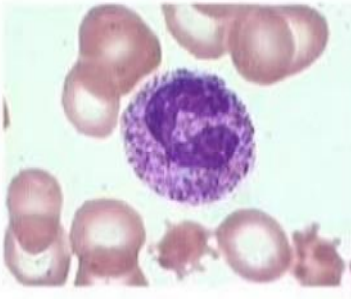
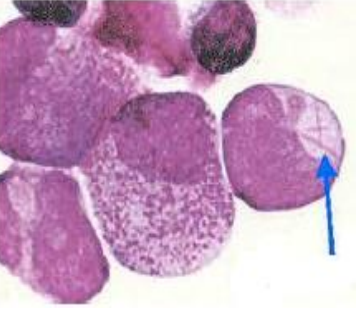
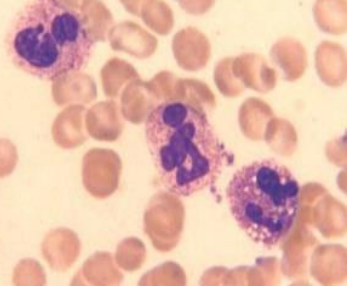
Linfócitos

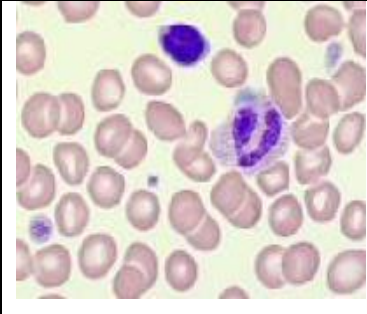
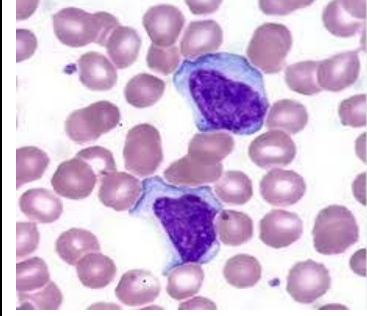
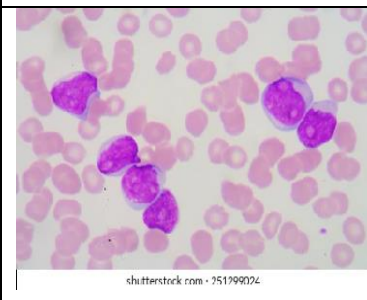
Os linfócitos apresentam, na sua grande maioria, um formato pequeno arredondado com cerca de 10 a 12 μm de diâmetro, no entanto podem aparecer com diversas formas e tamanhos. O núcleo é redondo com cromatina condensada e um citoplasma azul-claro, o qual pode conter um número reduzido de grânulos azurofílicos. (figura 8E). Em latentes e crianças, os linfócitos tendem a ser maiores e mais pleomórficos, sendo uma característica importante a ter em conta aquando da observação do ESP⁽⁶⁾.

3.4.3.1 - Alterações morfológicas dos leucócitos

Dentro das inúmeras alterações leucocitárias que se podem verificar no ESP, as que mais se destacaram durante o período de estágio estão representadas na tabela 9.

Tabela 9 - Alterações morfológicas dos leucócitos verificadas no ESP e descrição das causas associadas.

	<p>Neutrófilo em banda: são células imaturas com um núcleo em forma de bastão.</p> <p>Observado: reposta a processos infecciosos, gravidez ou após estimulação da medula óssea</p>
	<p>Neutrófilo polisegmentado</p> <p>Observados: anemia megaloblástica, doença hepática</p>
	<p>Granulações tóxicas dos neutrófilos: granulações grandes muito basófilas</p> <p>Observadas: infecções graves (sépsis) e em tratamento com fatores de crescimento hematopoiéticos</p>
	<p>Corpos de Auer: corpos cilíndricos azurófilos lisossomais observados no citoplasma dos mieloblastos e promielócitos</p> <p>Observados: leucemias mieloides agudas e síndromes mielodisplásicas.</p>
	<p>Vaculação citoplasmática dos neutrófilos</p> <p>Observados: estados infecciosos</p>

	<p>Corpos de Döhle: inclusões citoplasmáticas periféricas azuis</p> <p>Observado: sépsis, queimaduras, estados inflamatórios</p>
	<p>Linfócitos atípicos: Linfócitos grandes, com contorno irregular e citoplasma basófilo.</p> <p>Observados: infecções virais (CMV, EBV)</p>
	<p>Blastos: precursores mielóides / linfóides. Citoplasma escasso, cromatina condensada e nucléolos proeminentes</p> <p>Observados: Doenças mieloproliferativas ou linfoproliferativas.</p>

3.5 - Estudo laboratorial das anemias

Define-se anemia como a diminuição da hemoglobina para concentrações abaixo do limite inferior do intervalo de referência que varia em função da idade sexo e estados fisiológicos (tabela 10). Pode estar associada a uma redução no número de eritrócitos ou à diminuição do hematócrito, embora seja a concentração de hemoglobina que define a existência de anemia ^(9, 10).

Tabela 10 – Valores de referência de hemoglobina e hematócrito de acordo com idade.

	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
6-59 meses	11	33
5-11 anos	11,5	34
12-14 anos	12	36
Mulheres > 15 anos	12	36
Mulheres grávidas	11	33
Homens (> 15 anos)	13	39

3.5.1 - Classificação das anemias

As anemias são classificadas principalmente pela sua fisiopatologia e morfologia, sendo que a combinação destas abordagens é geralmente utilizada para determinação do diagnóstico diferencial inicial.

A classificação fisiopatológica das anemias é baseada em parâmetros como diminuição ou ineficiência de produção, destruição (hemólise) ou perda eritrocitária. As principais causas de anemia segundo esta classificação estão descritas na tabela II ^(7, 10).

Tabela II - Classificação fisiopatológica das anemias.

Diminuição da produção	Anemias hemolíticas	
1- Falência medular Anemia aplástica Aplasia da série vermelha	1- Defeitos da hemoglobina Hemoglobinopatias: Anemia falciforme, talassemias, outras	Perda sanguínea
2-Invasão medular Neoplasias - leucemias, Mielofibrose	2- Defeitos de membrana Esferocitose, Eliptose	
3- Diminuição da produção de eritropoetina Doença renal crónica Hipotireoidismo, Hipopituitarismo Inflamação crónica Desnutrição	3- Defeitos do metabolismo Deficiência G6PD e piruvato-quinase	
4- Doenças da maturação eritróide e eritropoiese ineficaz Deficiência de ferro; Anemias sideroblásticas; Intoxicação por chumbo Deficiência de Vit. B12 Deficiência de ácido fólico	4- Mediada por anticorpos 5- Mecânicas Anemia hemolítica microangiopática 6- Infecção (Malária) 7- Agentes químicos e físicos 8- Hemoglobinúria paroxística noturna	

Em relação à classificação morfológica das anemias estas são diferenciadas pelo tamanho e conteúdo citoplasmático de hemoglobina nos eritrócitos. Classificam-se em microcíticas/hipocrómicas, normocíticas/normocrómicas e macrocíticas (tabela 12). A avaliação dos índices eritrocitários e observação microscópica de células anormais constituem os principais parâmetros no despiste deste tipo de anemias, embora sejam necessárias avaliações complementares para determinar a sua origem ^(7, 10).

Tabela 12 – Classificação morfológica das anemias.

Microcítica Hipocrômica	Normocítica Normocrômica	Macrocítica
VGM <80; HGM <27	VGM <80-90; HGM > 27	VGM > 100
<ul style="list-style-type: none">- Deficiência em Ferro- Inflamação crônica- Talassémia	<ul style="list-style-type: none">- Anemias hemolíticas- Anemia de doenças crônicas- Falência medular	<ul style="list-style-type: none">- Défice de Vitamina B12 e folatos- Doenças hepáticas- Anemia perniciosa

3.5.2 - Diagnóstico diferencial laboratorial

A conjugação entre a história clínica do doente e a avaliação dos testes laboratoriais é essencial para o diagnóstico diferencial das anemias.

No que respeita à história clínica do doente, a obtenção de informações sobre hábitos de dieta, toma de medicação, etnia, episódios diarreicos ou de perda de sangue pelas fezes, perda de peso, palidez das mucosas e cansaço fácil e antecedentes familiares, são indicadores muito importantes que facilitam o diagnóstico da doença na rotina laboratorial ^(7, 10).

Quanto aos exames laboratoriais, o hemograma com contagem reticulocitária, observação do ESP, estudo da cinética do ferro e entre outros parâmetros representados na tabela 12 assumem elevada importância para o estabelecimento de um possível diagnóstico laboratorial diferencial.

A contagem de reticulócitos representa um indicador de atividade eritropoética. Ele pode ajudar a distinguir anemias relacionadas à baixa produção e consequente redução da contagem de reticulócitos daquelas associadas à destruição eritrocitária (aumento da contagem de reticulócitos) ⁽⁷⁾.

Quando se suspeita de anemia por deficiência de ferro o estudo da cinética do ferro é efetuado de modo a evidenciar esta causa de anemia com alta taxa de prevalência. Este estudo implica o doseamento do ferro sérico, capacidade total da ligação do ferro para se calcular a saturação da transferrina. O doseamento da ferritina para avaliar os depósitos de

ferro também pode ser solicitada. Vale lembrar que a ferritina é uma proteína de fase aguda e pode estar aumentada em processos inflamatórios e infecciosos ⁽¹⁰⁾.

Na suspeita de anemias hemolíticas a dosagem de bilirrubina indireta, desidrogenase láctica, haptoglobina e teste de Coombs, são provas essenciais para o despiste deste tipo de patologias ⁽⁷⁾.

Nas anemias megaloblásticas são indicadas a dosagem de ácido fólico, vitamina B₁₂, provas de função hepática, renal e de endocrinologia (função tireoidiana) ⁽⁷⁾.

Os principais exames laboratoriais realizados no diagnóstico diferencial das anemias e sua interpretação são mostrados na tabela 13.

Tabela 13 – Exames laboratoriais realizados no diagnóstico diferencial das anemias.

Exames laboratoriais	Interpretação
Contagem de reticulócitos	Diminuída - Anemias hipoproliferativas Aumentada - Anemias hemolíticas ou perda aguda
Ferro sérico	Diminuído: anemia ferropénica Aumentado: Sobrecarga de ferro, transfusões
HPLC	HbS – anemia falciforme, síndromes falciformes (Sβ-talassemia, hemoglobinopatia SC) HbH – alfa-talassemia HbA ₂ aumentada – beta-talassémia e outras síndromes talassémicas
Dosagem de bilirrubina indireta, desidrogenase láctica (LDH)	Aumentadas nas anemias hemolíticas
Teste de Coombs	Positivo nas anemias hemolíticas Auto-ímmunes
Dosagem de folato, vitamina B12	Anemias megaloblásticas
Provas de função renal, hepática, hormonais (TSH, hormonas sexuais)	Anemias secundárias
Pesquisa de sangue oculto nas fezes	Anemia por perda sanguínea
Pesquisa de anticorpos Anti-factor intrínsecos e células parietais	Anemia perniciosa

3.6 - Estudo das hemoglobinopatias

A hemoglobina humana é formada por quatro subunidades de cadeias peptídicas idênticas duas a duas, designadas por globinas. Cada uma das subunidades está ligada ao grupo heme ao qual se liga o oxigênio. O tipo de hemoglobina é determinado pela sua composição em cadeias globínicas ⁽¹¹⁾:

- HbA: duas cadeias α e duas β ($\alpha_2\beta_2$)
- HbA2: duas cadeias α e duas δ ($\alpha_2\delta_2$)
- Hb fetal (HbF): cadeias α e com duas γ ($\alpha_2\gamma_2$)

Nos adultos normais, a HbA é o tipo de hemoglobina mais abundante representado 97-98% da hemoglobina total; HbA2 conta com aproximadamente 2,5% e HbF com cerca de 1%. No recém-nascido, existe cerca de 60-85% de HbF que será substituído por HbA, aproximadamente 1 ano após o nascimento ⁽¹²⁾.

As hemoglobinopatias constituem o grupo de doenças monogénicas recessivas mais difundido a nível mundial. Têm origem em mutações que afetam diretamente os genes associados à síntese das cadeias de globina da hemoglobina, podendo resultar em alterações da sua síntese, onde se incluem as síndromes talassémicas, ou em mudanças estruturais, como nos casos de drepanocitose ⁽¹²⁾.

Desordens nas cadeias de globina são comuns e constituem um problema de saúde pública. O seu estudo pode ser pedido:

- 1- Para confirmar um diagnóstico presuntivo, como drepanocitose ou β -talassemia;
- 2- Para explicar uma anomalia hematológica verificada durante a elaboração do hemograma, como a anemia ou microcitose/hipocromia de origem desconhecida;
- 3- Para identificar a anomalia numa fase pré-sintomática, como no rastreio neonatal;
- 4- Para identificar fetos com alto risco de hemoglobinopatias e orientar os pais;
- 5- Para permitir aconselhamento genético em futuros pais;
- 6- Para identificar a presença de hemoglobina S.

3.6.1 - Diagnóstico laboratorial

Sempre que existe suspeita de uma hemoglobinopatia, é realizado um hemograma completo, com observação do esfregaço de sangue periférico. É um dos primeiros testes, cujos resultados podem levantar fortes suspeitas de hemoglobinopatias.

Indivíduos com hemoglobinopatias podem apresentar uma menor concentração de hemoglobina, quando comparados com indivíduos saudáveis, apresentando ainda microcitose e hipocromia. As anemias microcíticas decorrentes de anemia ferropénica são caracterizadas por uma elevação do RDW, contrariamente às talassemias que tendem a produzir eritrócitos microcíticos mas sem grandes variações de tamanho. Este facto pode variar consoante a síndrome talassémica, no entanto, observa-se um notável aumento do RDW em casos de Hb H e $\delta\beta$ -talassemia ^(11, 12).

O ESP revela a presença de células hipocrómicas e microcíticas, podendo apresentar células em alvo ou células com pontuado basófilo através de depósitos de hemoglobina insolúvel no citoplasma eritrocitário ⁽¹¹⁾.

Laboratorialmente a identificação presuntiva de hemoglobinopatias é realizada por HPLC no equipamento Tosoh G8 (figura 10), sendo posteriormente feita uma comparação dos resultados obtidos com o quadro clínico do doente, a sua etnia e com os resultados do hemograma e esfregaço sanguíneo.



Figura 10 - HPLC – Autoanalizador Tosoh G8.

A HPLC é um tipo de cromatografia em que as interações iónicas e hidrofóbicas da amostra com a matriz da coluna são a base da separação. Estas interações entre a amostra e a coluna permitem a separação dos diferentes tipos de hemoglobinas através da sua carga (positiva) e consequente absorção para uma fase estacionária (coluna) carregada negativamente, seguida pela sua eluição por meio de uma fase móvel. A fase móvel é um líquido com uma concentração crescente de cations que migra através fase estacionária. Os cations da fase móvel competem, pelos sítios de ligação aniónicos, com as proteínas absorvidas eluindo deste modo as moléculas de hemoglobina a um ritmo diferente que dependente da sua afinidade para com a fase estacionária. Quanto mais carregadas positivamente estiverem as hemoglobinas, maior será o tempo de retenção. Ao serem separadas são detectadas por um sistema óptico, identificadas através do seu tempo de retenção e quantificadas pela medição do pico correspondente através da utilização de *software* específico. Esta metodologia assume elevada importância na identificação de variantes de hemoglobina pois para cada variante, assim como para a hemoglobina normal, existem tempos de retenção característicos ^(1, 13).

Este equipamento assegura a separação das hemoglobinas A, A2, F, S, C, D e H. No entanto, as hemoglobinas E e Lepore podem co-eluir com a Hb A2 e a HB S pode apresentar o mesmo tempo de retenção que a Hb A2. O facto de existirem mais de 1000 variantes de hemoglobinas e pelas razões mencionadas em cima faz com que a HPLC não possa identificar, definitivamente, nenhuma hemoglobinopatia. Deste modo o diagnóstico final deve ser sempre feito com base em estudos genéticos de modo a completar as limitações da HPLC e melhor contribuir para um correto diagnóstico ^(6, 13).

3.6.2 - Doseamento da hemoglobina glicosilada

A Direção Geral de Saúde (DGS) recomenda a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) para o diagnóstico e monitorização da Diabetes Mellitus ⁽¹⁴⁾.

Clinicamente, a HbA1c é a fração da hemoglobina maioritariamente monitorizada. O doseamento da hemoglobina HbA1c assume particular interesse no diagnóstico e classificação da Diabetes Mellitus, bem como, na monitorização do índice de glicose em indivíduos já diagnosticados. Uma elevada concentração de glicose sanguínea durante longos

períodos de tempo, leva à ocorrência de um processo de glicação não enzimático da hemoglobina ⁽¹⁴⁾.

A HbA1c está dependente do tempo de semivida dos eritrócitos, sendo o seu doseamento um bom indicador dos valores de glicemia atingidos nos 2 a 4 meses precedentes à análise. Neste contexto, esta determinação assume não só um papel importante no diagnóstico da doença como permite uma avaliação retrospectiva da eficácia da terapêutica diabética ⁽¹⁴⁾.

A HbA1c é um componente menor da Hb, sendo encontrada em indivíduos adultos não-diabéticos em uma proporção de 1% a 4% dos indivíduos normais. Na prática, os valores normais de referência vão de 4% a 6%. De acordo com a norma da DGS diagnóstico de diabetes é feito se Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$ ⁽¹⁴⁾.

Laboratorialmente o doseamento da HbA1c é determinado por HPLC, estando esta sujeita a vários interferentes que podem alterar os seus valores reais. De entre os vários interferentes destacam-se:

Limitações do método

Hemoglobinas Variantes ou Modificadas

- Pacientes portadores de variantes heterozigóticas da hemoglobina (por exemplo hemoglobinas C, S, E, D, F) podem levar a resultados erróneos por inibição no processo de glicação ou por interferência na deteção da HbA1c;
- Para pacientes portadores de hemoglobinopatias homozigóticas, a determinação da HbA1c não é aplicável independentemente do método utilizado pela diminuição dos níveis de HbA sendo necessário, nestes casos, a utilização de testes alternativos.

Diminuição da Sobrevivência dos Eritrócito

Doenças que provocam redução aguda do número de eritrócito ou diminuição do seu período de vida (uma perda de sangue aguda, anemia hemolítica) levam a uma diminuição dos valores de HbA1c independentemente da metodologia aplicada, uma vez que a diminuição da sobrevivência dos eritrócitos, diminui a sua exposição à glicose, sendo este quadro acentuado pela resposta reticulocitária da medula óssea (os reticulócitos são células jovens que não foram expostas à glicose)⁽⁶⁾.

Quando detetadas estas situações no laboratório e caso tenha amostra de soro é realizado de imediato a frutossamina, caso não haja amostra adequada recomenda-se a sua obtenção. O mecanismo de formação da frutossamina é semelhante ao da formação da hemoglobina glicosilada, possuindo a mesma importância diagnóstica mas relativa a um período de tempo inferior de aproximadamente 3 semanas (período de vida média).

3.7- Estudo da coagulação

3.7.1 - Hemostase

A hemostase é um conjunto de eventos que envolve a interação entre a parede dos vasos, as plaquetas, fatores de coagulação, os inibidores da coagulação e o sistema fibrinolítico em resposta a uma lesão vascular. O sistema hemostático é extremamente controlado, de modo a manter um equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes. Uma alteração nesse equilíbrio pode dar origem a eventos hemorrágicos ou trombóticos⁽¹⁵⁾.

A resposta hemostática divide-se em hemóstase primária, secundária e fibrinólise:

- A hemóstase primária é mediada pela ação dos vasos sanguíneos e das plaquetas circulantes responsáveis pela formação do trombo plaquetário. Após um evento de lesão vascular, as plaquetas aderem ao tecido endotelial e são ativadas, promovendo a adesão e agregação das plaquetas. A adesão ao colagénio exposto pela lesão e a agregação de plaquetas faz-se mediante as glicoproteínas da membrana plaquetar (GpIIb-IIIa) e o fator de von Willebrand e resulta na formação do primeiro coágulo plaquetário. Este coágulo é instável, sendo então necessário o apoio da fibrina⁽¹⁵⁾.

- A hemóstase secundária é um processo que depende de proteínas que circulam no plasma na forma inativa, designadas de fatores de coagulação, as quais ao serem ativadas desencadeiam uma cascata enzimática da coagulação. Todo este processo é bastante complexo e envolve várias reações, algumas das quais dependentes de Ca^{2+} e de determinadas moléculas (como os fosfolípidos), culminando na formação de um coágulo de fibrina ⁽¹⁵⁾.

- A fibrinólise é o processo responsável pela dissolução do coágulo pela ação da plasmina, que provoca a hidrólise da fibrina ⁽¹⁵⁾.

Anormalidades na função hemostática podem dever-se a doenças vasculares, trombocitopenia, alteração da função plaquetária ou defeitos nos fatores de coagulação ou fibrinolíticos do sangue ⁽¹⁵⁾.

3.7.2 - ACL TOP 500

O ACL TOP 500 (figura II) é um analisador de testes de coagulação automatizado, multiparamétrico, que utiliza métodos coagulimétricos, cromogénicos e imunoquímicos:



Figura II – ACL TOP 500.

- **Método coagulométrico** – mede o tempo necessário para a formação da fibrina, a qual é detetada por turbidimetria a 671 nm. É o método utilizado para a maioria das provas de coagulação de rotina.

- **Método cromogénico** – a utilização de substratos cromogénicos permite medir a atividade enzimática da Proteína C (PC) e Antitrombina III (ATIII) pela formação de substratos coloridos que são detetados por fotometria.

Método imunológico – Baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que vão aumentar a turvação da amostra sendo esta proporcional à concentração do analito. É usado na determinação dos D-dímeros e Proteína S (PS).

3.7.3 - Testes de Coagulação de rotina

Normalmente, são solicitados para investigação de pacientes com hemorragias agudas, suspeita de tendência hemorrágica, como indicador de risco hemorrágico antes de um procedimento invasivo ou para a monitorização da terapêutica. Englobam também o estudo de produtos de degradação da fibrina em doentes com suspeita de tromboes venosas, tromboembolismo pulmonar e coagulação vascular disseminada.

Estes testes englobam o Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), Tempo de Trombina (TT) e o Fibrinogénio (FIB) e os D-dímeros.

3.7.3.1 - Tempo de Protrombina (PT) – este teste permite avaliar a via extrínseca e a via comum da coagulação e controlar a terapia anticoagulante oral. A determinação deste parâmetro é feita através da adição de extrato de fator tecidual, a tromboplastina, e cálcio em excesso a uma amostra de plasma citratado, medindo-se o tempo de formação do coágulo. Assim mede-se a formação de trombina a partir da protrombinase, na presença dos fatores II (protrombina), V, VII e X. Alterações ao nível do TP estão representadas na tabela I4 ⁽¹⁵⁾.

Os resultados são expressos, além do tempo em segundos e em percentagem. Como o valor de referência do TP varia com o reagente utilizado, isto é, podem obter-se valores de TP diferentes quando as amostras são analisadas com tromboplastinas provenientes de diversas fontes e/ou quando se utilizam diferentes técnicas analíticas (manual, semi ou totalmente automatizadas). Deste modo o ICSH (Comité Internacional para a Padronização da Hematologia) e o ICTH (Comité Internacional sobre Trombose e Hemostase) propuseram o ISI para calcular o RNI (Ratio International Normalizado) e deste modo obter resultados de TP comparáveis em doentes com terapêutica anticoagulante oral, independentemente do reagente utilizado. Cada lote de tromboplastina é calibrado com o padrão interno, com um ISI certificado de acordo com o padrão de referência internacional ⁽⁶⁾.

3.7.3.2 - Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) – permite a avaliação da via intrínseca e comum da coagulação. Consiste no tempo de recalcificação de um plasma citratado na presença de uma quantidade de fosfolípidos e de um ativador do factor XII (sílica). Este ativador vai estimular a produção de fator XIIa, que na presença cloreto de sódio adicionado vai desencadear as reações enzimáticas que levam à formação do coágulo. É usado para a deteção de deficiências ou presença de inibidores dos fatores da via intrínseca e comum, bem como para a monitorização do uso de anticoagulantes como a heparina e screening do anticoagulante lúpico. Alterações ao nível do APTT estão representadas na tabela 14 ⁽¹⁵⁾.

3.7.3.3 - O tempo de trombina (TT) - avalia o tempo de coagulação após a adição de trombina ao plasma, a qual catalisa a conversão do fibrinogénio em fibrina. Este parâmetro pode surgir aumentado em situações de hipofibrinogénemia, disfibrinogénemia ou por inibidores da trombina, nomeadamente a heparina, cuja presença induz um prolongamento acentuado (tabela 14) ⁽¹⁵⁾.

3.7.3.4 - Fibrinogénio C – o FIBC é uma proteína plasmática precursora da fibrina que, polimerizada, constitui o principal componente do coágulo de fibrina. É uma proteína da fase inflamatória aumentado em estados infecciosos ou inflamatórios constituindo assim um risco no desenvolvimento de doenças trombóticas. Encontra-se diminuído em casos de afibrinogénemia, e insuficiências hepáticas graves ⁽¹⁵⁾.

Tabela 14 – Principais condições que afetam os testes de coagulação de rotina.

PT	APTT	TT	FIB	Condições possíveis
↑	N	N	N	Défice fator VII Terapêutica anticoagulante oral precoce
N	↑	N	N	Défice fator VIII, IX, XI, XII ou fator de contato Anticorpo Lúpico
↑	↑	N	N	Défice do fator II, V ou X Anticoagulantes orais Défice combinado dos fatores V e VIII Défice de múltiplos fatores (e.g. falha hepática) Hipovitaminose K
↑	↑	↑	N/↓	Hipo- ou disfibrinogénemia Heparina Doença hepática CIVD

↑, aumentado; ↓, diminuído; N, normal; PT, Tempo de Protrombina; APTT, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada; TT, Tempo de Trombina; FIB, Fibrinogénio; LA, Anticorpo Lúpico; CIVD, Coagulação Intravascular Disseminada

3.7.3.5 - Doseamento de D-Dímeros – resultam de produtos de degradação da fibrina através da ação da plasmina sobre a fibrina com a presença de fator VII. É um parâmetro muito solicitado pelo serviço de urgência para o despiste de eventos trombóticos ⁽¹⁵⁾.

3.7.4 - Estudo da trombofilia

As trombofilias são definidas como predisposição à trombose venosa, ou, ocasionalmente, arterial, devido a alterações hematológicas indutoras de hipercoagulabilidade sanguínea, podendo ser hereditárias ou adquiridas. Caracterizam-se individualmente por uma grande variabilidade fenotípica, mesmo quando ocorrem no seio da mesma família, variando desde as formas assintomáticas às formas clínicas graves ⁽¹⁶⁾. Os principais fatores de risco encontram-se representados na tabela 15.

Tabela 15 – Principais fatores de risco associados a eventos trombofílicos.

Adquiridos	Hereditários
Idade avançada	Deficiência de antitrombina
Trauma ou Cirurgia	Deficiência de proteína C
Imobilização prolongada	Deficiência de proteína S
Neoplasias malignas	Factor V de Leiden e Resistência à proteína C activada
Gravidez e puerpério	Mutação G20210A da protrombina
Anticonceptivos orais	Disfibrinogenemia
Terapia de reposição hormonal	Hiperhomocisteinemia*
Síndrome dos anticorpos antifosfolípidos*	Elevação dos níveis plasmáticos do factor VIII da coagulação*
Hiperviscosidade	
Doenças mieloproliferativas	
Síndrome nefrótico	
Resistência à proteína C activada não relacionada com alteração no gene do factor V	
Hiperhomocisteinemia leve a moderada	
Hemoglobinúria paroxística nocturna	
*Podem ter factores etiológicos hereditários e/ou adquiridos	

3.7.4.1 - Parâmetros realizados no estudo da trombofilia

Doseamento da Antitrombina III (ATIII) - é o principal inibidor fisiológico da coagulação sanguínea e é muito importante na eficácia da terapêutica anticoagulante com heparina. A ATIII tem proteases de coagulação (trombina, FXa e FIXa) que atuam de forma inibitória e evitam a coagulação descontrolada e possíveis acidentes trombóticos. Os níveis baixos de ATIII estão relacionados com o aumento do risco de doenças tromboembólicas ⁽¹⁷⁾.

Doseamento da Proteína C – a PC é dependente da vitamina K e encontra-se presente no plasma inativo, sendo ativada *in vivo* pela trombomodulina e *in vitro* por uma fração proteica derivada de um veneno de cobra. O déficit desta proteína encontra-se associado a trombozes venosas recorrentes, especialmente em jovens adultos, desordens hepáticas, terapia com anticoagulante oral e coagulações intravasculares disseminadas ⁽¹⁷⁾.

Doseamento da Proteína S – é um cofator da PC ativada, aumentando os seus efeitos anticoagulantes e fibrinolíticos. Encontra-se presente no plasma sob duas formas, a proteína S livre e a proteína S ligada à proteína transportadora da fração C4b do complemento (C4BP), sendo que apenas a forma livre tem atividade biológica ⁽¹⁷⁾.

Análise de Síndromes anti-fosfolipídicos - Os anticoagulantes lúpicos pertencem ao grupo dos anticorpos anti-fosfolipídicos que são dirigidos contra fosfolípidos com carga negativa ou complexos entre fosfolípidos e proteínas. Os doentes com este tipo de anticoagulantes têm riscos elevados de contrair doenças como trombose e abortos recorrentes ⁽¹⁷⁾.

Os ensaios HemosIL dRVVT Screen e Confirm são produtos de diagnóstico *in vitro* qualitativo para ajudar na deteção de anticoagulantes lúpicos no plasma humano citratado através do método do veneno diluído da víbora Russell. Estes dois ensaios (Screen e Confirm) têm como objetivo avaliar doentes com resultados prolongados e sem causa aparente, nos testes de APTT.

3.8 - Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é a velocidade medida, em mm/hora, a que os eritrócitos sedimentam no plasma. Depende de diversos fatores que influenciam a capacidade de agregação dos eritrócitos, como a concentração e o tipo de proteínas plasmáticas, o tamanho e a forma das células ⁽⁶⁾.

É um teste muito utilizado na rotina laboratorial embora seja um teste com baixa sensibilidade e especificidade. No entanto, é simples, apresenta um baixo custo e é importante como teste auxiliar para detetar e monitorizar condições inflamatórias ^(6, 10).

Em situações normais, os eritrócitos tendem a repelir-se devido à carga negativa da superfície da célula. Quando há um aumento de proteínas plasmáticas carregadas positivamente, essa repulsão tende a ser neutralizada e desenvolve-se o fenómeno de *rouleaux* com um aumento da VS. Este fenómeno de repulsão ocorre sobretudo devido a um aumento de proteínas de fase aguda, no entanto, um aumento da VS não é uma consequência exclusiva do aumento das proteínas de fase aguda, podendo ocorrer devido a outras situações como anemia, mieloma múltiplo e situações fisiológicas como a gravidez e idade avançada, o que lhe confere uma baixa especificidade ⁽⁶⁾.

3.8.1 - VES MATIC CUB80 DIESSE

O equipamento VES MATIC CUB80 DIESSE é utilizado para determinar a velocidade de sedimentação medindo a velocidade com que os eritrócitos se depositam por feixe de luz utilizando o método de referência para a obtenção de velocidade de sedimentação- método de Westergren modificado em sangue total EDTA, segundo as recomendações do ICSH.



Figura 12 - VES MATIC CUB80 DIESSE

3.9 – Controlo de qualidade

3.9.1 - Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) consiste no conjunto de procedimentos adotados num laboratório, com vista a garantir a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Tem como objetivo a validação dos métodos analíticos e aplicação de medidas corretivas, caso seja necessário.

O controlo interno é efetuado diariamente, antes do processamento das amostras. As amostras fornecidas por laboratórios de referência referem normalmente três níveis distintos: um nível alto, um nível médio e um nível baixo, com os respetivos valores bem definidos. A avaliação dos resultados do CQI baseia-se nos valores das bulas dos controlos, e na interpretação de cartas de Levey-Jennings através da aplicação das regras de Westgard.

3.9.2 – Controlo de qualidade externo

A avaliação externa da qualidade é um controlo inter-laboratorial que consiste na avaliação dos resultados do laboratório por um organismo exterior. Tem como principal objetivo verificar a exatidão dos dados analíticos comparando o desempenho do laboratório com o de outros laboratórios que utilizem os mesmos métodos a nível nacional e internacional.

Programas de participação de controlo de qualidade externo:

- UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service): contagens totais automáticas; contagem diferencial leucocitária automático; contagem de reticulócitos automática; contagem diferencial leucocitária manual; estudo morfológico de ESP; estudo de parasitas do sangue; estudo de hemoglobinopatias; teste rápido da malária; determinação da VS.

IV – Imunologia

4.1 - Caracterização do Laboratório de Imunologia

O laboratório de Imunologia dedica-se fundamentalmente ao estudo de doenças autoimunes e alergologia.

Quanto à equipa de trabalho esta é formada por Técnicos de Análises Clínicas com formação especializada para laborar neste sector onde desenvolvem tarefas referentes à fase pré-analítica e analítica, assistentes operacionais, administrativos e Técnicos Superiores de Saúde (especialistas) responsáveis por todo o processo de laboração do serviço, assumindo as principais funções: visualização de lâminas de fluorescência, interpretação de todos os parâmetros efetuados, repetições de resultados e introdução de novos parâmetros complementares ao estudo, interpretação e validação da avaliação interna e externa da qualidade, validação biopatológica dos resultados e assegurar o apoio clínico solicitado.

4.2 - Equipamentos e metodologias

O serviço de imunologia está equipado com dois equipamentos de quimioluminescência, um equipamento para a realização imunoblots, um equipamento de ELISA, um equipamento para ensaios fluoroenzimáticos (FEIA) e um equipamento automático para processamento de lâminas por Imunofluorescência Indireta (IFI).

Os ensaios imunológicos utilizados neste laboratório baseiam-se em reações anticorpo-antígeno que usam fases sólidas de captura, onde são formados imunocomplexos marcados que posteriormente são detetados e quantificados por diversos mecanismos (figura 13).

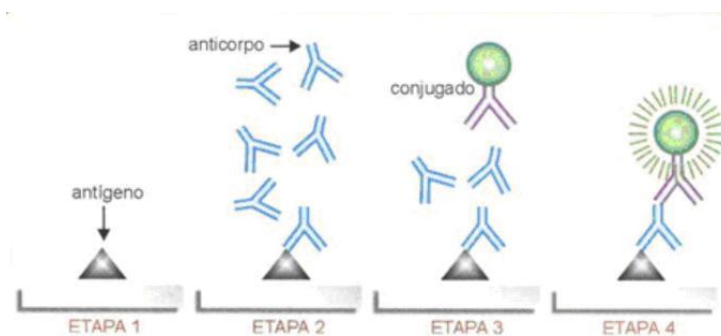


Figura 13 – Esquema ilustrativo de uma reação de imunofluorescência indireta

4.2.1 - ELISA

O imunoensaio enzimático ELISA é um dos métodos mais utilizados para a detecção e quantificação de anticorpos e antígenos, sendo processados automaticamente pelo equipamento Triturus (figura 14).

Este método utiliza microplacas (fase sólida) sensibilizadas com antígenos/anticorpos específicos, que ao entrarem em contacto com antígenos ou anticorpos presentes na amostra formam imunocomplexos que vão ser detetados enzimaticamente por um conjugado (Anti globulina Humana (AGH) conjugada a uma enzima), que ao degradar um substrato incolor origina uma solução corada que é proporcional à quantidade de anticorpo ou antígeno presente na amostra. A quantificação é efetuada por fotometria.



Figura 14 – Equipamento de ELISA automático – TRITURUS.

4.4.2 - Imunofluorescência Indireta (IFI)

Esta técnica utiliza lâminas onde estão fixados os antígenos complementares aos anticorpos que se pretendem detetar. O processo é todo ele efetuado automaticamente pelo equipamento QUANTA LISER (figura 15).

Após adição de soro do doente previamente diluído à lâmina de fluorescência, se a amostra apresentar anticorpos estes vão sensibilizar os antígenos presentes na lâmina. Após uma lavagem inicial para remover todos os anticorpos inespecíficos, é adicionado um conjugado (AGH conjugada a um fluorocromo - FITC), que vai formar um imunocomplexo que pode ser detetado por microscopia de fluorescência.

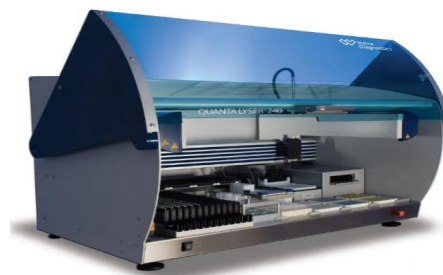


Figura 15 – Equipamento automático de processamento de lâminas de fluorescência por IFI – QUANTA LISER.

4.2.3 – Imunoblots

São imunoenaios que usam proteínas recombinantes ou péptidos sintéticos, aplicados diretamente em membranas (suporte sólido). O processamento do ensaio é feito de forma automática no equipamento EUROBlotOne (figura 16) em que numa fase inicial a amostra é diluída e colocada em contacto com as tiras. Depois de uma primeira etapa de lavagem das tiras de forma a remover aos anticorpos não ligados, é adicionado o conjugado (AGH conjugado a uma enzima) para formar um imunocomplexo que após a adição do substrato forma um composto corado na superfície da tira onde se formou o imunocomplexo.



Figura 16 – Equipamento de Imunoblots – EUROBlotOne

4.2.4 - Quimioluminescência

Esta tecnologia usa uma fase sólida de micropartículas paramagnéticas revestidas com antigénio/anticorpos, e é utilizada pelos equipamentos Liaison XL e BioFlash (figura 17). Quando o soro entra em contacto com as partículas paramagnéticas, dá-se uma reação antigénio-anticorpo, formando um imunocomplexo específico, que, por

magnetismo vai ser separado da restante amostra para posteriormente ser detetado após adição de um conjugado (AGH conjugado a uma enzima) que degrada um substrato quimioluminescente adicionado, gerando emissão de luz, cuja intensidade é proporcional à concentração do analito a quantificar.



Figura 17 – Equipamento de Quimioluminescência: BioFlash.

4.2.5 - Ensaios fluoroenzimáticos (FEIA)

Os ensaios fluoroenzimáticos (FEIA) são executados no equipamento Immunocap 250 (figura 18) para o diagnóstico e monitorização de doenças autoimunes e alérgicas. Estes ensaios utilizam poços revestidos com antígenos específicos para um determinado anticorpo, que caso esteja presente na amostra do utente irá ligar-se aos antígenos, formando um complexo antígeno-anticorpo. É adicionado um segundo anticorpo anti-imunoglobulina humana, conjugado com a enzima β - galactosidase, que se irá ligar a este complexo. Por fim, é adicionado o substrato da enzima, o 4- metilumbeliferil- β -D- galactosídeo, que ao ser convertido origina um produto fluorescente, que é posteriormente lido por um fluorómetro.



Figura 18 – Equipamento por FEIA – Immunocap 250.

4.3 - Doenças autoimunes

As doenças autoimunes (DAI) são um grupo de doenças clinicamente heterogêneo, difíceis de diagnosticar e que incluem quadros que vão desde uma lesão limitada a um órgão ou tecido até formas com afeção multi-sistémica. Estão descritas mais de 100 doenças autoimunes ⁽¹⁸⁾.

4.3.1 - Doenças autoimunes sistémicas

As DAI sistémicas caracterizam-se pelo aparecimento de autoanticorpos dirigidos contra componentes celulares que se encontram distribuídos por todo o organismo, ou seja, têm uma expressão multifocal ⁽¹⁸⁾. Estas doenças comportam essencialmente as conectivites ou doenças do tecido conjuntivo e algumas vasculites (tabela 16).

Tabela 16 – Principais DAI sistémicas e anticorpos associados ⁽¹⁹⁾.

ANTICORPO	DOENÇAS AUTOIMUNES SISTEMICAS
ANA (Anticorpos anti-nucleares)	LES; SS; ES; MI; AR; SAF; DMTC; CBP; CE
Anti-dSDNA	LES; SS; SAF
Anti-nucleossomas	LES
Anti-Sm	LES; SS
Anti UI -RNP	LES; SS; MI
Anti-RoS2	LES; SS; ES
Anti-SSA/SSB	SS; LES
Anti-Ribossomal-P Protein	LES
Anti-Ku	LES; MI
Fator Reumatóide	SS; AR; LES
Anti-centrómero	ES
Anti-SL70	ES
Anti-RNA-Pol-III	ES
Anti-Jo-1	MI
Anti-Mi1	
Anti-Mi-2	
ANCA	V; CE
Anti-MPO, PR3	
Anti-MBG	V
Anti-citrulina (CCP)	AR
Anticoagulante lúpico	SAF
Anti-cardiolipina (IgG/IgM)	
Anti-B2 glicoproteína I (IgG/IgM)	
Anti-mitocôndrias tipo 2	CBP

LES: lúpus eritematoso sistémico; **SS:** síndrome de Sjogren; **ES:** Esclerose Sistémica; **MI:** Miopatia Inflamatória; **AR:** Artrite Reumatóide; **SAF:** Síndrome Antifosfolípídica; **DMTC:** Doença Mista do Tecido Conjuntivo; **CBP:** Cirrose Biliar Primária; **CE:** Colangite Esclerosante; **V:** Vasculite.

4.3.1.1 - Anticorpos Anti Nucleares (ANA)

A pesquisa laboratorial de anticorpos anti nucleares (ANA) obedece ao algoritmo representado na figura 19. O primeiro passo no diagnóstico laboratorial de doenças autoimunes implica a determinação de ANA por IFI, por ser uma técnica muito sensível e específica. A maioria dos ANA apresenta isótipo IgG, a detecção de IgM e IgA não aumenta a sensibilidade mas pode reduzir a especificidade ⁽²⁰⁾.

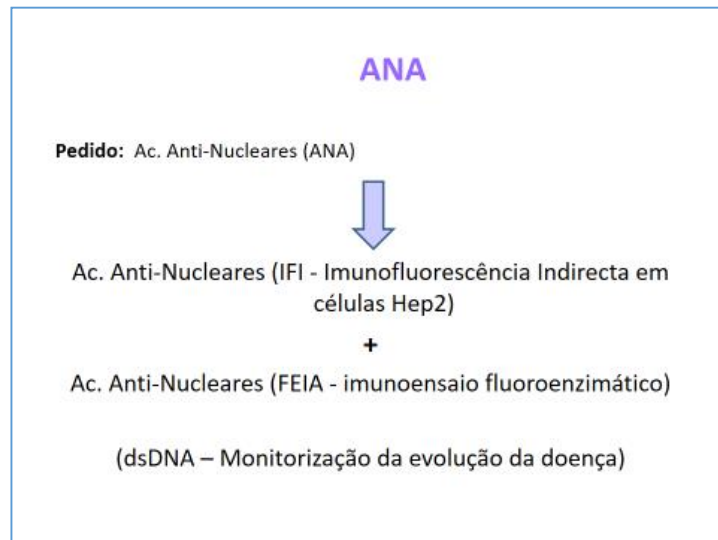
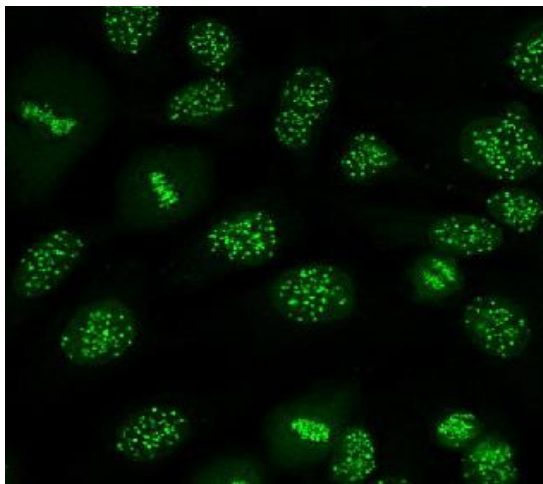


Figura 19 – Algoritmo de trabalho para a pesquisa de ANA.

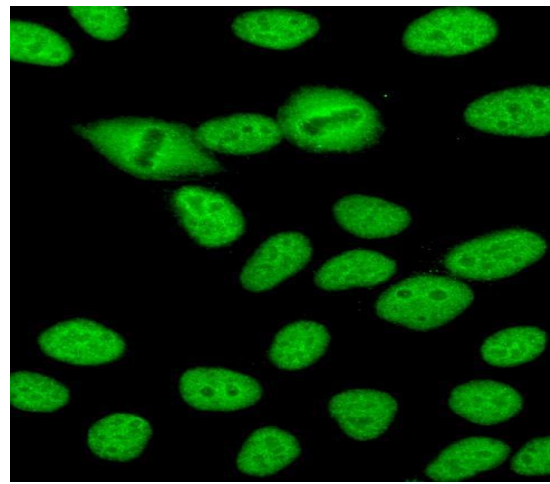
Na pesquisa por IFI são usadas lâminas com poços com substrato antigénico HEP-2 (linha celular epitelial Humana) e um conjugado FITC anti-AGH que dão origem a padrões de fluorescência específicos (nuclear, mitótico e citoplasmático) (figura 20). As lâminas são avaliadas em microscópio de fluorescência com uma ampliação de 400x.

A grande vantagem na utilização deste substrato inespecífico para testes tão importantes como os relacionados com estas patologias, é o seu valor de rastreio para os ANA uma vez que são altamente sensíveis fornecendo uma quantificação semi-quantitativa. Só os títulos superiores a 1:160 devem ser considerados positivos. Títulos baixos de ANA são encontrados com frequência em pessoas saudáveis (especialmente grávidas, mulheres com mais de 40 anos e pessoas idosas) e noutras doenças (infecções virais, doenças do fígado e diferentes tipos de cancro). Em crianças pode ter valor a deteção de anticorpos a títulos mais baixos como 1/80 ⁽¹⁸⁾.

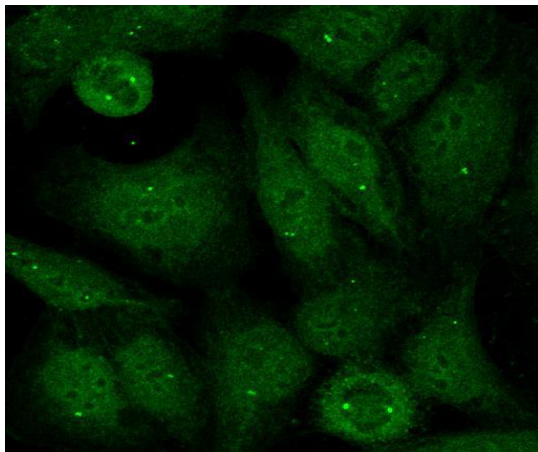
Os resultados de ANA devem ser reportados com o título de diluição da amostra mais elevado e com o padrão nuclear e mitótico observado. Nos casos de padrões mistos devem ser reportados os diferentes títulos associados aos diferentes padrões de fluorescência. A presença de resultados citoplasmáticos (homogêneo, granular, mitocondrial ou de citoesqueleto) deverá ser reportada num campo à parte dos ANA e devem também conter o título de diluição de amostra e o padrão observado. Este setor tem implementado a nomenclatura ICAP (International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns) para a caracterização dos padrões de fluorescência.



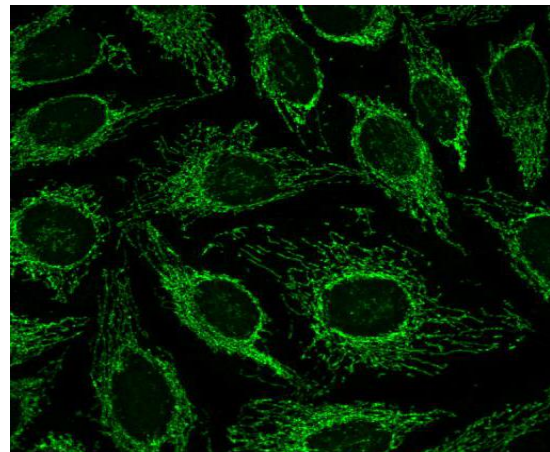
A)



B)



C)



D)

Figura 20 – Padrões de fluorescência observados nas células Hep2. A) Padrão Nuclear Centrômero, B) Padrão Nuclear Mosqueado Fino, C) - Padrão Centrossoma, D) Padrão Citoplasmático Reticular (Tipo Mitocondrial).

Adicionalmente à pesquisa de ANA por IFI a pesquisa destes autoanticorpos engloba também um screening por FEIA devido à possibilidade de encontrar resultados

falsos negativos por IFI em doentes com doenças dos tecidos conectivos. Isto deve-se ao facto de haver antigénios muito solúveis (SSA/Ro) e antigénios expressos em muito baixas concentrações (Jo-1) ⁽¹⁸⁾.

O screening inicial por FEIA contempla os seguintes antigénios: ADN nativo purificado, UIRNP, (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, Centrómero B, Scl-70, Jo-1, Fibrilarina, RNA Pol III, Rib-P, PM-Scl, PCNA, Proteínas Mi-2, Proteínas Sm. Caso o teste de screening seja positivo, inicia-se a pesquisa individual dos anticorpos específicos de acordo com o tipo de padrão visualizado.

Nos casos com IFI positivo e screening inicial por FEIA negativo realizam-se teste diferenciais por imunoblot que possuem painéis alargados de antigénios que não se encontram presentes nos testes de screening. O tipo de padrão visualizado condiciona a escolha do imunoblot a realizar. Presentemente o serviço dispõe de painéis para a pesquisa de anticorpos associados às doenças miopáticas (miosites), à esclerose sistémica e ao Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) (tabela 17).

Tabela 17 – Imunoblots – Doenças sistémicas. Anticorpos pesquisados

Imunoblots		
Miosites	Esclerose Sistémica	LES
Mi-2β, Ku, PM-Scl100 PM-Scl75 Jo-1 SRP PL-7 PL-12 EJ OJ Ro-52	Scl-70 CENP A CENP B RPI I RPI55 Fibrillarina NOR90 Th/To PM-Scl100 PM-Scl75 Ku, PDGFR Ro-52	nRNP/Sm Sm SS-A Ro-52 SS-B Scl-70 PM-Scl Jo-1 CENPB PCNA dsDNA, Nucleossomas Histonas Rib-P P-protein AMA M2

Na rotina laboratorial aparecem muitos casos com IFI positiva nos quais, mesmo recorrendo a painéis alargados para a pesquisa de anticorpos não se consegue identificar os anticorpos associado à fluorescência. Este facto deve-se à existência de padrões de fluorescência que não se relacionam com doença autoimune, como no caso do padrão

mosqueado fino denso com mitoses positivas. Este padrão está muitas vezes relacionado com o antigénio DFS70, que é uma proteína de união ao DNA e a sua positividade aparece em indivíduos saudáveis ⁽²¹⁾.

4.3.1.2 - Anticorpos anti-dsDNA

Os títulos de anticorpos anti-dsDNA assumem uma relação com a atividade do LES. Doentes com esta patologia devem quantificar os títulos deste anticorpo com uma frequência de 6 a 12 semanas de forma a controlarem a atividade da doença. Na rotina laboratorial os anticorpos anti-dsDNA após o diagnóstico são inicialmente quantificados por IFI com lâminas de *Crithidia luciliae* (técnica mais específica) e confirmados por quimioluminescência, sendo as titulações posteriores efetuadas apenas por quimioluminescência (figura 21).

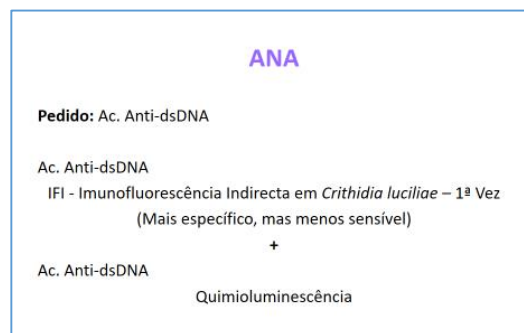


Figura 21 – Algoritmo para a determinação de anticorpos anti-dsDNA.

As lâminas de *Crithidia luciliae* apresentam um protozoário unicelular e uniflagelado que apresenta uma mitocôndria periférica gigante (cinetoplasto) que contém apenas elevadas quantidades dsDNA, tratando-se deste modo um ensaio altamente específico para a pesquisa destes autoanticorpos embora careça de alguma sensibilidade (figura 22). Títulos superiores a 1:10 são considerados clinicamente significativos.



Figura 22 – Resultado positivo para dsDNA por IFI.

4.3.1.3 - Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)

Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA) são importantes marcadores serológicos para certas vasculites de pequenos vasos. São autoanticorpos produzidos contra os componentes citoplasmáticos dos neutrófilos, em particular, os constituintes dos grânulos. Podem ser divididos em dois grupos, os anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO) e os anticorpos Anti-Proteinase (PR3) ⁽²²⁾.

As vasculites autoimunes são um grupo de doenças sistêmicas heterogêneas, caracterizadas pela inflamação na parede dos vasos sanguíneos. Como consequência do processo inflamatório o vaso afetado poderá obstruir, formar trombos ou até romper terminando em isquemia. A classificação das vasculites é dificultada pela ausência de etiopatogênese bem estabelecida. OS ANCA representam um marcador laboratorial muito importante no diagnóstico e monitorização da atividade inflamatória das vasculites sistêmicas primárias dos pequenos vasos, nomeadamente a granulomatose de Wegener, poliangiite microscópica e glomerulonefrites ^(22,23).

Na pesquisa laboratorial de ANCA é efetuada uma quantificação inicial de PR3 e MPO por quimioluminescência. Este método de deteção (automático) fornece uma resposta rápida ao clínico na suspeita de doenças vascular autoimune. Quando se detetam resultados positivos, cabe ao responsável do serviço informar de imediato o clínico. Em alternativa aos testes por quimioluminescência, são efetuados ensaios por IFI em neutrófilos fixados em etanol (figura 23).



Figura 23 – Algoritmo para a determinação de ANCA.

A titulação das amostras em IFI é importante uma vez que pode relacionar-se a atividade da doença, sendo a diluição inicial recomendada de 1:20. Os ANCA são classificados em dois subtipos principais de acordo com o padrão em IFI:

- Padrão c-ANCA: O padrão citoplasmático é mais frequentemente causado por anticorpos PR-3 e está associado a um diagnóstico de granulomatose com poliangite ⁽²⁴⁾.

- Padrão p-ANCA: padrão perinuclear com extensão nuclear, que é decorrente da reatividade contra várias enzimas, entre elas a catepsina, elastase, lactoferrina e catepsina G, proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI) e em maior frequência contra MPO. O padrão pANCA é um artefacto causado pela fixação do etanol, no qual as membranas granulares são rebentadas e proteínas carregadas positivamente migram para o núcleo carregado negativamente ^(23,24).

É importante referir se o padrão observado em IFI é perinuclear ou citoplasmático, uma vez que o padrão perinuclear pode estar associado a outras patologias como na colite ulcerosa, doença de Crohn, hepatite crónica artrite reumatoide e LES ⁽²⁴⁾.

Existem depois outros padrões de fluorescência denominados ANCA atípicos. Os C-ANCA atípicos não têm significado clínico mas os P-ANCA atípicos (muito periféricos) aparecem na doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide e alguns tipos de vasculite induzida por drogas e nos quais só há positividade nas lâminas fixadas com etanol e metanol. Para pesquisar os antigénios associados aos ANCA atípicos, o setor dispõe de um painel alargado de antigénios (técnica de ELISA) para a deteção dos respetivos autoanticorpos. Para além do MPO e PR3 este painel contempla também a lactoferrina, elastase, catepsina e o BPI ^(23,24).

4.3.1.4 - Anticorpos anti-fator reumatoide e anti-peptídeo citrulinado

A artrite reumatoide é uma doença autoimune, sistémica, crónica e progressiva, caracterizada pela inflamação das articulações. Causa a perda da forma e do alinhamento das articulações, resultando em dor e inchaço e podendo levar à destruição irreversível da articulação e conseqüente incapacidade. As manifestações características da doença incluem rigidez, inchaço, dor e limitação do movimento, principalmente nas articulações das mãos,

pés, joelhos, ombros e pescoço ⁽¹⁸⁾.

A fisiopatologia da doença envolve a ligação de autoanticorpos contra a porção Fc da IgG que formam imunocomplexos ao nível das articulações que medeiam respostas inflamatórias contribuindo assim para o processo da doença ⁽²⁵⁾.

A presença de autoanticorpos, tais como o fator reumatoide (FR) e anti-peptídeo citrulinado cíclico (CCP) podem preceder as manifestações clínicas da arterite reumatóide em muitos anos (entre 6 e 9 anos). As alterações estruturais capazes de serem observadas por radiografia e outras técnicas imagiológicas são normalmente inexistentes nas primeiras fases da doença. O início precoce da terapêutica pode prevenir o dano articular e por isso a utilização de testes de diagnóstico capazes de permitir o diagnóstico precoce da doença são muito importantes ⁽²⁵⁾.

O diagnóstico da arterite reumatóide envolve ensaios de FEIA representados na figura 24. O FR constitui anticorpos dirigidos contra a porção Fc da imunoglobulina IgG. Na rotina laboratorial são doseados anticorpos anti-FR das classes IgM e IgA. A determinação do FR é bastante sensível para a arterite reumatoide, mas com especificidade limitada. Pacientes com diversas outras doenças (LES, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica, polimiosite, hepatites crônicas, endocardites e infecções virais crônicas) podem apresentar FR. Indivíduos saudáveis também podem apresentar FR, normalmente em títulos baixo a moderado, sendo a prevalência mais alta entre pessoas de maior idade.

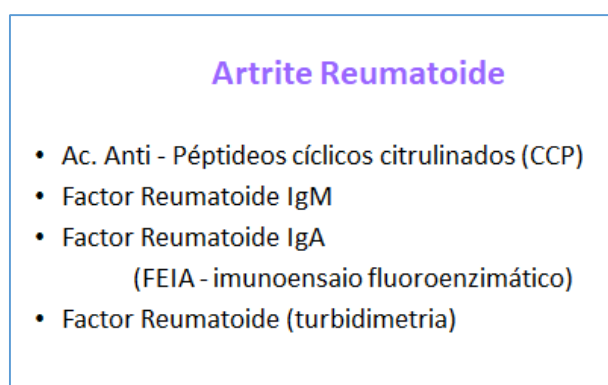


Figura 24 - Parâmetros de diagnóstico da artrite reumatoide.

Os anticorpos anti-CCP reagem contra antígenos proteicos citrulinados presentes nas membranas sinoviais, e em diversos outros tecidos inflamatórios. O CCP apresenta

uma especificidade superior em relação ao FR embora também seja encontrado em outras patologia (LES, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica, polimiosite, hepatites crônicas, endocardites e infecções virais crônica e tuberculose) mas em menor percentagem em relação ao FR. Quanto à sua sensibilidade, apresenta resultados semelhantes ao FR ⁽¹⁸⁾.

4.3.1.5 - Anticorpos anti-cardiolipina e anti-β2-Glicoproteínas

O síndrome antifosfolípídico (SAF) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por trombose arterial ou venosa recorrente e/ou morbidade gestacional acompanhadas pela presença persistente de anticorpos anti-fosfolípidos. Pode ocorrer em associação com outra doença autoimune, mais frequentemente o LES, ou ser observada de forma isolada.

Os testes laboratoriais para detecção de anticorpos anti-fosfolípidos incluem ensaios laboratoriais que detetam anticorpos anti-cardiolipinas (aCL), anticoagulante-lúpico e anticorpos anti-β2-glicoproteína (β2GP) (figura 25). Os ensaios para a determinação de aCL IgG e IgM, β2GP IgG e IgM e anticoagulante lúpico são os ensaios definidos nos critérios de classificação revistos e determinados pela Comissão Internacional para o diagnóstico de SAF na reunião realizada em 2006 em Sidney, na Austrália. As diretrizes atuais continuam a preconizar a determinação destes parâmetros ⁽²⁶⁾.

Síndrome antifosfolípídico

- Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (AL) – 2 testes coagulimétricos:
 - a) Teste coagulimétrico com veneno de víbora de Russel (dRVVT)
 - b) APTT sensível ao AL (com baixos níveis de fosfolípidos, o que aumenta a sensibilidade do reagente à presença de AL – e sílica como activadores)

Positivo – se um dos testes for positivo
(recomenda-se repetição 12 semanas após)

- Ac. Anti-Cardiolipina IgG e IgM (Quimioluminescência)
- Ac. Anti- β2 Glicoproteína 1 IgG e IgM (Quimioluminescência)

Figura 25 - Testes laboratoriais para o detecção de anticorpos anti-fosfolípidos.

4.3.2 - Doenças hepáticas Autoimunes

Os anticorpos relacionados com o fígado são cruciais para o correto diagnóstico e classificação das doenças hepáticas autoimunes, nomeadamente as hepatites autoimunes tipos 1 e 2 e a cirrose biliar primária (tabela 18).

A hepatite autoimune tipo 1 está relacionada com a presença de anticorpos ANA e anticorpos anti músculo liso de actina (SMA). Os anticorpos anti-microsossomais do fígado tipo-1 (LKM-1) e anti- citosol do fígado tipo 1 (anti-LC1) estão associados a hepatite autoimune tipo 2. A pesquisa de anticorpos anti-antígenos solúveis do fígado e pâncreas (SLA/LP) é um marcador de hepatite autoimune tipo 1 e tipo 2 que está associado a um mau prognóstico ⁽²⁷⁾.

A cirrose biliar primária é caracterizada pela presença de anticorpos anti-mitocondriais (AMA) com especificidade pela subunidade E2 do complexo piruvato e pela presença de ANA característicos da doença que reagem com o poro nuclear gp210 e com o corpo nuclear sp100 ⁽²⁷⁾.

Tabela 18 – Principais autoanticorpos associados às doenças hepáticas autoimunes

Antígenos	Patologia	Outras patologias hepáticas
AMA-E2 Gp210 Sp100	Cirrose biliar primária	Hepatite C Colangite esclerosante primária
ANA SMA	Hepatite Autoimune 1	Hepatite C
LKM-1 LC-1	Hepatite Autoimune 2	
SLA/LP	Hepatite Autoimune 1 e 2	

Diagnóstico

O diagnóstico das doenças hepáticas autoimunes obedece ao algoritmo de trabalho representado na figura 26. A técnica recomendada como screening de primeira linha destes anticorpos é a IFI em tecidos (fígado, rim e estômago de rato) por permitirem a pesquisa em conjunto de todos os auto-anticorpos relevantes nas doenças do fígado (SMA, ANA, anti-LKMI, AMA e anti-LC1).

A utilização de células Hep-2 por IFI também é importante por permitir encontrar padrões associados a estas doenças (exemplo padrão múltiplos dots nucleares). Na rotina laboratorial, nos screenings de ANA são encontrados com frequência este tipo de padrões sugestivos de doença hepática. Nestes casos é feito um estudo complementar com o perfil hepático completo para o despiste patológico.

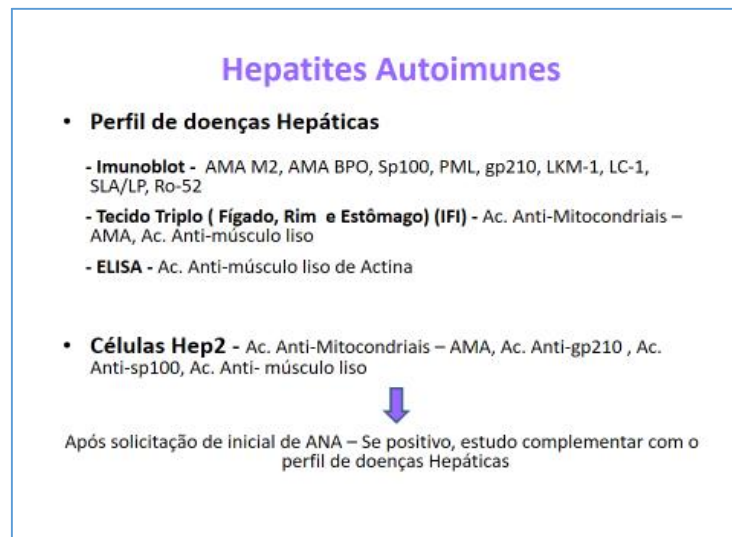


Figura 26 – Algoritmo de estudo das doenças hepáticas

A realização de imunoblots e técnicas de ELISA (pesquisa de SMA) constituem métodos alternativos na pesquisa dos principais autoanticorpos associados às doenças hepáticas autoimunes.

É importante notar que pode haver resultados positivos que se relacionam com outras condições como hepatites virais crônicas B, C e D, falha hepática aguda, hepatite induzida por drogas, esteato-hepatite não alcoólica, doenças do fígado induzidas pelo abuso de álcool, carcinoma hepatocelular e uma grande variedade de outras doenças não relacionadas com o fígado, pelo que os resultados devem ser sempre interpretados no contexto clínico ⁽²⁷⁾.

4.3.3 - Doença celíaca

A doença celíaca é uma desordem sistêmica mediada pelo sistema imunitário. Esta patologia é desencadeada pelo glúten e pelas prolaminas com ele relacionadas, em indivíduos com suscetibilidade genética. Caracteriza-se pela presença de manifestações

clínicas variáveis que dependem do glúten, pela presença de anticorpos específicos, pela presença dos haplotipos HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 e por enteropatia ⁽²⁸⁾.

Diagnóstico

Para o diagnóstico da doença celíaca (figura 27) o sector de imunologia procede à determinação dos anticorpos anti-transglutaminase (TG) (IgA/IgG), e anticorpos anti-gliadina (DPG) (IgA/ IgG) por quimioluminescência e dos anticorpos anti-endomísio (EMA) por IFI (IgA). Nos casos de deficiência de IgA (posteriormente determinada), a pesquisa de EMA é realizada também no sentido de identificar anticorpos EMA da classe IgG.

Doença Celíaca

- Ac. Anti-Gliadina Desaminada IgG e IgA (Quimioluminescência)
- Ac. Anti-Transglutaminase IgG e IgA (Quimioluminescência)
- Ac. Anti-Endomísio IgA (IFI em esófago distal de primata)
- IgA

Se déficit de IgA:

- Ac. Anti-Endomísio IgG (IFI em esófago distal de primata)

Figura 27 – Teste realizados para o diagnóstico da doença celíaca.

Na determinação dos EMA por IFI são preparadas e observadas lâminas com secções de esófago de macaco. Estes anticorpos reagem contra a substância que envolve as miofibrilas da musculatura lisa formando um padrão de fluorescência semelhante à reticulina ou a um componente da superfície das miofibrilas (figura 28).

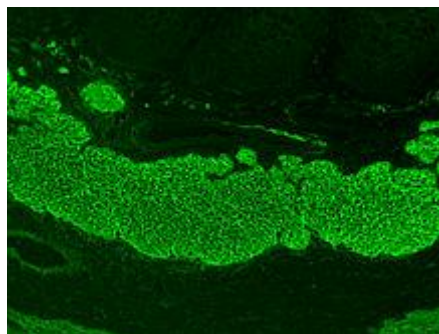


Figura 28 – Anticorpos anti- endomísio – IFI

4.3.4 - Gastrite autoimune e anemia perniciosa

A gastrite autoimune é uma doença caracterizada pela atrofia do corpo e do fundo do estômago desencadeada pela presença de autoanticorpos contra as células gástricas parietais ⁽²⁹⁾.

A anemia perniciosa é consequência de uma gastrite atrófica autoimune, predominantemente do fundo gástrico, que resulta numa deficiência de vitamina B12 devido à sua má absorção. Os anticorpos anti-fator intrínseco têm um papel primordial para o desenvolvimento de anemia perniciosa através da deficiência de vitamina B12 induzida por eles ⁽²⁹⁾.

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de Gastrite autoimune e anemia perniciosa encontra-se representado na figura 29. A técnica de referência para este tipo de patologias é a IFI através da detecção de autoanticorpos em tecido triplo, que se associam às células parietais do estômago. Para complementar o estudo são determinados imunoenaios por FEIA.

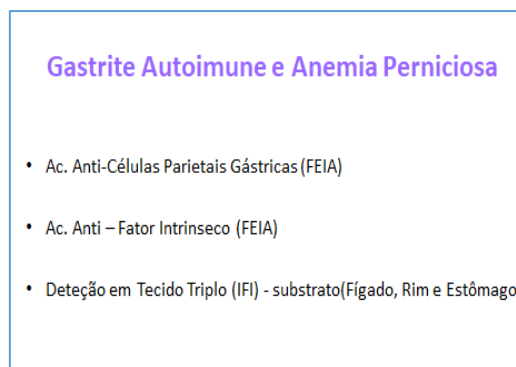


Figura 29 – Parâmetros avaliados para o diagnóstico da gastrite autoimune e anemia perniciosa.

4.3.5 - Doenças inflamatórias intestinais

A pesquisa de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (IgA/IgG) por IFI permite em conjunto com os resultados de pANCA e calprotectina fecal orientar o diagnóstico de uma possível doença inflamatória intestinal como colite ulcerosa ou Doença de Crohn.

A combinação laboratorial de pANCA positivo e ASCA negativo é específico para colite ulcerosa, enquanto no caso se se verificar um resultado de ASCA positivo e pANCA negativo é específico para a Doença de Crohn ⁽³⁰⁾.

A calprotectina é uma proteína presente no citoplasma de células envolvidas na defesa contra patógenos. Nos granulócitos dos neutrófilos a calprotectina corresponde a cerca de 60% das proteínas citosólicas. Na inflamação intestinal os neutrófilos migram pela parede intestinal para o lúmen intestinal, resultando num nível elevado de calprotectina nas fezes. O nível de calprotectina fecal tem correlação direta com o número de granulócitos neutrofílicos no lúmen intestinal e, portanto, está especificamente elevado nas doenças inflamatórias intestinais. Apresenta-se também como biomarcador na monitorização da doença inflamatória ⁽³¹⁾.

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial encontra-se representado na figura 30.

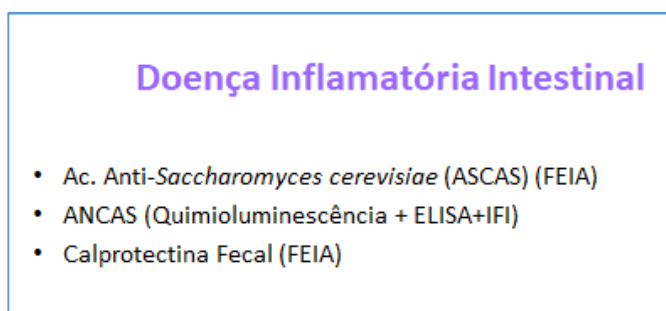


Figura 30 – Parâmetros avaliados para o diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais.

4.4 - Alergologia

A doença alérgica é atualmente um problema de saúde a nível mundial. Atinge uma proporção importante da população e, por razões ainda pouco documentadas, a prevalência desta doença está a aumentar. Os fatores exógenos melhor conhecidos e considerados mais importantes no aumento desta prevalência, incluem os próprios alérgenos, as infeções, a poluição atmosférica e os hábitos de vida, de que são exemplo os hábitos tabágicos, a utilização de antibióticos, a obesidade, o sedentarismo e as alterações da flora bacteriana

intestinal. A predisposição genética é considerada também um fator importante no aparecimento da doença alérgica.

4.4.1- Diagnóstico laboratorial

Os testes de diagnóstico laboratorial são uma ferramenta importante para o diagnóstico clínico da doença alérgica, uma vez que permitem identificar os doentes sensibilizados, estratificar o risco e seguir a evolução da doença e da terapêutica. Além disso permitem identificar quais os alérgenos para os quais o doente está sensibilizado, permitindo criar estratégias de evicção, que constituem a solução mais efetiva para prevenir reações alérgicas.

4.4.1.1 - Quantificação de IgE total

A IgE total é um mediador da resposta alérgica e a sua quantificação no soro, quando em conjunto com outros indicadores clínicos, pode fornecer informações úteis para o diagnóstico clínico diferencial de doentes sensibilizados e não sensibilizados. Assim, doentes que apresentam reações alérgicas de tipo I apresentam níveis elevados de IgE total no soro.

4.4.1.2 - Quantificação de IgE específica

Apenas indivíduos sensibilizados podem desenvolver doença alérgica mediada por IgE e como tal, a IgE específica (por revelar sensibilização a alérgenos suspeitos) é de grande ajuda no diagnóstico da doença alérgica. Os testes de quantificação de IgE específica para determinado alérgeno permitem avaliar se um determinado indivíduo está ou não sensibilizado para o alérgeno em apreciação.

- Pedidos de alérgenos alimentares: a quantificação de IgE específica obedece a uma pesquisa inicial com testes de screening multi-alimentares com os principais alérgenos associados às alergias alimentares. Caso o screening seja positivo procede-se à determinação dos alérgenos individuais. Nos casos de pedidos de alergia ao leite e ao ovo deverão fazer-se sempre (leite e ovo total respetivamente) e em caso de positividade destes testes, considera-se uma mais-valia a realização das proteínas específicas do leite bem como a

realização dos testes clara e gema por ser possível ao médico recomendar ao doente a evicção destes alimentos.

- **Pedidos de alergénios inalantes:** em todos os casos deverá começar-se pelo teste de screening multi-inalante e em caso de positividade continua-se o estudo com os testes individuais.

4.5 - Controlo de qualidade

4.5.1 - Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno consiste no conjunto de procedimentos adotados num laboratório, com vista a garantir a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Tem como objetivo a validação dos métodos analíticos e aplicação de medidas corretivas, caso seja necessário. Diariamente são controladas as técnicas efetuadas com controlos fornecidos pelas diferentes casa comerciais.

4.5.2 - Controlo de qualidade externo

A avaliação externa da qualidade é um controlo inter-laboratorial que consiste na avaliação dos resultados do laboratório por um organismo exterior. Tem como principal objetivo verificar a exatidão dos dados analíticos comparando o desempenho do laboratório com o de outros laboratórios que utilizem os mesmos métodos a nível nacional e internacional.

Programas de participação de controlo de qualidade externo:

- UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service).

V – Bioquímica

O laboratório de bioquímica está integrado numa área designada de Corelab em conjunto com o Laboratório de Hematologia. O Corelab encontra-se dividido nas seguintes áreas:

- Área pré-analítica: responsável pela receção de produtos biológicos, centrifugação, aliquotagem e distribuição de amostras pelas diferentes áreas laboratoriais.
- Área analítica: destina-se ao processamento dos parâmetros solicitados.
- Área pós-analítica: assegura a interpretação e validação da avaliação interna e externa da qualidade, validação biopatológica dos resultados e apoio clínico solicitado.

O laboratório de bioquímica está equipado com um equipamento de pré-analítica (Accelerato P540) e uma vasta gama de equipamentos para a fase analítica que utilizam tecnologia de ponta para a determinação dos vários parâmetros processados nesta área laboratorial (tabela 19).

Tabela 19 – Equipamentos e parâmetros realizados no laboratório de bioquímica

Equipamentos	Parâmetros
Alinity C (4x)	Ionograma, Perfil hepático Perfil renal, Perfil pancreático Perfil lipídico Metabolismo do ferro Proteínas séricas Drogas terapêuticas Drogas de abuso
Alinity I (3x)	Perfil endócrino, Metabolismo do ferro Marcadores cardíacos Marcadores tumorais Serologia Infeciosa Drogas terapêuticas
Optilite	Proteínas séricas
Capillarys	Eletroforese de proteínas Imunossupressão
Vidas 3	Serologia Infeciosa
Sysmex UF - 4000	Química urinária
Sysmex	Sedimento Urinário
Radiometer ABL 90 Flex	Gasometrias

VI – Microbiologia

O sector de Microbiologia é constituído por duas unidades laboratoriais distintas: o laboratório de Microbiologia e o laboratório de Micobactérias. Dedicase fundamentalmente ao estudo de doenças infecciosas e respetivos patogénios. Labora a tempo inteiro de segunda a sexta das 9h às 24h e aos sábados das 9h às 17h, sendo que as restantes horas funcionam a título parcial e apenas para processamento cultural de amostras.

6.1- Laboratório de Microbiologia

Neste laboratório existem os seguintes equipamentos:

- Bactec™ 9120 Blood Culture System da BD ® - sistema de deteção automatizada em hemoculturas;
- VITEK® 2 Compact da Biomerieux ® - sistema automatizado de identificação bacteriana e antibiograma;
- PolyStainer® - aparelho de corar lâminas - utilizado na coloração de Gram (e Auramina);
- 2 Câmaras de Segurança Biológica;
- 2 Centrífugas;
- 2 Microscópios óticos;
- Analisador automático por imunofluorescência – SOFIA da Werfen ®.

No que diz respeito à organização, as amostras recebidas são separadas e processadas de acordo com os protocolos para cada produto biológico, cuja finalidade compreende o isolamento em cultura do microrganismo causador de infeção e posterior identificação e determinação de sensibilidade aos antibióticos.

Fase analítica

Compreende todo o processo laboratorial implicado no isolamento, identificação e teste sensibilidade aos antibióticos.

Exame Diretos:

- A fresco, para avaliar de uma forma rápida a presença de bactérias, fungos, parasitas, células epiteliais, leucócitos, etc
- Coloração de GRAM
- Coloração de LEISHMAN

Exame cultural

Depois de escolhidos, tendo em conta o microrganismo que se espera encontrar como patógeno, os meios de cultura são inoculados com produto biológico, semeados através da técnica de sementeira apropriada, e colocados a incubar em estufa sob condições específicas de temperatura, O₂ e CO₂.

Testes de identificação presuntiva

Testes que orientam e/ou ajudam a fazer uma identificação presuntiva, que, muitas vezes, ajudam o clínico a escolher atempadamente uma terapêutica empírica mais adequada e ajudam o profissional de laboratório a decidir qual o próximo passo da marcha neste processo de identificação de microrganismos patogénico. São exemplos de testes de identificação presuntiva:

- Teste da catalase
- Teste da coagulase
- Teste da oxidase
- Teste de sensibilidade à optoquina
- Teste da urease
- Testes de grupagem para identificação de *Streptococcus spp.*

Identificação automatizada

- Sistema automatizado de identificação bacteriana VITEK® 2 Compact Biomerieux ®

Testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

- Sistema automatizado - Sistema VITEK® 2 Compact da Biomerieux
- Método de Kirby-Bauer / E-tests

Outros testes Laboratoriais

- Teste imunoenzimáticos para deteção do antígeno comum (glutamato-desidrogenase) do *C. difficile* e da toxina A em amostras fecais humanas.
- Ensaio imunoenzimáticos ImmunoCard para deteção das toxinas A e B de *C. difficile* em amostras fecais humanas.
- Teste imunocromatográfico com anticorpos monoclonais contra o antígeno VP6 do grupo A de rotavírus.
- Teste de aglutinação em látex para identificação do serogrupo O157 da *Escherichia coli*.
- Imunoensaio para a deteção de toxina Shiga produzida por *E. coli* O157 em amostras de fezes humanas ou a partir de culturas.
- Identificação das espécies *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* através de testes bioquímicos e serológicos dos seus lipopolissacarídeos.
- Identificação de espécies e serotipos utilizando testes bioquímicos e testes de seroaglutinação utilizando anti-soros polivalentes somáticos (O) e flagelares (H).
- Deteção de antígenos solúveis e identificação de bactérias associadas a meningite (*Neisseria meningitidis*, A, B/E *coli* KI, C, Y/W 135, *Haemophilus influenzae* Tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus grupo B*) por técnica de aglutinação em látex Pastorex Meningitis, a partir de amostras de LCR.

6.2 - Laboratório de Micobacteriologia

Neste laboratório existem os seguintes equipamentos:

- Bactec MGIT 960 da BD ® - sistema automatizado de detecção de micobactérias;
- PolyStainer® - aparelho de corar lâminas - utilizado na coloração de Auramina;
- 1 Câmara de Segurança Biológica;
- 2 Incubadoras;
- 1 Centrífuga;
- 1 Microscópio ótico
- 1 Microscópio de fluorescência.

Neste laboratório a identificação de *Mycobacterium tuberculosis* é feito com recurso a técnicas de diagnóstico que passam pela visualização dos “bacilos álcool-ácido resistente” no exame direto e pelo seu isolamento no exame cultural.

Exames diretos

- Coloração de Ziehl-Neelsen
- Coloração por Auramina com recurso a microscopia de fluorescência.

Exame cultural

- Meio líquido, meio de MGIT
- Meio sólido Lowenstein-Jensen.
- Testes sensibilidade aos antibióticos

São efetuados testes de sensibilidade aos antibióticos de primeira linha (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina; Etambutol e Pirazinamida) em culturas em meio líquido com recurso ao sistema automatizado BD BACTEC™ MGIT™.

VII – Conclusão

A minha passagem pelo Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins - Guarda foi uma experiência muito gratificante e enriquecedora uma vez que reforçou o meu contacto com a dinâmica da atividade laboratorial em contexto hospitalar e com diversas realidades clínicas.

Durante o estágio tive a oportunidade de acompanhar todo o processo de análise e a validação biopatológica e deste modo concluir que os resultados reportados representam uma elevada importância, na medida em que diariamente este serviço é solicitado para diversas análises necessárias para sustentar as teses de diagnóstico clínico.

VI - Bibliografia

1. BAIN, B., ET AL. **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 11^a Ed. Elsevier, 2012.
2. SYSMEX CORPORATION. **Analisador de Hematologia Automático XE-5000 - Instruções de Utilização**. Sysmex Corporation, (2007).
3. SYSMEX CORPORATION. **Hematologia**. [Acedido a 28/08/2022]. Disponível na internet: <https://www.sysmex.es/espt/academia/knowledgecentre/tecnologia/citometria-de-fluxo-com-fluorescencia.html>.
4. BAIN, B. **Blood Cells: A Practical Guide**. 5^a Ed., Wiley Blackwell, 2015.
5. MCPHERSON, R AND PINCUS, M. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais de Henry**. 21^a Ed. Manole, 2012.
6. BAIN, B. **A Beginner's Guide to Blood Cells**. 2^a Ed, Blackwell publishing, 2015.
7. TURGEON, M. **Clinical Hematology Theory & Procedures**. 6^a Ed, Wolters Kluwer, 2018.
8. KEOHANE, E., ET AL. **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 5^a Ed. Elsevier Saunders, 2016.
9. B. Benoist, E. **Worldwide prevalence of anemia 1993-2005, Geneva: Global database on anemia**. WHO, (2008).
10. R. FAILACE, F. FERNANDES. **Hemograma - manual de interpretação**. 6^a Ed. Artmed, 2015.
11. RYAN K., ET AL. **Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis**. British Journal of Haematology.149, (2010), 35 – 49.
12. CLARKE G, HIGGINS T. **Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update**. Clinical Chemistry, 46 (2000), 1284 -1290.
13. Manual do equipamento Tosoh G8.

14. GEORGE F. **Prescrição e determinação da hemoglobina glicada.** Direção Geral de Saúde (DGS). 033/2011, (2013).
15. HOFFBRAND A., MOSS P. **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand.** 7ª Ed. Artmed, Porto Alegre, 2018.
16. GLORIA F., AMARO M. **Trombofilias: importância do seu estudo na patologia tromboembólica.** Medicina interna, Sociedade Portuguesa de Medicina interna. 15, (2007), 284 – 290.
17. Silva A., et al. **Distúrbios pró-trombóticos/Trombofilias.** Medicina interna, Sociedade Portuguesa de Medicina interna. 17, (2008), 49 - 64.
18. BUITRAGO J. **Enfermidades Autoimunitárias Y Autoanticuerpos.** Sociedade Espanola de Bioquímica Clínica Y patologia Molecular. SEQ, (2000).
19. BARROS C. **Anticorpos nas doenças autoimunes sistémicas.** Guia do internista na medicina interna. [Acedido a 28/08/2022]. Disponível na internet:
<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/36807/1/Autoanticorpos%20nas%20Doen%C3%A7as%20Autoimunes%20sist%C3%A9micas.pdf>
20. TOZZOLI R, et al. **Directrices for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases.** American Journal of Clinical Pathology. 117, 2 (2002), 316 – 324.
21. MAHLER M. ET AL. **Clinical pynotypes of patients whit DFS70 antibodies as an exclusive biomarket for sytemic autoimmune diseases.** Association of Medical Laboratory Immunologists. 24, (2021).
22. SALVADOR F. **ANCA associated vasculitis.** European Journal Rheumatology. 74, (2020), 18-28.
23. PAGNOUX C. **Updates in ANCA-associated vasculitis.** European Journal Rheumatology. 3, (2016), 122-133.

24. HAGEN C, ET AL. **Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis, EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization.** *Kidney International.* 53, (1998), 743–753.
25. TOZZOLI R, ET AL. **Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases.** *American Journal of Clinical Pathology.* 117, 2 (2002), 316–324.
26. MIYAKIS S. ET AL. **International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).** *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 4, (2006), 295 – 306
27. DIMITRIOS B. ET AL. **Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges.** *World Journal Gastroenterol.* 14, (2008), 3374-3387.
28. HUSBY S. ET AL. **European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease.** *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 54, (2012), 136 -160.
29. ANDRES E, SERRAJ K. **Optimal management of pernicious anemia.** *Journal of Blood Medicine.* 3, (2012), 97-103.
30. RUEMMELE, F. M. ET AL. **Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease.** *Journal of Crohn's and Colitis.* 8, (2014), 1179–1207.
31. GAYA, D. R. ET AL. **Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity.** *An International Journal of Medicine.* 98, (2005), 435 – 441.

