



Marta Inês Mendes da Silva

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mário João Gonçalves Roque e pela Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Marta Inês Mendes da Silva

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo
Dr. Mário João Gonçalves Roque e pela Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo e
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

O presente relatório de estágio do Mestrado em Análises Clínicas não poderia ter chegado ao fim sem o apoio incondicional de várias pessoas. Por isso, expresso aqui a minha gratidão a todas elas.

Primeiramente, à Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo Maia, pela confiança, disponibilidade e incentivo na superação dos meus limites.

Ao Tenente Coronel Dr. Mário João Gonçalves Roque, pela colaboração inestimável e apoio que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, coordenadora do curso, a minha sincera gratidão.

A toda a equipa de Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, pela forma como fui recebida, pela disponibilidade em material de apoio e pelo acesso às instalações, obrigada.

À minha família, meus pais Avelino e Filomena, pelo apoio incondicional que sempre demonstraram, pois sem eles não teria sido possível, às minhas irmãs, Ana e Catarina, pela amizade e carinho.

Por fim, os meus mais sinceros agradecimentos ao meu namorado Fernando por ter sido o meu porto, pela paciência, compreensão, predisposição para todas as minhas tarefas e dúvidas nesta dissertação. Um muito obrigado.

A todos os demais...

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

AgHBc - Antígeno da cápside do vírus da hepatite B

AgHBe - Antígeno de replicação viral

AgHBs - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

ALT - Alanina aminotransferase

Anti-HBc - Anticorpo contra o AgHBc

Anti-HBe - Anticorpo contra o AgHBe

Anti-HBs - Anticorpo contra o AgHBs

BASO - Basófilos

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMIA - *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay* (Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DT - Diretor Técnico

EOS - Eosinófilos

EPO - Eritropoietina

FT - Fator Tecidual

Hb - Hemoglobina

HCT - Hematócrito

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IM - Índice de Mentzer

INR - Razão Normalizada Internacional

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

LACCSMC - Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

LFT- *Liver function test* (Teste da função hepática)

LYM - Linfócitos

MAC - Mestrado em Análises Clínicas

MAPSS - *Multi-Angle Polarized Scatter Separation* (Separação por Dispersão Multiangular Polarizada)

MCH - Hemoglobina Corpuscular Média

MCHC - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

MCV - Volume Corpuscular Médio

MONO - Monócitos

MPV - Volume médio de plaquetas

NEU - Neutrófilos

NK - Células *Natural Killer*

OF - Ordem dos Farmacêuticos (OF)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PLT - Plaquetas

RBC - *Red Blood Cell* (eritrócitos)

RDW - *Red Cell Distribution Width* (Distribuição do diâmetro dos eritrócitos)

RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA - Ácido ribonucleico

RPR - *Rapid Plasma Reagin*

SNS - Serviço Nacional de Saúde

TP - Tempo de Protrombina

TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada

VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*

VHA - Vírus da hepatite A

VHB - Vírus da hepatite B

VHD - Vírus da hepatite D

vWF - Fator *vonWillebrand*

WBC - *White Blood Cell* (leucócitos)

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 13 |
| I. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS | 14 |
| I.1. ESPAÇO FÍSICO | 14 |
| I.2. RECURSOS HUMANOS | 14 |
| I.3. UTENTES E AMOSTRAS | 14 |
| I.4. FUNCIONAMENTO DO LACCSMC | 15 |
| I.4.1. Fase Pré-analítica | 15 |
| I.4.2. Fase Analítica | 17 |
| I.4.3. Fase Pós-Analítica | 18 |
| I.4.4. Controlo de qualidade | 18 |
| 2. HEMATOLOGIA | 19 |
| 2.1. HEMATOPOIESE | 19 |
| 2.1.1. Eritropoiese | 20 |
| 2.1.2. Granulopoiese | 20 |
| 2.1.3. Monopoiese | 21 |
| 2.1.4. Linfopoiese | 22 |
| 2.1.5. Megacariopoiese | 22 |
| 2.2. HEMOGRAMA | 23 |
| 2.3. QUANTIFICAÇÃO DE RETICULÓCITOS | 24 |
| 2.4. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO | 25 |
| 2.5. <i>CELL-DYN® RUBY DA ABBOTT DIAGNOSTICS</i> | 25 |
| 2.6. ANEMIAS | 27 |
| 2.6.1. Anemia Microcítica | 27 |
| 2.6.2. Anemia Macrocítica | 29 |
| 2.6.3. Anemia Normocítica | 30 |
| 2.7. ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA | 31 |
| 2.8. HEMOSTASE | 32 |
| 2.8.1. Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) | 35 |
| 2.8.2. Tempo de protrombina (TP) | 35 |
| 2.8.3. Fibrinogénio | 35 |
| 2.9. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO | 36 |

| | |
|---|----|
| 3. IMUNOLOGIA | 37 |
| 3.1. AVALIAÇÃO SEROLÓGICA | 37 |
| 3.2. HEPATITES VIRAIS..... | 37 |
| 3.2.1. Hepatite A | 38 |
| 3.2.2. Hepatite B | 39 |
| 3.2.3. Hepatite D | 43 |
| 3.2.4. Hepatite C | 45 |
| 3.3. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) | 46 |
| 3.4. INFEÇÕES BACTERIANAS | 49 |
| 3.4.1. Sífilis..... | 49 |
| 3.5. ARQUITECT® CI 8200 DA ABBOTT DIAGNOSTICS | 52 |
| 4. MICROBIOLOGIA | 53 |
| 5. BIOQUÍMICA | 54 |
| CONCLUSÃO | 55 |
| BIBLIOGRAFIA | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema de maturação hematopoiética/hematopoiese..... | 19 |
| Figura 2 - Representação morfológica de pronormoblasto, normoblasto basofílico, normoblasto policromatófilo, normoblasto ortocromático, reticulócito, respetivamente | 20 |
| Figura 3 - Processo de maturação dos granulócitos pela respetiva ordem: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, granulócito em bastão e granulócitos | 21 |
| Figura 4 - Processo de maturação de monócitos | 21 |
| Figura 5 - Estádios de maturação de linfócitos..... | 22 |
| Figura 6 - Megacariócito maduro com evidenciada granulação no citoplasma | 23 |
| Figura 7 - <i>CELL-DYN® Ruby</i> , da <i>Abbott Diagnostics</i> | 25 |
| Figura 8 - Histograma da dispersão das subpopulações de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) por granularidade/lobularidade e tamanho/complexidade <i>CELL-DYN® Ruby</i> , da <i>Abbott Diagnostics</i> | 26 |
| Figura 9 - Diagrama esquemático de anemia por deficiência de ferro, anemia sideroblástica e talassémias..... | 28 |
| Figura 10 - Representação de anemia falciforme ao microscópio | 31 |
| Figura 11 - <i>Pretty Interlab®</i> da <i>Biameditek</i> | 32 |
| Figura 12 - Eletroforese de hemoglobina em gel de agarose..... | 32 |
| Figura 13 – Cascata de coagulação | 33 |
| Figura 14 - <i>OPTION® 4 PLUS</i> , da <i>bioMérieux</i> | 34 |
| Figura 15 - Fórmula de cálculo do valor de INR..... | 35 |
| Figura 16 - <i>BD Vacutainer® Sedi-15™</i> | 36 |
| Figura 17 - Curso químico e serológico típico de VHA..... | 38 |
| Figura 18 - Curso químico e serológico típico da hepatite B aguda com resolução | 42 |
| Figura 19 - Curso químico e serológico típico da hepatite B crónica | 42 |
| Figura 20 - Curso químico e serológico típico de coinfeção de VHB com VHD..... | 44 |
| Figura 21 - Curso químico e serológico de superinfecção VHB-VHD | 44 |
| Figura 22 - Curso químico e serológico de HCV | 46 |
| Figura 23 - Evolução da infeção por HIV | 47 |
| Figura 24 - Teste RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) | 51 |
| Figura 25 - <i>ARQUITECT® ci 8200</i> da <i>Abbott Diagnostics</i> | 52 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Caraterísticas dos tubos de colheita utilizados no LACCSMC | 16 |
| Tabela 2 - Caraterísticas dos equipamentos, métodos e testes utilizados no LACCSMC. .. | 17 |
| Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e respetivas unidades | 24 |
| Tabela 4 - Critérios de realização de esfregaço de sangue periférico no LACCSMC | 25 |
| Tabela 5 - Interpretação de resultados pelos testes serológicos da Hepatite B..... | 43 |

RESUMO

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra inclui como unidade curricular um estágio final que tem como objetivo o exercício da atividade de técnico superior de análises clínicas em contexto real de trabalho. Este estágio permite a obtenção de conhecimento acerca dos equipamentos automatizados utilizados, bem como as técnicas manuais necessárias para o processamento analítico de vários parâmetros de amostras biológicas através de controlos de qualidade, permitindo, assim, obter uma maior eficiência nesses resultados.

Devido à necessidade de resolução de variados casos clínicos de uma forma mais eficiente existem, hoje, *guidelines* que permitem a execução de testes mais precisos e exatos. Isto, deve-se, em grande parte, ao desenvolvimento exponencial da biotecnologia que contribuiu para uma otimização das abordagens clínicas e garantia de padrões de qualidade. Para além disso, denota-se a importância da existência de profissionais competentes para a interpretação dos dados analíticos e sugestão de análises complementares para suporte do diagnóstico do clínico.

ABSTRACT

The master's degree in clinical analyses from Faculdade Farmácia Universidade de Coimbra includes a student's final practice work as part of a course unit that aims the clinical analyses technician activities exercise in a real context of work. This practice work allows the acquisition of knowledge about the automatized equipment in use as well as the manual techniques required to the analytic processing of several parameters of biological samples through the quality controls. This enables to achieve results with greater efficiency.

Due to the need of a more efficient way to resolve several clinic cases, we find nowadays, guidelines that allow the execution of more precise and exact tests. This is due, largely, to the exponential development of biotechnology, which gives his contribute to the optimization of clinical approaches and guarantee of quality standards. Furthermore, it is of notice the importance of competent professionals capable of analytic data interpretation and prompting of additional tests to support the clinical diagnosis.

INTRODUÇÃO

No âmbito do estágio que se encontra inserido no 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas (MAC), foi proposta a elaboração do relatório referente as atividades e conhecimentos adquiridos durante o período de estágio.

As análises clínicas são uma área de grande relevância para a saúde pública e no Serviço Nacional de Saúde (SNS). É importante a presença de profissionais qualificados nas mais diversas áreas de análises clínicas para uma ótima manipulação dos diferentes equipamentos e na interpretação e validação dos resultados obtidos. A decisão médica é suportada por resultados analíticos descritos no boletim dos seus utentes podendo, assim, confirmar o diagnóstico ou monitorizar a terapêutica.

Com este relatório pretende-se descrever sucintamente as atividades executadas durante o estágio curricular e, modo de funcionamento dos equipamentos e a interpretação de dados laboratoriais, correlacionando as alterações dos parâmetros com o estado fisiopatológico do utente. As áreas descritas neste relatório correspondem às valências de Hematologia e Imunologia, pois embora sejam áreas já bastante automatizadas é necessário o seu entendimento e a interpretação de marcadores de diagnóstico específicos, que implica, assim, um conhecimento qualificado e diferenciado por parte do profissional.

O estágio permite um contato direto com a rotina do laboratório, compreensão do trabalho laboratorial diário, e a interpretação dos dados face à realidade presente, e oferece a oportunidade de adquirir autonomia a nível profissional por forma a encarar o futuro por parte dos novos profissionais da área de análises clínicas.

Neste relatório pretende-se conciliar o conhecimento teórico adquirido durante o MAC com a prática laboratorial, através das atividades desenvolvidas durante o estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC).

I. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

I.1. ESPAÇO FÍSICO

O LACCSMC está localizado na Rua Vandelli em Coimbra, num espaço amplo e acessível a todos os utentes. As suas instalações são constituídas por uma secretaria e uma receção para atendimento ao público, um gabinete destinado ao Diretor Técnico (DT), duas casas-de-banho, uma sala de colheitas, uma sala para lavagem de material e os setores de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia.

I.2. RECURSOS HUMANOS

O LACCSMC é dirigido pelo DT Tenente-Coronel Farmacêutico Dr. Mário João Roque, farmacêutico especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos (OF), sendo o responsável pela validação dos resultados. A equipa de trabalho é constituída por cinco técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e duas assistentes administrativas.

I.3. UTENTES E AMOSTRAS

Diariamente são colhidas no LACCSMC aproximadamente trinta amostras reconhecidas com um número de identificação, nome do utente e a data da colheita.

Para além do fluxo de amostras diárias, o laboratório tem, no âmbito da saúde operacional, atividade que leva ao aumento do número de amostras em datas específicas para um número superior a duzentas amostras.

Para cada utente há uma folha de colheita onde são apresentadas as análises pretendidas e, a partir daí o técnico responsável por realizar a colheita saberá o tipo de amostra necessária para aquela análise, bem como as condições de colheita apropriadas para cada uma delas. As amostras são então devidamente etiquetadas com código de barras, número, nome e data, e a requisição segue para o sector de bioquímica, imunologia, microbiologia e hematologia.

Para além da requisição existe um sistema informático, SISLAB, onde cada exame fica registado e onde são atribuídos e validados os resultados obtidos de cada setor.

I.4. FUNCIONAMENTO DO LACCSMC

O LACCSMC apresenta um horário de atendimento ao público em dias úteis das 8h00 às 12h30 e das 14h00 às 17h00.

Os exames que não se realizam no laboratório são enviados para um laboratório parceiro com outra identificação e outras especificações necessárias de acordo com um manual disponibilizado por esse laboratório.

Assim sendo, o processo laboratorial é dividido em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica

I.4.1. Fase Pré-analítica

A fase pré-analítica corresponde ao período que decorre desde a chegada do utente até ao processamento das amostras.

É na receção que é feita ao utente uma requisição acompanhada da prescrição do clínico e a lista de análises necessária para aquele utente, sendo registada no programa SISLAB. Desta forma, obtém-se uma referência e código de barras exclusivo para esse mesmo utente.

Após o preenchimento da folha de colheita, o utente é chamado para a recolha das amostras biológicas prescritas pelo clínico e, se for o caso, entregar as amostras colhidas por si. O técnico de colheita é responsável pela adequada identificação e etiquetagem dos recipientes, encaminhando-as para os setores onde será realizada a análise.

O período de colheitas, por norma, é realizado entre as 8h30 as 12h00.

Existem vários tubos sem ou com anticoagulantes específicos de cada análise. Desta forma, para uma melhor identificação desses tubos, as tampas encontram-se diferenciadas por cores e cada uma corresponde a um tipo de anticoagulante:

Tabela I - Características dos tubos de colheita utilizados no LACCSMC.

| Tubos de Colheita (Cor) | Anticoagulante | Tipo de amostra | Análises |
|--|----------------------|-----------------|---|
| Azul  | Citrato de sódio 1:9 | Plasma | Provas de Coagulação |
| Amarelo  | Sem Anticoagulante | Soro | Provas Bioquímicas e Imunológicas, Eletroforese de Proteínas. |
| Roxo  | EDTA tripotássico | Sangue total | Hemograma, Hemoglobina glicada e Eletroforese de Hemoglobina. |
| Preto  | Citrato de sódio 1:4 | Sangue total | Velocidade de Sedimentação |

De acordo com as regras de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) deverá realizar-se a recolha por uma ordem específica. Inicia-se então os processos pelo tubo com anticoagulante de citrato de sódio 1:9 (azul), depois o tubo sem anticoagulante (amarelo), de seguida o EDTA tripotássico (roxo) e, no final, o tubo contendo citrato de sódio 1:4 (preto) (Arkin et al., 2003a).

O EDTA e citrato de sódio fazem a quelação do cálcio, ou seja, removem os iões de cálcio da amostra de forma a inibir a formação do coágulo (Arkin et al., 2003b).

Após a colheita, os tubos com anticoagulante terão de ser agitados de forma a que ocorra uma mistura completa do volume de sangue com o anticoagulante. O tubo sem anticoagulante terá de ficar em repouso para se possa formar o coágulo de sangue.

Se o utente já trazer as amostras colhidas, normalmente fezes, urina das 24 horas e a primeira urina da manhã, teremos de garantir junto deste se seguiu as regras de recolha dessas amostras como descritas no manual de colheitas do laboratório e, só depois, proceder a atribuição de identificação.

I.4.2. Fase analítica

Esta fase corresponde ao período entre a chegada da amostra biológica aos diversos setores e a obtenção do resultado.

Na tabela abaixo estão descritos os equipamentos existentes em cada setor, as técnicas e os tipos de testes.

Tabela 2 - Características dos equipamentos, métodos e testes utilizados no LACCSMC.

| Setor | Equipamento | Técnica | Testes |
|------------------------------|---|--|--|
| Hematologia | CELL-DYN® Ruby da Abbott Laboratories | MAPSS (Multi-Angle Polarized Scatter Separation) e Citometria de fluxo | Contagem sanguínea completa e Reticulócitos |
| | OPTION® 4 Plus da bioMérieux | Turbidimetria | TP (tempo de pró-trombina), TTPa (tempo parcial de tromboplastina ativada), Fibrinogénio |
| | BD Vacutainer® Sedi-15™ | Método Westergren | Velocidade de Sedimentação |
| | Pretty Interlab® da Biameditek | Eletroforese | Proteinograma, Eletroforese de Hemoglobina |
| | ADAMS A _{1c} ® HA-8160 da ARKRAY | Cromatografia de alta pressão (HPLC) | Hemoglobina glicada (HbA _{1c}) |
| Bioquímica/Imunologia | Arquitect® ci-8200 da Abbott Diagnostics | Técnicas imunoenzimáticas, Turbidimetria, Potenciometria, Espectrofotometria, Imunoensaio de polarização fluorescente (FPIA) | PSA total, PSA livre, FT3, TT3, FT4, TT4, TSH, Sífilis, Ag HBs, Ac anti-HBc total, Ac anti-HBc IgM, Ac anti-HBe, Ac anti-TPO, Ac anti-Tg, Ag HBe, Ac anti-HBs, Ac anti-HCV, Ac anti-VHA, Ac anti-HIV 1 e 2 |
| | miniVIDAS® da biomérieux | ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay): Imunoensaio não competitivo (sandwich) | FSH, bHCG, CEA, Ca 19.9 |
| | | Imunoensaio competitivo | Progesterona, Cortisol, Testosterona total |
| Microbiologia | URIT, Uritest-300 | Espectrofotometria | Urina tipo II |

1.4.3. Fase Pós-Analítica

Os resultados analíticos são armazenados no sistema informático e validados tecnicamente pelo técnico responsável de cada setor e no final serão validados pelo diretor do serviço de patologia clínica (Bishop *et al.*, 2010).

Por fim, as análises serão entregues ao utente ou comunicados ao clínico para a sua interpretação completando assim a terceira fase.

1.4.4. Controlo de qualidade

Os controlos de qualidade são utilizados para melhorar o desempenho e a eficiência dos processos analíticos e para que os resultados sejam exatos e precisos. Para isso o laboratório utiliza controlos de qualidade internos e externos.

Cada setor possui um controlo de qualidade interno de 3 níveis: nível 1 – baixo, nível 2 – normal e nível 3 – alto. São utilizados no mínimo dois níveis diariamente, no período da manhã antes das amostras dos utentes, para poder avaliar o desempenho do ensaio.

Estes controlos internos são de concentração conhecida, com valores de referência e tem como finalidade obter a precisão do ensaio.

O LACCSMC utiliza um programa de avaliação externa da qualidade, RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), com amostras de concentração desconhecida. Os resultados têm, assim, de ser introduzidos no site da entidade, onde é obtida uma comparação de resultados obtidos de todos os laboratórios. Este tipo de avaliação tem o objetivo de verificar a exatidão dos métodos utilizados no laboratório (Klee, Westgarg, 2008).

Nos módulos de controlo de qualidade dos resultados aplicam-se as regras de *Westgard* baseadas no estudo de cartas *Levey-Jennings* (Klee, Westgarg, 2008).

2. HEMATOLOGIA

2.1. HEMATOPOIESE

Hematopoiese provém do latim *hemo*, sangue, e *poiese*, criação. Assim sendo, a hematopoiese corresponde ao processo de formação, desenvolvimento e maturação das diferentes células circulantes do sangue tendo estas a origem em células estaminais hematopoiéticas pluripotentes (hemocitoblastos). As células estaminais têm a vantagem de serem células com capacidade de autorrenovação e diferenciação por forma a conceber e reparar as diferentes células dos tecidos (Scadden, Longo, 2010).

Os hemocitoblastos reagem a sinais extrínsecos e intrínsecos de modo seguir a linhagem linfóide ou mieloide. Assim, uma célula estaminal pluripotente é capaz de se diferenciar e produzir todos os tecidos corporais (Scadden, Longo, 2010).

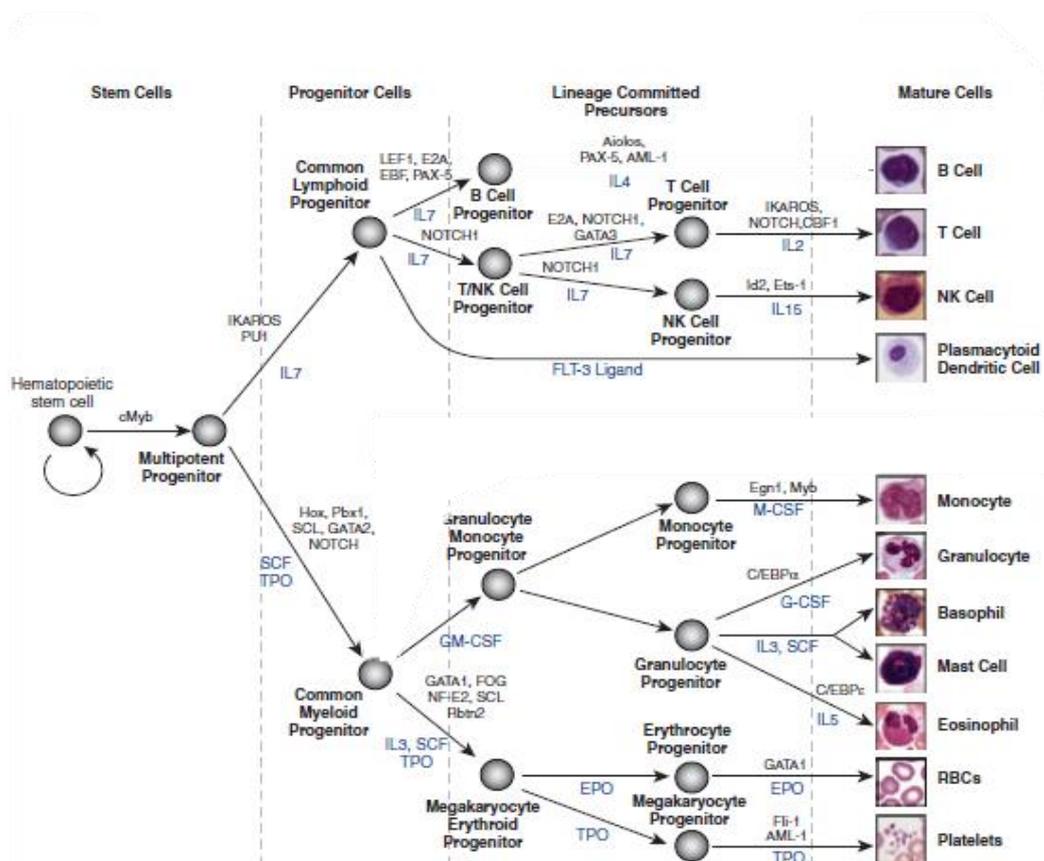


Figura 1 - Esquema de maturação hematopoiética/hematopoiese (Adaptado de Scadden, Longo, 2010).

2.1.1. Eritropoiese

A eritropoiese é um processo fisiológico de produção e maturação de eritrócitos. Esse processo desenvolve-se pelo estímulo da hormona eritropoietina (EPO) que induz, na medula óssea, a produção de eritrócitos e se liga a recetores à superfície dos precursores eritroides de forma a prosseguir com a sua maturação (Adamson, Longo, 2010).

O rim é o principal secretor da glicoproteína EPO e, a sua produção, é procedente de estímulos como a baixa concentração de oxigénio nos fibroblastos peritubulares intersticiais (Adamson, Longo, 2010).

Quando o rim é afetado pela diminuição do número de glóbulos vermelhos, leva a redução da concentração de hemoglobina. Isto implica um aumento dos níveis de EPO.

Na figura que se segue estão representados os seguintes precursores: pronormoblasto, normoblasto basofílico, normoblasto policromatófilo, normoblasto ortocromático, reticulócito (Longo *et al.*, 2010).

Em condições normais um normoblasto origina dezasseis eritrócitos.



Figura 2 - Representação morfológica de pronormoblasto, normoblasto basofílico, normoblasto policromatófilo, normoblasto ortocromático, reticulócito, respetivamente (Adaptado de Medical Biochemistry, 2018).

2.1.2. Granulopoiese

A granulopoiese corresponde ao processo de maturação de granulócitos pela seguinte ordem: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, granulócito em bastão e granulócitos (neutrófilo, eosinófilo, basófilo).

O mieloblasto, promielócito e mielócito são células mitóticas que, a partir do estágio metamielócito até granulócitos maduros, sofrem um conjunto de maturações (Hoffbrand, Moss, 2016a).

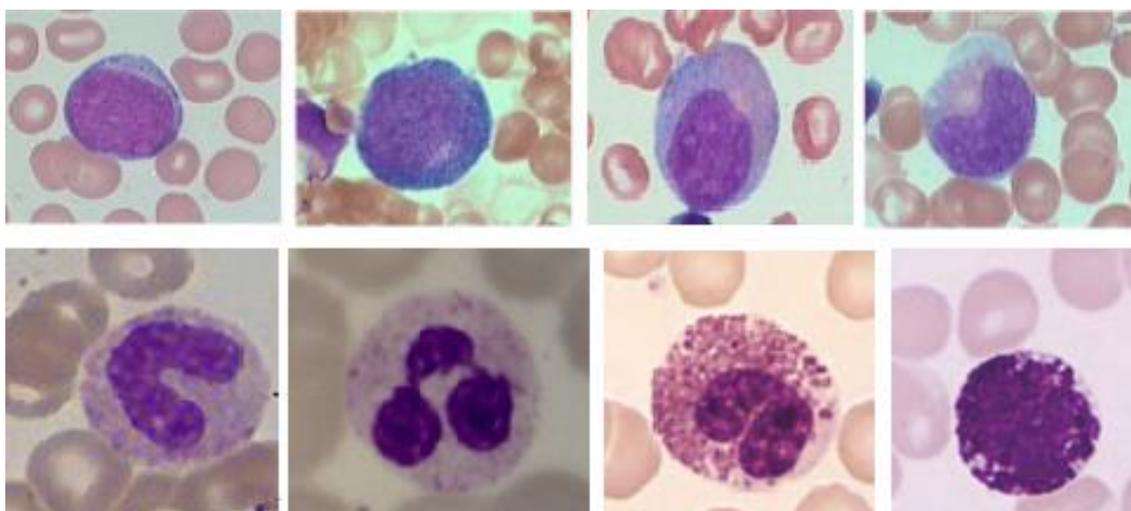


Figura 3 - Processo de maturação dos granulócitos pela respetiva ordem: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, granulócito em bastão e granulócitos (neutrófilo, eosinófilo, basófilo) (Adaptado de Gómez-Gil et al., 2008; Hoffbrand, Moss, 2016a)

2.1.3. Monopoiese

O processo de formação de monócitos passa por três fases, monoblasto, promonócito e monócito, representadas na figura abaixo.

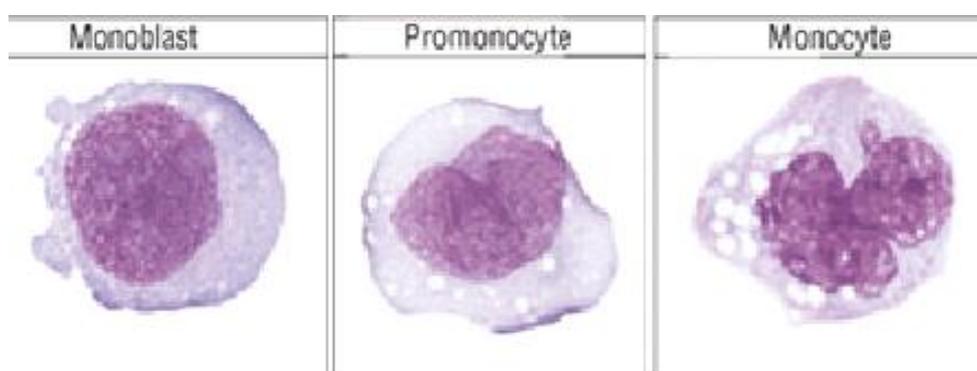


Figura 4 - Processo de maturação de monócitos (Adaptado de Goasguen et al., 2009).

Os monócitos saem da circulação para os tecidos por um processo denominado diapedese e, aquando a chegada aos tecidos, os monócitos sofrem uma diferenciação, denominando-se aí como macrófagos. Estes, situam-se maioritariamente no baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos pulmonares de forma a proteger o organismo de potenciais invasões de microrganismos (Holland, Gallin, 2010).

2.1.4. Linfopoiese

A linfopoiese relaciona-se com o processo pelo qual se dá a formação dos linfócitos. Estes derivam da mesma célula precursora na medula óssea e fazem parte da resposta imunológica. Este processo de maturação, demonstrado na figura 5, pode ocorrer na medula óssea, timo, gânglios linfáticos e baço. Os linfócitos B sofrem o processo de maturação na medula óssea enquanto que os linfócitos T necessitam de terminar esse processo no timo onde se diferenciam em linfócitos T-citotóxicos, linfócitos T-auxiliares e linfócitos T-supressores. As células NK têm também origem no linfoblasto do qual se forma o pro-linfócito NK que matura na medula óssea. Os linfócitos B podem, ainda, diferenciar-se em plasmócitos quando estes contactam com antígenos num órgão linfoide secundário.

Os estádios de maturação de linfócitos correspondem aos linfoblastos, pro-linfócitos e linfócitos (Longo *et al.*, 2010).

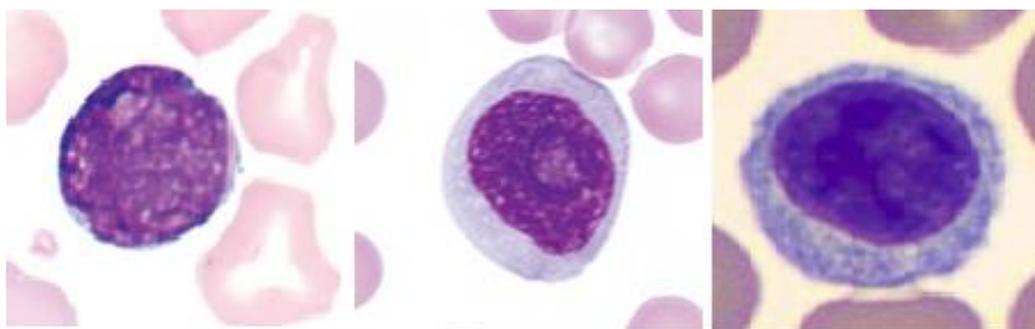


Figura 5 - Estádios de maturação de linfócitos (linfoblasto, pro-linfócito e linfócito)
(Adaptado de *Clinical Hematology Atlas*, 2015).

2.1.5. Megacariopoiese

A megacariopoiese corresponde ao processo de formação do megacariócito maduro e de plaquetas. Este processo apresenta diferentes estágios de maturação: Megacarioblasto, Promegacariócito, Megacariócito (Hoffbrand, Moss, 2016b).

Um dos principais fatores que regulam a formação de plaquetas é a trombopoietina (TPO). Esta hormona estimula a produção e maturação de megacariócitos pela ligação a recetores de superfície (c-MPL) presentes nas plaquetas e megacariócitos. (Hoffbrand, Moss, 2016b).

Na figura que se segue está representada a formação das plaquetas a partir da fragmentação citoplasmática anucleada dos pseudópodes dos megacariócitos maduros.

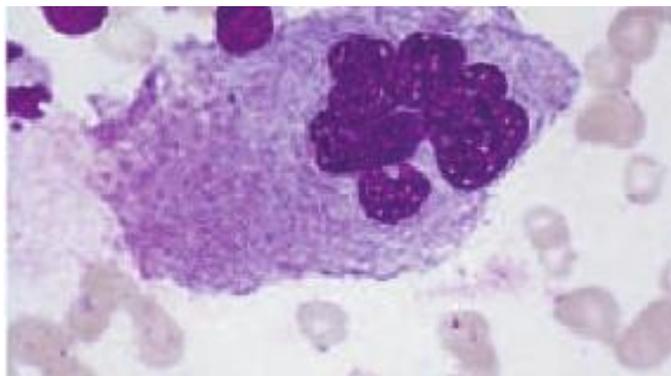


Figura 6 - Megacariócito maduro com evidenciada granulação no citoplasma (Adaptado de Hoffbrand, Moss, 2016b).

2.2. HEMOGRAMA

Atualmente, o hemograma é a análise mais representada nos exames de rotina onde se avaliam os eritrócitos, leucócitos e as plaquetas.

Na tabela seguinte estão descritos cada um dos componentes analisados das diferentes linhagens e as unidades que devem ser apresentadas.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e respetivas unidades (Adaptado de Kawthalkar, 2013).

| Ensaio | Unidades |
|--|---------------------|
| WBC - Leucócitos | $\times 10^9/L$ |
| NEU - Neutrófilos | $\times 10^3/\mu l$ |
| LYM - Linfócitos | $\times 10^3/\mu l$ |
| MONO - Monócitos | $\times 10^3/\mu l$ |
| EOS - Eosinófilos | $\times 10^3/\mu l$ |
| BASO - Basófilos | $\times 10^3/\mu l$ |
| RBC - Eritrócitos | $\times 10^6/\mu l$ |
| HGB - Hemoglobina | g/dL |
| HCT - Hematócrito | % |
| MCV - Volume Corpuscular Médio | Fentolitros (fL) |
| MCH - Hemoglobina Corpuscular Média | Picogramas (pg) |
| MCHC - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média | g/dL |
| RDW - Distribuição do diâmetro dos eritrócitos | % |
| PLT - Plaquetas | $\times 10^3/\mu L$ |
| MPV - Volume médio de plaquetas | fL |

2.3. QUANTIFICAÇÃO DE RETICULÓCITOS

Segundo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) os reticulócitos são glóbulos vermelhos que ainda não chegaram à fase de completa maturação.

Uma das principais características dos reticulócitos é o facto de possuírem RNA ribossomal, o que os diferencia dos eritrócitos. Desta forma, com o aparelho *Cell-Dyn® Ruby* é possível realizar a contagem destes reticulócitos através da coloração. O uso do corante azul de metileno evidencia os ácidos nucleicos (RNA ribossomal) (Arkin *et al.*, 2004).

Este tipo de análise é crucial para determinar se a medula óssea está, ou não, a produzir a quantidade normal da série eritrocitária e, permite também avaliar a capacidade de resposta da mesma (Arkin *et al.*, 2004).

2.4. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

Quando no hemograma certos valores se encontram fora da normalidade torna-se necessária a realização de esfregaço de sangue periférico por forma a confirmar as anomalias detetadas no hemograma. A observação do esfregaço de sangue periférico permite o estudo da morfologia de células e estruturas celulares bem como a sua contagem que auxiliam no diagnóstico de determinadas patologias.

Tabela 4 - Critérios de realização de esfregaço de sangue periférico no LACCSMC.

| |
|--|
| HGB, ♂(homem) ≤ 12.0 g/dL ou ≥ 17.0 g/dL |
| HGB, ♀(mulher) ≤ 11.0 g/dL ou ≥ 15.0 g/dL |
| RDW ≥ 15.0 %CV |
| PLT $< 150 \times 10^3/\mu\text{L}$ ou $> 500 \times 10^3/\mu\text{L}$ sem histórico |
| $3.0 \times 10^9/\text{L} < \text{WBC} \leq 12.0 \times 10^9/\text{L}$ |
| MONO ≥ 15.0 % |
| BASO $\geq 3\%$ |
| Qualquer inversão de fórmula com WBC $\geq 8.0 \times 10^9/\text{L}$ ou linfócitos $\geq 50.0\%$ |
| Inversões de fórmula com diferença de 10% LYM > NEU |
| MCV $< 75\text{fL}$ ou $> 105\text{fL}$ |
| MCHC > 37.0 g/dL |
| RDW < 15 se houver anemia |

2.5. CELL-DYN® RUBY DA ABBOTT DIAGNOSTICS

As análises quantitativa e qualitativa das séries hematopoiéticas são realizadas de forma automática pelo aparelho Cell-Dyn® Ruby, apresentado na figura 7, em amostras de sangue total com K₃EDTA.



Figura 7 - CELL-DYN® Ruby, da Abbott Diagnostics (Fotografia: LACCSMC).

O princípio instrumental pelo qual o aparelho cria o hemograma tem por base dois métodos. Para o eritrograma e plaquetas é usado o princípio de *Coulter* que consiste num método de contagem e determinação do volume dos elementos figurados do sangue (Beckman Coulter, 2018).

Como as células sanguíneas têm baixa condutividade elétrica, usa-se uma solução salina com a suspensão das partículas. Utiliza-se uma corrente elétrica constante que passa numa abertura pequena que se localiza entre dois eletrodos. Quando cada célula da suspensão atravessa essa abertura, provoca uma mudança da impedância elétrica e esses pulsos são estimados (D’Orazio, Meyerhoff, 2008).

Para o leucograma é utilizada a tecnologia MAPSS (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*) e a tecnologia de citometria de fluxo para classificar os leucócitos através da medição de várias propriedades celulares (D’Orazio, Meyerhoff, 2008).

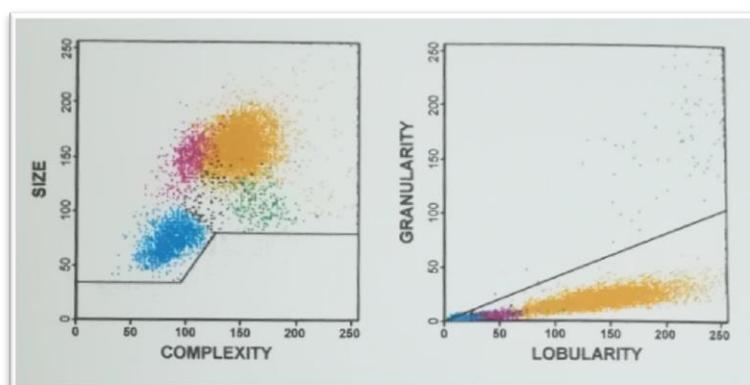


Figura 8 - Histograma da dispersão das subpopulações de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) por granularidade/lobularidade e tamanho/complexidade CELL-DYN® Ruby, da Abbott Diagnostics (Fotografia: LACCSMC).

Este tipo de tecnologia tem a finalidade de subdividir os leucócitos em 5 diferentes populações: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos através de histogramas que fazem a medição da intensidade de dispersão da luz (Longanbach et al., 2012).

As células são sujeitas a um fluxo laminar. Durante esse fluxo atravessam e interrompem um feixe de luz que é disperso em diferentes ângulos sendo detetada e convertida de forma a ser apresentada em histograma pelo programa.

Para determinar o volume de cada célula é medida a dispersão da luz a 0 graus e a complexidade celular a 10 graus. Para a determinação da granularidade e lobularidade a luz polarizada é refratada a 90 graus (Longanbach *et al.*, 2012).

2.6. ANEMIAS

A anemia é reconhecida como uma condição onde a concentração de hemoglobina é inferior aos valores de referência, provocando alterações na capacidade de transporte de oxigénio pelos tecidos (World Health Organization, 2014).

A classificação do tipo de anemia pode ser baseada segundo o MCV através da qual é classificada em microcítica (MCV<80fL), macrocítica (MCV>100fL) ou normocítica (MCV 80-100fL) e segundo o MCH em hipocrómicas, na qual a quantidade de hemoglobina é menor que o normal, e normocrómicas, em que a quantidade de hemoglobina é normal (Manchanda, 2016).

A anemia microcítica está normalmente associada a hipocromia (MCH baixo) e diminuição da síntese de hemoglobina (HGB baixa).

No diagnóstico de anemia, para além dos parâmetros alterados que vão sendo referidos é corroborado com outros dados como histórico do doente e sintomas apresentados (Manchanda, 2016).

2.6.1. Anemia Microcítica

A anemia microcítica pode ter na sua base causal a deficiência de ferro. A insuficiência de ferro implica a diminuição da síntese do grupo *heme* e, conseqüentemente, a diminuição de hemoglobina, comprometendo a eritropoiese. Diferentes causas estão associadas à insuficiência de ferro entre as quais, a sua ingestão insuficiente, má absorção ou, simplesmente, a sua perda através de hemorragias (Tefferi, 2003).

A anemia sideroblástica representa uma deficiência na síntese de protoporfirina em que a eritropoiese é ineficaz. Quando esta é formada, combina-se com o ferro para formar o grupo *heme* que combinada com a globina forma a hemoglobina. No entanto, na anemia sideroblástica não há formação de protoporfirina, ou seja, irá ocorrer acumulação de ferro por existir a incapacidade de formar o grupo *heme* e, conseqüentemente, não há produção

de hemoglobina. As principais causas deste tipo de anemia correspondem ao alcoolismo, a fatores genéticos, ou ao consumo de determinados fármacos (Manchanda, 2016).

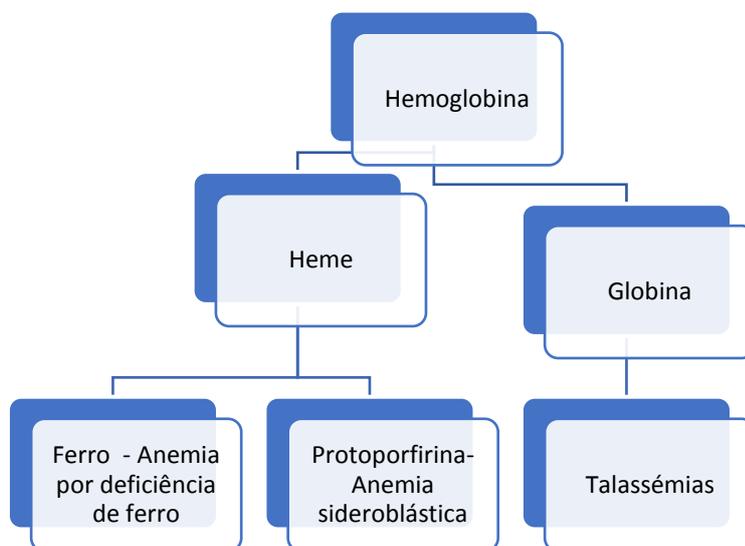


Figura 9 - Diagrama esquemático de anemia por deficiência de ferro, anemia sideroblástica e talassémias.

No esfregaço de sangue periférico de anemia sideroblástica é mais frequente observar-se sideroblastos em anel, pontilhado basófilo e células alvo. Este pontilhado basófilo pode indicar envenenamento por chumbo que afeta a ribonuclease e, por isso, os ribossomas não são degradados e permanecem no eritrócito.

Laboratorialmente, no hemograma de anemia microcítica por deficiência de ferro o RDW está aumentado, MCHC diminuído e no esfregaço de sangue periférico deteta-se a presença de anisocitose e poiquilocitose (Muñoz, 2011).

As talassémias também pertencem ao grupo das anemias microcíticas e, correspondem a um tipo de doenças hereditárias associadas a uma hemoglobinopatia pela deficiência na síntese de uma ou mais cadeias de globina. Como consequência, são produzidos eritrócitos microcíticos e hipocrómicos (Higgins *et al.*, 2008).

Particularizando, a β -talassémia *minor* ocorre em indivíduos heterozigóticos sendo um tipo de doença, geralmente, assintomática. Esta é associada à ausência de cadeias β ou à simples diminuição de cadeias β produzidas. Neste tipo de talassémia, devido à incapacidade de produção de cadeias β , dá-se a subprodução de HbA. Assim sendo, como as cadeias α são produzidas em excesso, ligam-se às cadeias γ , conduzindo a um aumento de HbA₂.

Para além disto, poderá ocorrer o aumento da quantidade de eritrócitos microcíticos devido à sobreprodução de eritrócitos, sendo por isso, provável, o surgimento de pontilhado basófilo (Tefferi, 2003).

Por forma a ser possível diferenciar a anemia microcítica por deficiência de ferro da β -talassémia é utilizado o Índice de Mentzer (IM). Este índice corresponde ao quociente entre MCV e RBC. Quando o IM apresenta um valor superior a 13 diz-se que estamos na presença de uma anemia por deficiência de ferro e, caso seja inferior a 13 na presença de uma β -talassémia (Higgins *et al.*, 2008).

2.6.2. Anemia Macroscítica

A anemia macroscítica é subdividida em dois tipos de anemia, a megaloblástica e a não megaloblástica, sendo que a mais frequente é a anemia megaloblástica.

Em situações de anemia em que o MCV está acima dos valores de referência, pode sugerir que se trata de uma anemia macroscítica.

As anemias megaloblásticas estão relacionadas com alterações da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), frequentemente, devido à deficiência em vitamina B12 e deficiência de vitamina B9 (ácido fólico) (Kalpathi, 2018).

A deficiência na síntese de DNA, através da qual se dá uma modificação do processo de replicação, implica uma alteração morfológica do eritrócito, formam-se células com tamanho acima do normal.

As principais características que a anemia megaloblástica pode apresentar no esfregaço de sangue periférico e hemograma são: diminuição da Hb e HCT, aumento do MCV, diminuição da MCHC, granulocitopenia, trombocitopenia, reticulocitopenia e neutrófilos hipersegmentados (Kalpathi, 2018).

O comprometimento da formação de eritrócitos maduros, leucócitos e plaquetas levam os macrófagos a eliminarem-nos. As principais causas deste comprometimento podem dever-se à utilização de fármacos ou má absorção/eliminação de vitamina B12 e ácido fólico, que poderão influenciar na síntese de DNA (Ayodele, 2018).

2.6.3. Anemia Normocítica

Nas anemias normocíticas, os glóbulos vermelhos são morfologicamente normais.

Este tipo de anemias pode ser identificada através da contagem de reticulócitos. No caso do número de reticulócitos se encontrar aumentado poderá suspeitar-se de anemia hemolítica devido à destruição de glóbulos vermelhos, ou de anemia normocítica por perda de sangue (Manchanda, 2016).

Na anemia hemolítica por destruição dos eritrócitos, ocorre a libertação de hemoglobina e, conseqüentemente a haptoglobina pode ligar-se a esta, formando um complexo que é identificado pelo macrófago. Desta forma, este complexo é fagocitado e eliminado e, dá-se a diminuição de hemoglobina livre (Kawthalkar, 2013).

Nos adultos, normalmente existe a HbA, HbF e HbA₂. A HbA está presente em 95% do total de Hb e é composta por duas cadeias α e duas cadeias β . A HbF é composta por duas cadeias α e duas cadeias γ e persiste em apenas 1%. A HbA₂ possui duas cadeias α e duas δ e está presente em quantidades 1.5-3%.

O aparecimento da HbS resulta numa mutação de um aminoácido da HbA. Essa mutação consiste na substituição do aminoácido glutamato pela valina na posição 6 tornando-a hidrofóbica.

A anemia falciforme é uma doença que tem como principal característica o aspeto de foice dos eritrócitos. Este tipo de doença resultou de uma seleção natural de defesa contra *Plasmodium falciparum*, sendo bastante comum em populações do sudeste asiático e África (Kawthalkar, 2013).

A anemia falciforme é gerada quando a concentração de HbS é >60% e no aumento da concentração de Hb na forma desoxigenada. Essa forma deve-se à diminuição do volume do eritrócito, pois quando a célula está desidratada, a concentração de Hb aumenta e leva à sua desoxigenação. A Hb desoxigenada é insolúvel comparativamente com a HbA, o que causa a sua polimerização (Golijan, 2014).

Como este tipo de eritrócitos estão deformados e perderam a elasticidade não conseguem atravessar os capilares, sendo eliminados pelos macrófagos. No entanto, pode ocorrer vaso-oclusão e, dessa forma, os tecidos não são oxigenados.

Anemia falciforme é conhecida por apresentar homozigotia para hemoglobina S (Hb SS) enquanto que traço falciforme apresenta heterozigotia para o gene da hemoglobina S (Hb AS).

O traço falciforme constitui uma condição clinicamente benigna na qual os seus portadores são geralmente assintomáticos. Em condições de hipoxia, observam-se eritrócitos em forma de foice. Neste caso a HbS está presente em concentrações de 35 a 40% do total de Hb.

No hemograma de anemia falciforme verifica-se baixa concentração de Hb, baixo HCT, MCV ligeiramente aumentado e reticulocitose. No esfregaço de sangue periférico observam-se os eritrócitos em foice, células alvo e corpúsculos de *Howell-Jolly* (Golijan, 2014).

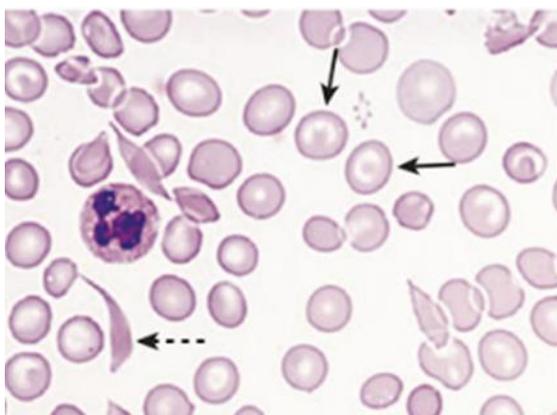


Figura 10 - Representação de anemia falciforme ao microscópio (Disponível em Golijan, 2014).

2.7. ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

A eletroforese de hemoglobina é um teste semi-qualitativo para a identificação de hemoglobinas normais e anormais ou variantes e para confirmar a identidade de hemoglobinas clinicamente relevantes, como A, F, S e C (Lawrence, Broussard, 2010).

Este tipo de exame é feito regularmente no LACCSMC na seleção de candidatos para tropas especiais.

No LACCSMC utiliza-se *Pretty Interlab*[®] da *Biameditek* representado na figura seguinte, que executa a eletroforese em gel de agarose, sendo utilizado tanto no método de confirmação para a deteção de HbS como para a quantidade presente. Este método separa

as moléculas de Hb pelas diferenças da carga molecular. Na eletroforese a pH alcalino a HbS situa-se entre a HbA e HbA₂ (Lawrence, Broussard, 2010).



Figura 11 - Pretty Interlab® da Biameditek (Fotografia:LACCSMC).

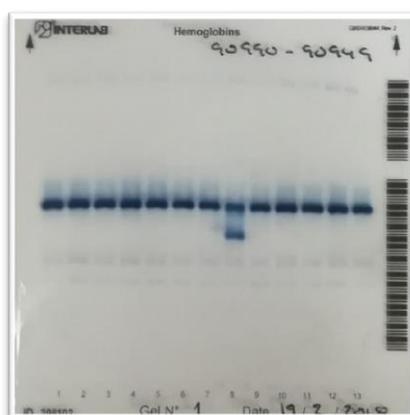


Figura 12 - Eletroforese de hemoglobina em gel de agarose a pH alcalino (Fotografia:LACCSMC).

2.8. HEMOSTASE

O sistema hemostático tem a função de controlar a defesa do organismo face a situações de hemorragia. Este, engloba o endotélio vascular, plaquetas circulantes e fatores de coagulação (Weitz, 2010).

A ocorrência de hemorragia indica que há rutura endotelial nos vasos sanguíneos extravasando o sangue (Jobin, 1995).

A hemostase é regulada pela resposta vascular, hemostase primária e hemostase secundária (Hoffbrand, Moss, 2016b).

Quando há lesão de um vaso sanguíneo, ocorre a resposta vascular, ou seja, as plaquetas circulantes vão aderir a essa lesão e agregam-se libertando serotonina e tromboxano A2 de forma haver constrição do vaso e fortalecer o agregado plaquetário (Hoffbrand, Moss, 2016b)

A hemostase primária, ou coagulação, ocorre durante a resposta vascular, isto é, formam-se tampões plaquetários pela mediação de mais plaquetas para o local (Weitz, 2010).

As plaquetas aderem ao colagénio quando libertado em caso de lesão do vaso através do fator *vonWillebrand* (vWF) que medeia a ligação dos recetores das plaquetas ao endotélio, formando uma barreira que dificulta a perda sanguínea (Colman *et al.*, 2006).

A hemostase secundária resulta na interação e ativação consecutiva de um conjunto de fatores de coagulação inativos que levam à formação do coágulo de fibrina estável (Hoffbrand, Moss, 2016b).

A cascata de coagulação engloba a via intrínseca e extrínseca, sendo que após a ativação do fator X as duas vias se juntam numa via comum (Hoffbrand, Moss, 2016b).

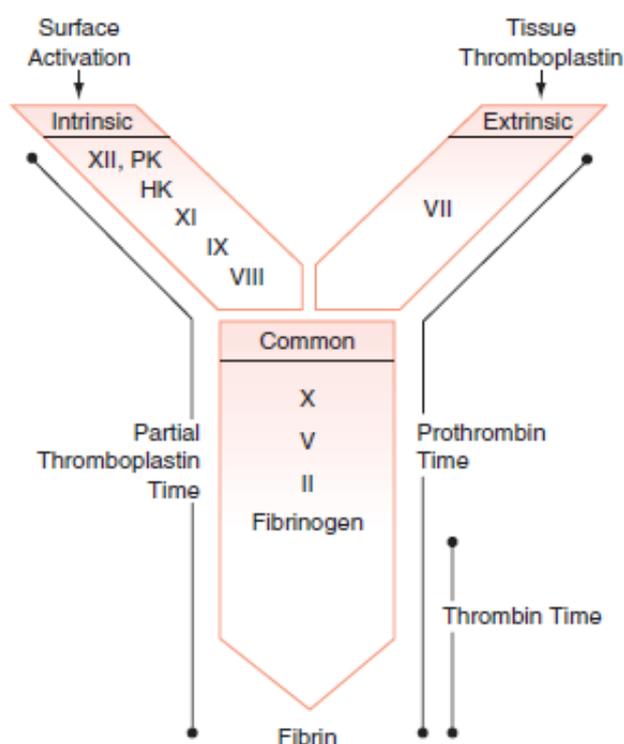


Figura 13 - Cascata de coagulação (Disponível em Napolitano *et al.*, 2017).

Via intrínseca: a pré-caliceína, fator XII e quinogénio de alto peso molecular (HMWK) criam um complexo juntamente com o colagénio. Com isto, ocorre a ativação do FXII em FXIIa, que por sua vez ativa o FXI em FXIa. As reações seguem em cascata até ser ativado o FX (Figura 13) (Hoffbrand, Moss, 2016b; Napolitano *et al.*, 2017).

Assim, o FIXa, FVIIIa, iões cálcio e os fosfolípidos promovem a ativação do fator X, comportando-se como enzimas catalíticas.

Via extrínseca: o FVII, o cálcio e fator tecidual (FT) promovem a ativação do FVII (FVIIa) iniciando a via extrínseca. O complexo de FVIIa, cálcio e FT (libertado aquando de uma lesão endotelial ou ativação de processos inflamatórios) vão ativar o FX (Hoffbrand, Moss, 2016b).

Com a ativação do FX pela via intrínseca e via extrínseca inicia-se a via comum.

Via comum: ambas as vias, intrínseca e extrínseca, acabam na conversão da protrombina em trombina pela protrombinase proveniente do fator FXa e FVa, cálcio e fosfolípidos (Butenas, 2002).

A fibrina solúvel é formada através da trombina que degrada o fibrinogénio em fibrina, formando-se, desta forma, o trombo hemostático estável.

Alterações da função hemostática podem resultar de doenças hemorrágicas, estados trombóticos e modificação da coagulação sanguínea (Napolitano *et al.*, 2017).

O aparelho *OPTION[®] 4 PLUS* (Figura 14) é um aparelho semiautomático que quantifica a turbidez da amostra, isto é, determina a dispersão da luz formada pelo coágulo no meio de reação. Permite quantificar o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e doseamento de fibrinogénio (Butenas, 2002).



Figura 14 - *OPTION[®] 4 PLUS*, da bioMérieux. (Fotografia: LACCSMC).

2.8.1. Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa)

O TTPa avalia os fatores da cascata de coagulação da via intrínseca (FVIII, FIX, FXI, FXII) e da via comum (FX, FV, protrombina e fibrinogénio). Esta análise determina o tempo, em segundos, que o plasma demora a coagular após a junção de tromboplastinas parciais, fosfolípidos plaquetários, e cloreto de cálcio (Napolitano *et al.*, 2017).

2.8.2. Tempo de protrombina (TP)

O TP analisa os fatores de coagulação da via extrínseca e comum (protrombina, FVII e FX, FV e fibrinogénio). O teste determina o tempo, em segundos, que o plasma demora a coagular após a junção de tromboplastina completa, equivalente à tecidual (Butenas, 2002).

O TP apresenta valores variáveis dependendo de cada laboratório pois depende da tromboplastina que é utilizada. Por isso o efeito dos anticoagulantes orais é controlado pelo INR (Razão Normalizada Internacional) proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

O INR baseia-se na razão entre o TP do doente e o TP de referência elevado ao ISI (Índice de Sensibilidade Internacional). O ISI é definido pela comparação da tromboplastina utilizada com a tromboplastina padronizada (Hoffbrand, Moss, 2016c).

$$INR = \left(\frac{TP_{teste}}{TP_{poolnormal}} \right)^{ISI}$$

Figura 15 - Fórmula de cálculo do valor de INR.

O interesse do cálculo do INR deve-se à necessidade de monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais sendo que os seus valores, nestes casos, devem estar compreendidos entre 2 e 3.

2.8.3. Fibrinogénio

O doseamento de fibrinogénio faz-se pela adição de uma concentração elevada de trombina numa amostra de plasma diluído e a determinação do tempo de coagulação. Quanto maior o tempo de coagulação, menor é a concentração de fibrinogénio e vice-versa (Napolitano *et al.*, 2017).

2.9. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

No equipamento *BD Vacutainer® Sedi-15™*, representado na figura 16, é executada a velocidade de sedimentação eritrocitária que utiliza o método *Westergren* modificado. É um teste que nos dá informação do estado de inflamação do organismo. O teste de sedimentação eritrocitária está relacionado com uma vasta diversidade de doenças inflamatórias sendo por isso considerado um exame não específico, frequentemente utilizado para auxiliar no diagnóstico de doenças inflamatórias (Jou *et al.*, 2011).



Figura 16 - *BD Vacutainer® Sedi-15™* (Fotografia: LACCSMC).

O sangue é colocado num tubo fino e alto de vidro com anticoagulante citrato de sódio 1:4. Desta forma, os eritrócitos depositam-se progressivamente no fundo do tubo. É contabilizada a velocidade (mm/h) de sedimentação dos glóbulos vermelhos (Kratz *et al.*, 2017).

A velocidade de sedimentação relaciona-se indiretamente com a alteração da concentração de proteínas de fase aguda. Caso haja algum processo de inflamação, ocorre a deposição mais acelerada das células devido à formação de aglomerados de eritrócitos (Hoffbrand, Moss, 2016d).

Valores superiores aos valores de referência também podem indicar variadas situações de anemia devido à baixa quantidade de eritrócitos.

O valor de referência para homens é 0-10 mm/h e, para as mulheres 0-12 mm/h. No entanto, este valor apresenta um aumento gradual com a idade (Kratz *et al.*, 2017).

3. IMUNOLOGIA

3.1. AVALIAÇÃO SEROLÓGICA

O sistema imunitário tem como principal objetivo a proteção do organismo das doenças infecciosas a que este é exposto. É um sistema que tem a capacidade de gerar uma resposta imunológica por forma a reconhecer e eliminar potenciais agentes patogénicos, impedindo ou diminuindo a gravidade das infeções, sejam elas bacterianas, virais, parasitárias ou fúngicas (Turgeon, 2018a).

Em determinados casos de infeções torna-se difícil o isolamento e a consequente identificação do agente patogénico. Esta dificuldade deve-se, por vezes à localização deste agente patogénico ou à sua reduzida quantidade. Assim sendo, a avaliação serológica tem como objetivo a determinação e deteção serológica de antigénios específicos do microrganismo ou anticorpos desenvolvidos pelo organismo em resposta à exposição a agentes patogénicos (Turgeon, 2012).

Para o diagnóstico das diferentes infeções são utilizadas técnicas que consistem na deteção de anticorpos, produzidos pelos plasmócitos, ou antigénios. Através da quantificação dos anticorpos IgM e IgG é possível avaliar a cronicidade da infeção.

Caso os testes serológicos sejam positivos, faz-se a confirmação destes e, confirmando-se a sua positividade, as amostras são encaminhadas para um laboratório parceiro onde as amostras são analisadas com outra técnica de análise.

3.2. HEPATITES VIRAIS

A hepatite corresponde à inflamação dos tecidos do fígado. De entre várias causas, as mais frequentes são o abuso no consumo de álcool ou outras substâncias tóxicas e por infeções virais. Estas infeções virais podem ser agudas ou crónicas e causadas por infeção de um ou mais tipos de vírus hepáticos em concomitância. Dependendo do tipo de vírus, as hepatites mais frequentes são as hepatites A, B, C, D e E e, apesar de o órgão alvo ser o fígado e os sintomas das infeções serem semelhantes, os vírus apresentam estruturas e modos de replicação diferentes (Turgeon, 2018b).

3.2.1. Hepatite A

O vírus da hepatite A (VHA) pertence ao género *Hepatovirus* da família *Picornaviridae*. A sua estrutura é simples, sem envelope, de cápside icosaédrica e genoma com RNA de cadeia simples (ssRNA) (Turgeon, 2018b).

O VHA é transmitido, frequentemente, por via fecal-oral durante a fase inicial da doença aguda e, corresponde à altura em que é detetado em maior quantidade (Koenig *et al.*, 2017).

Os fatores de risco para infeção por VHA incluem a ingestão de alimentos ou água contaminados, que se deve ao facto de este vírus ser eliminado em grandes quantidades nas fezes durante o seu período de incubação, aproximadamente 4 semanas, contacto direto pessoa-a-pessoa e via parenteral por exposição ao sangue infetado (Cuthbert, 2001).

Durante o período de replicação, que se dá nas células do fígado, os indivíduos tornam-se portadores da doença (Turgeon, 2018b).

Apesar de a sintomatologia ser variável, é bastante comum o aparecimento de febre, calafrios, fadiga, mal-estar e icterícia (Koenig *et al.*, 2017).

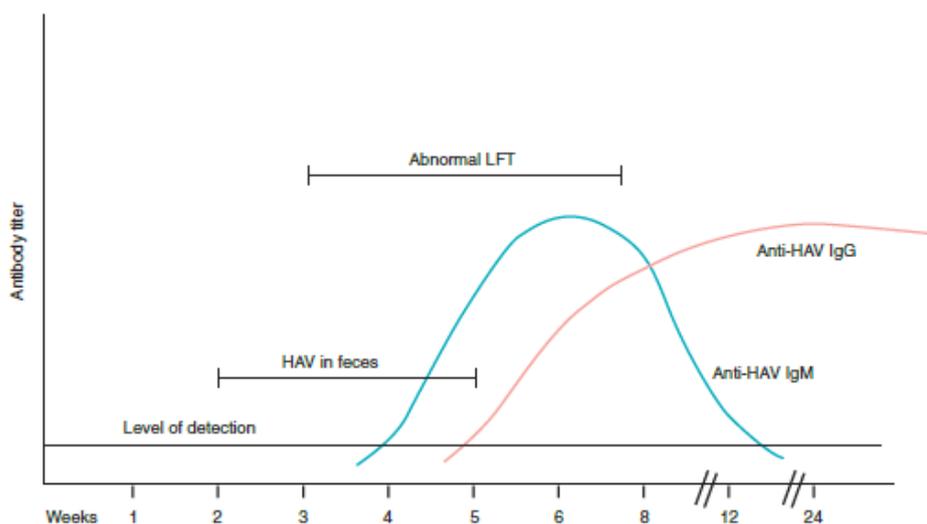


Figura 17 - Curso químico e serológico típico de VHA. LFT: teste da função hepática (Disponível em McNabb, 2015).

O diagnóstico da hepatite A é realizado através da avaliação serológica do VHA que inclui a deteção de anticorpos anti-VHA IgM e anti-VHA IgG e, interpolação com os sintomas clínicos (Cuthbert, 2001).

O período de virémia deste tipo de hepatite é curto, o que dificulta a sua deteção no sangue. Na fase aguda da hepatite A, as alterações laboratoriais mais comuns são o aumento das transaminases e o aumento dos níveis séricos de bilirrubina, com o consequente aparecimento de icterícia. Após o aparecimento de icterícia a quantidade de vírus nas fezes começa a decair (McNabb, 2015).

Após um período de eliminação de vírus nas fezes, os anticorpos anti-VHA do tipo IgM são detetáveis no soro e podem persistir até 4 meses desde o aparecimento da sintomatologia. Normalmente, a presença de anticorpos anti-VHA IgM na fase aguda da hepatite A é elevada e, por isso, a sua medição torna-se essencial para o seu diagnóstico. Após esta fase, ocorre o aparecimento de anticorpos anti-VHA do tipo IgG. A quantidade elevada deste tipo de anticorpos no sangue surge durante a resolução da doença aguda e mantém-se detetável ao longo da vida. Quando, na análise serológica, se deteta este tipo de anticorpos isolados é indicativo de infeção passada ou de imunização (Cuthbert, 2001; McNabb, 2015).

A infeção por VHA apresenta uma baixa taxa de mortalidade e é uma infeção autolimitada, porém, o tempo de recuperação pode prolongar-se durante meses (McNabb, 2015).

3.2.2. Hepatite B

O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus da família *Hepadnaviridae*. Estruturalmente possui uma cápside icosaédrica, é envelopado e apresenta um genoma com dupla cadeia de DNA (dsDNA) circular parcialmente incompleto (Gerlich,2013).

Existem diferentes vias de transmissão viral, entre as quais, a via percutânea, a transmissão sexual e a transmissão vertical. A transmissão mucocutânea também pode ocorrer, se existirem lesões a nível das mucosas.

O número de novos casos tem vindo a diminuir devido à administração da vacina, sendo um método preventivo essencial da hepatite B. Essa diminuição deve-se, também, ao

facto de se conseguir reduzir as principais fontes de contaminação graças à realização de rastreios serológicos específicos e ao fácil acesso à informação, levando a uma população mais informada e consciente (Turgeon, 2018b).

A progressão deste tipo de hepatite para a cronicidade depende de fatores como o hospedeiro, coinfeção viral e/ou outras circunstâncias pontuais como por exemplo cirrose hepática.

Apesar de os indivíduos que desenvolvem a hepatite B poderem ser assintomáticos, estes podem apresentar sintomas como fadiga, icterícia e náuseas.

Os antígenos HBs e HBe produzidos pelo vírus promovem a produção de anticorpos anti-HBs e anti-HBe, respetivamente. Os anticorpos anti-HBs só são detetados no soro após a resolução da infeção. A deteção e monitorização da hepatite B engloba a pesquisa de anticorpos anti-HBc do tipo IgM, anti-HBc total (IgM e IgG), anti-HBe, anti-HBs e antígenos AgHBs e AgHBe e DNA viral. Com estes dados é possível perceber o desenvolvimento da doença e o estado de infecciosidade do indivíduo (Chang, Liaw, 2014).

A presença de AgHBs é detetada durante o período de incubação do vírus e antes do surgimento da sintomatologia. A quantidade de AgHBs aumenta com o tempo e atinge o seu máximo após níveis elevados de ALT. No entanto, a reatividade para AgHBs pode indicar infeção aguda ou crónica de hepatite B. Os antígenos AgHBe representam replicação viral ativa (Burns, Thompson, 2014).

De entre as pessoas infetadas com VHB com a deteção de AgHBs, nem toda a sua totalidade representa infecciosidade, pois existem 2 formas virais no sangue. As infecciosas, como as partículas completas de *Dane*, e as não infecciosas de estrutura em forma esférica e tubulares incompletas que só possuem AgHBs (Liang, 2009).

Caso a infeção seja resolvida, ocorre a normalização dos níveis das transaminases (ALT) e, é acompanhada pela perda gradual de AgHBs. A seroconversão indica resolução da infeção (Burns, Thompson, 2014).

Durante a fase de resolução, ocorre a perda gradual de AgHBe seguido de AgHBs para níveis indetetáveis, sendo seroconvertidos em anticorpos anti-HBe e anti-HBs, respetivamente (Liang, 2009).

Desde que se dá o desaparecimento de AgHBs até à seroconversão em anticorpos anti-HBs, figura 18, pode demorar alguns meses.

De forma a determinar se o indivíduo se encontra neste período de tempo, pesquisa-se a presença de anticorpos anti-HBc do tipo IgM que corresponde a um marcador de diagnóstico de infeção aguda. Este anticorpo encontra-se elevado na fase aguda e diminui progressivamente com o tempo (Turgeon, 2018b).

Os anticorpos anti-HBe são indicativos de baixa infecciosidade. A presença de anticorpos anti-HBs indica imunização por vacinação ou recuperação e imunidade para VHB (Liang, 2009).

O diagnóstico da infeção por VHB pode ser feito por métodos moleculares. Este ensaio é decisivo na confirmação de resultados duvidosos, como por exemplo, a presença isolada de anticorpos anti-HBc (Gerlich, 2013).

Infeção aguda

Na fase aguda da infeção por VHB o primeiro anticorpo a ser detetado é o anti-HBc IgM. Quando os níveis de AgHBs já não são detetáveis, o anti-HBc IgM é o marcador indicativo de infeção aguda (Liang, 2009).

O anticorpo anti-HBc total atinge os seus níveis máximos algumas semanas após o início da infeção e pode continuar detetável durante vários anos ou toda a vida (Gerlich, 2013).

Na fase de resolução da infeção aguda, os AgHBe e AgHBs tornam-se indetetáveis, os níveis séricos de ALT normalizam e os anticorpos anti-HBs e anti-HBe tornam-se detetáveis (Gerlich, 2013).

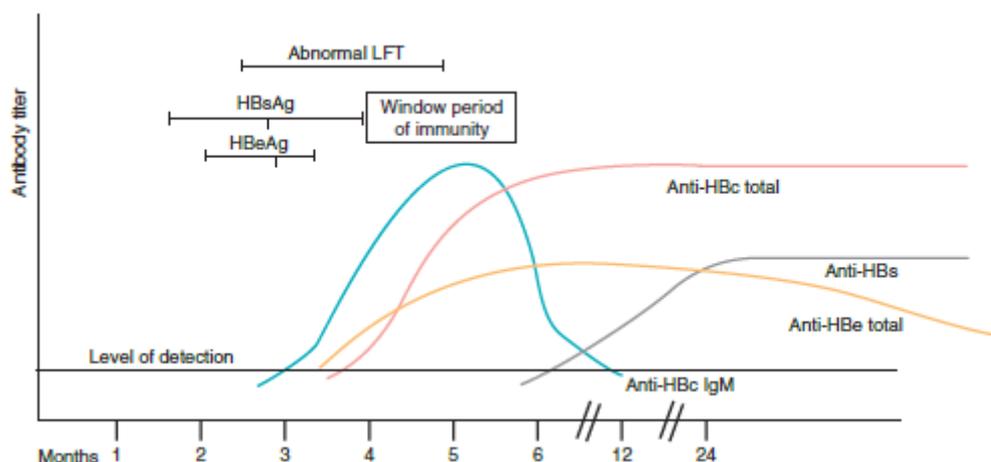


Figura 18 - Curso químico e serológico típico da hepatite B aguda com resolução (Disponível em McNabb, 2015).

Infeção crónica

Na infeção crónica o AgHBs perdura por mais de 6 meses (Turgeon, 2018b).

A infeção crónica por VHB divide-se em duas fases: a fase replicativa onde existem níveis elevados de AgHBe e, a fase não replicativa onde existem níveis elevados de anticorpos anti-HBe. Em ambas as fases existe reatividade para AgHBs e para os anticorpos anti-HBc (Chang, Liaw, 2014).

A replicação do vírus pode diminuir de forma espontânea no decorrer do tempo ou com tratamento, verificando-se diminuição de DNA viral e seroconversão de AgHBe. No entanto, grande parte dos indivíduos com infeção crónica não possuem AgHBe.

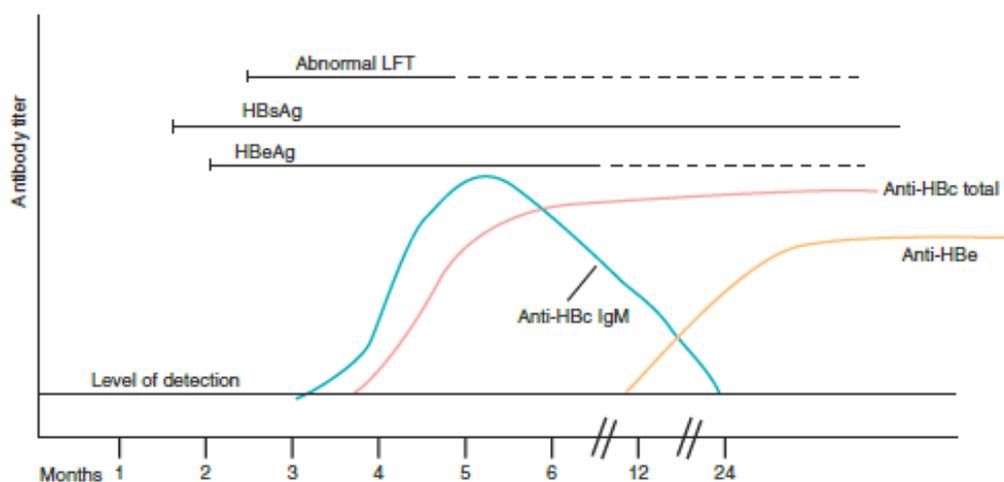


Figura 19 - Curso químico e serológico típico da hepatite B crónica (Disponível em McNabb, 2015).

A seguinte tabela apresenta a interpretação de resultados pelos testes serológicos da Hepatite B.

Tabela 5 - Interpretação de resultados pelos testes serológicos da Hepatite B (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC)).

| | | |
|---|--|--|
| AgHBs anti-HBc anti-HBs | Negativo Negativo Negativo | Ausência de contacto prévio com o vírus |
| AgHBs anti-HBc anti-HBs | Negativo Positivo Positivo | Imunidade para hepatite B após infeção por contacto com vírus |
| AgHBs anti-HBc anti-HBs | Negativo Negativo Positivo | Imunidade para hepatite B após vacinação |
| AgHBs anti-HBc anti-HBc IgM anti-HBs | Positivo Positivo Positivo Negativo | Infeção Aguda |
| AgHBs anti-HBc anti-HBc IgM anti-HBs | Positivo Positivo Negativo Negativo | Infeção Crónica |
| AgHBs anti-HBc anti-HBs | Negativo Positivo Negativo | Interpretação duvidosa; quatro possibilidades: 1. Infeção Resolvida 2. Falso-positivo de anti-HBc 3. Portador de infeção crónica 4. Resolução da infeção aguda |

3.2.3. Hepatite D

Estruturalmente, o VHD, também conhecido como vírus da hepatite *delta*, é um vírus defetivo com RNA de cadeia simples circular que, por si só não consegue infetar o indivíduo, necessitando da presença de VHB para se poder replicar (McNabb, 2015).

Existem duas possibilidades de infeção por VHD, superinfeção ou co-infeção. A superinfeção ocorre quando um indivíduo com hepatite B é infetado com VHD, sendo uma infeção com maior propensão para evolução para doença hepática severa. A co-infeção ocorre quando um individuo saudável é infetado por VHB e VHD em simultâneo. Neste último caso, ocorre uma infeção aguda mais severa (Rizzetto, 2015).

Este vírus é principalmente transmitido pela via parenteral.

Laboratorialmente, a presença de VHD é detetada pela pesquisa de anticorpos anti-VHD (Rizzetto, 2015).

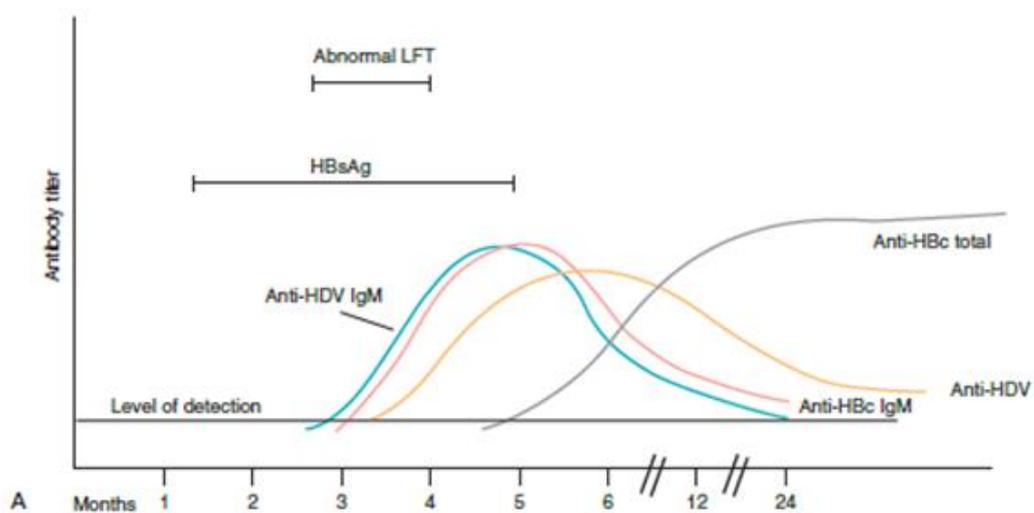


Figura 20 - Curso químico e serológico típico de coinfeção de VHB com VHD (Disponível em McNabb, 2015).

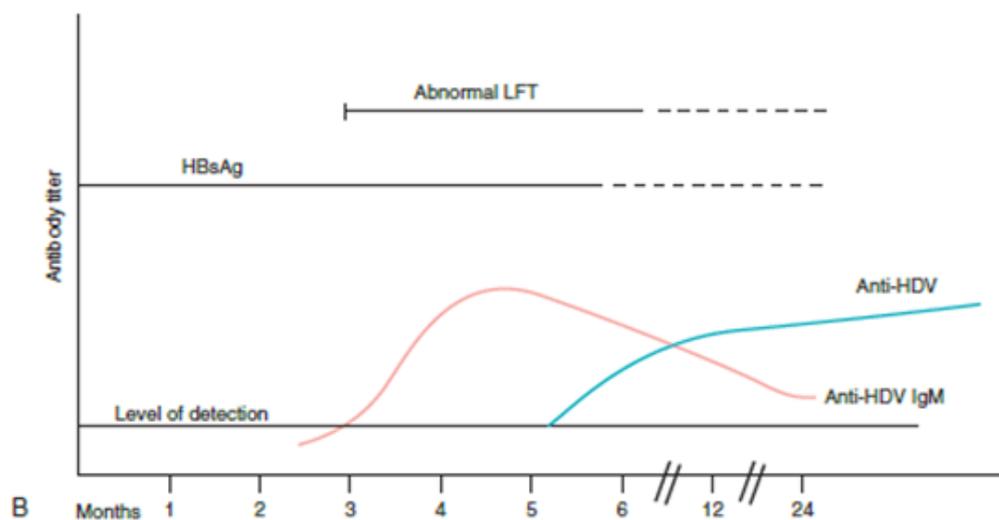


Figura 21 - Curso químico e serológico de superinfecção VHB-VHD (Disponível em McNabb, 2015).

3.2.4. Hepatite C

O vírus da hepatite C (VHC) pertence à família *Flaviviridae* e estruturalmente é envelopado e apresenta um genoma ssRNA (Kim, Chang, 2013).

A transmissão do VHC dá-se pelo contacto percutâneo a produtos sanguíneos (por exemplo, agulhas contaminadas), transfusões sanguíneas, contacto sexual desprotegido e por transmissão vertical (Turgeon, 2018b).

Este tipo de infeção corresponde à causa mais comum de hepatite crónica podendo ocorrer progressão para cirrose hepática. No entanto, existe ainda a possibilidade desta infeção ser resolvida e ocorrer recuperação.

Apesar da infeção por VHC ser, normalmente, assintomática os indivíduos infetados por este vírus poderão apresentar sintomas como fadiga, náuseas, fraqueza e icterícia que, embora sejam inespecíficos, auxiliam no diagnóstico da doença.

A hepatite C aguda é de difícil deteção precoce. No entanto, aproximadamente 8 semanas após ocorrer infeção com VHC, começam a surgir anticorpos anti-VHC que poderão ser detetados com testes serológicos.

Como a deteção de anticorpos anti-VHC é tardia, pode fazer-se pesquisa do genoma viral, uma vez que a presença de RNA de VHC é indicativo de infeção ativa (McNabb, 2015).

Caso não ocorra a resolução da doença durante os primeiros 6 meses, esta pode evoluir para a cronicidade, podendo manter-se estável ou ocorrer progressão da doença que poderá levar a insuficiência hepática, cirrose ou carcinoma hepatocelular.

A cronicidade da hepatite C pode estar associada a mutações virais que impedem a sua resolução por parte do sistema imunitário ou devido a replicação aumentada do VHC.

Laboratorialmente, na hepatite C crónica é detetada serologicamente a presença de anticorpos anti-VHC (Li, Lo, 2015).

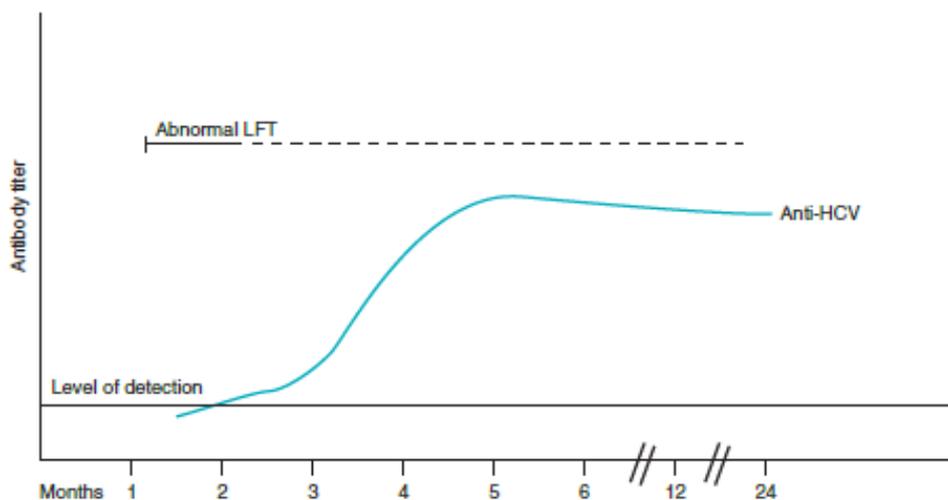


Figura 22 - Curso químico e serológico de HCV. (Disponível em McNabb, 2015).

3.3. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) faz parte da família *Retroviridae* e é um vírus envelopado responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Turgeon, 2018c). Este tipo de infeção tem como principal via de transmissão o contacto direto com fluídos biológicos infetados, nomeadamente, contacto sexual desprotegido, uso de seringas contaminadas e transmissão vertical (Chen *et al.*, 2015).

O retrovírus possui um ssRNA de polaridade positiva e transcriptase reversa. Uma vez que esta enzima viral é utilizada para o processo de retrotranscrição de RNA viral para DNA viral, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de mutações das proteínas do envelope, este vírus apresenta uma facilidade de escape ao sistema imunitário do hospedeiro. Para além deste processo, o vírus apresenta a capacidade de incorporar o seu DNA no DNA da célula hospedeira. Após essa integração do DNA viral, a célula inicia a produção de proteínas virais, dando-se a replicação do vírus e a consequente transmissão para novas células. Outra dificuldade associada a esta integração do genoma é a capacidade de produção viral ser novamente ativada após um período de latência viral nas células de memória que permanecem estáveis por longos períodos de tempo (Dahabieha *et al.*, 2015; Razooky *et al.*, 2015).

Este processo infeccioso inicia-se quando a proteína gp120 do envelope viral se liga aos recetores CD4 localizados na superfície das células alvo, nomeadamente, linfócitos TCD4 e, também, macrófagos e monócitos. Os macrófagos possuem um papel crucial na

disseminação do vírus pelo organismo. Após a integração do genoma viral na célula hospedeira, existe sempre potencial para replicação viral. Desta forma a infeção de novas células é contínua.

Existem dois tipos de HIV que embora sejam estruturalmente semelhantes a homologia da sequência nucleotídica é cerca de 50%. Apesar de o HIV-2 ser endémico na África Ocidental, a disseminação do HIV-1 é global. (Turgeon, 2018c)

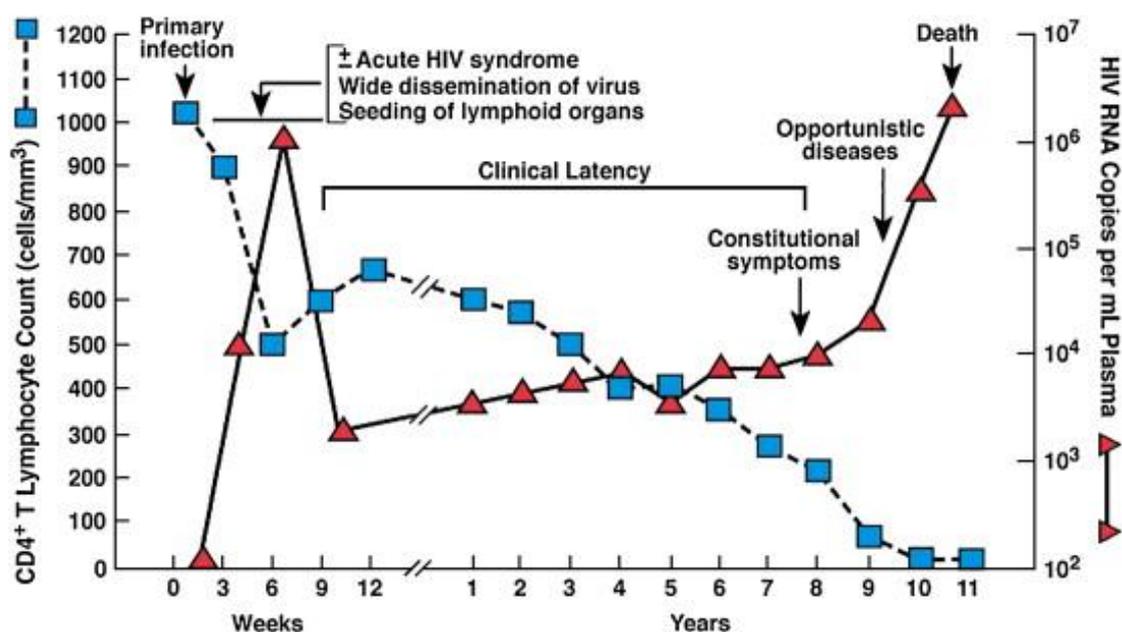


Figura 23 - Evolução da infeção por HIV (Disponível em Prokopia et al., 2016).

Durante o período de incubação, a sintomatologia nem sempre é perceptível, no entanto é um dos períodos em que probabilidade de contágio é mais relevante. Nesta fase, a carga viral no indivíduo encontra-se elevada levando a uma diminuição do número de linfócitos T CD4. Inicia-se uma resposta imunológica que leva à diminuição da carga viral e aumento de linfócitos T CD4. Em média, após 3 a 6 semanas, ocorre seroconversão, e os anticorpos estão detetáveis após 6 a 12 semanas (Sebastian et al., 2015; Blanche, 2016).

É na fase assintomática que se dá o período de latência clínica onde o indivíduo infetado não apresenta manifestações clínicas.

Aquando da ativação imunológica das células CD4 infetadas, o HIV passa do estado latente à produção de partículas virais, provocando destruição celular. Com isto, há diminuição gradual dessas células que provoca a debilitação do sistema imunológico. Quando a contagem de linfócitos T CD4 < 200 células/ μ L ou linfócitos TCD4 < 14% ou existência de doença oportunista, associados à presença de anticorpos anti-HIV, estamos na presença de SIDA (Sebastian *et al.*, 2015).

Teste de 4ª Geração

Dado o aumento de antigénio p24, após a infeção inicial, no LACCSMS é realizada a sua deteção, no soro, e a deteção de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

Este teste não consegue fazer a diferenciação entre antigénio p24, anticorpos anti-HIV-1 ou anticorpos anti-HIV-2 (Salmona *et al.*, 2014).

Na realização do teste serológico de rastreio de 4ª geração, o teste pode ser reativo ou não reativo. No caso deste ser não reativo, reporta-se como HIV negativo, caso contrário deve realizar-se o teste em duplicado. Neste último caso, se pelo menos um dos dois testes realizados for reativo, procede-se à realização de um teste rápido serológico de discriminação de HIV-1/HIV-2. Se os dois forem não reativos reporta-se como HIV negativo (Direção-Geral da Saúde, 2014).

No teste rápido serológico de discriminação HIV-1/HIV-2 podem suceder-se quatro situações:

- HIV-1 reativo e HIV-2 não reativo: HIV-1 positivo.
- HIV-1 não reativo e HIV-2 reativo: HIV-2 positivo.
- HIV-1 e HIV-2 reativos: HIV positivo (envia-se a amostra para um laboratório de referência).
- HIV-1 e HIV-2 não reativos ou inconclusivo: deve realizar-se o teste de ácido nucleico.

No teste de ácido nucleico pesquisa-se RNA de HIV-1 e, no caso deste ser detetado, reporta-se como HIV-1 positivo, caso contrário, reporta-se como HIV-1 não detetado. Neste último caso é também enviada a amostra para um laboratório de referência (Direção-Geral da Saúde, 2014).

3.4. INFEÇÕES BACTERIANAS

3.4.1. Sífilis

A sífilis é originada pela bactéria espiroqueta, *Treponema pallidum*, que é considerada um patógeno do ser humano. Estruturalmente, os treponemas são organismos finos e em espiral com 6 a 15 µm de comprimento e possuem uma membrana de estrutura trilaminar, parecida com a membrana das bactérias Gram negativas, de possível visualização no microscópio de fundo escuro (Pastuszcak, Wojas-Pelc, 2013).

A sífilis é uma doença de possível transmissão por contacto sexual e vertical e manifesta-se, principalmente, sob a forma de erupções cutâneas (Morshed, 2014).

Esta infeção bacteriana, se não for tratada, apresenta quatro estádios de desenvolvimento: sífilis primária, secundária, a mais contagiosa, latente e tardia.

O *T. pallidum* normalmente infiltra-se por lesões na pele ou nas mucosas. Desta forma, atinge o sistema circulatório e invade diversos órgãos do organismo. Após o período de incubação dá-se a formação de lesões, úlceras que se expandem progressivamente, que são indolores. Esses tipos de lesões localizam-se normalmente na zona genital, mas também é frequente o seu aparecimento ao redor da boca, mãos e garganta. A adenopatia da região também se resolve sem tratamento. Este estágio corresponde a sífilis primária (Mattei et al., 2012).

Até 6 meses após a formação da lesão, começam a aparecer os sintomas, como dor de cabeça, dor de garganta, febre e erupção cutânea. Esta fase, sífilis secundária, é a mais contagiosa embora, normalmente, se resolva após algumas semanas. Indivíduos infetados sem tratamento podem ainda sofrer recidivas que estarão em fase infecciosa e transmissível.

Após esta fase, o hospedeiro entra em estado de latência não infecciosa, em que só é detetado por métodos serológicos, sífilis latente (Mattei et al., 2012).

O doente pode desenvolver cronicidade com períodos intermitentes de sintomatologia aguda e de períodos assintomáticos. Neste estágio, sífilis tardia, podem aparecer granulomas que produzem lesões semelhantes a segmentos circulares que geralmente cicatrizam (Turgeon, 2018d).

Manifestações imunológicas

Face à infeção por *T. pallidum*, o organismo desenvolve dois tipos de anticorpos: anticorpos específicos dirigidos contra antígenos *T. pallidum*, anticorpos treponémicos e anticorpos inespecíficos contra componentes das próprias células, não treponémicos. Os anticorpos não treponémicos não específicos de sífilis, chamados de reaginas, estão também associados a outras doenças infecciosas, como artrite reumatoide, gravidez e malária sendo responsáveis por falsos positivos (Turgeon, 2012).

Os anticorpos anti-*T. pallidum* na fase latente, precoce ou não tratada, são predominantemente IgM (Turgeon, 2018d).

Na resposta imunológica à infeção primária desenvolvem-se anticorpos do tipo IgG, sendo que na sífilis secundária é onde se observa maiores concentrações de IgG.

A microscopia de campo escuro é o teste de escolha para doentes sintomáticos com sífilis primária. No entanto, o teste serológico para sífilis é o método mais comum de diagnóstico.

Há duas formas de diagnosticar serologicamente a sífilis: testes não treponémicos e testes treponémicos (Lehman, 2015).

Testes não-treponémicos

Testes não treponémicos detetam a presença de reaginas, um anticorpo formado contra uma molécula de cardiolipina, produzido por pessoas infetadas com *T. pallidum*, mas que também podem ser produzidos em casos de outras doenças infecciosas como tuberculose, malária, sarampo, hepatite e doenças autoimunes (Lehman, 2015).

Os testes não treponémicos são testes de rastreio qualitativo e quantitativo de sífilis tecnicamente mais fáceis e rápidos de execução que atuam por reações de aglutinação.

Os testes usuais não treponémicos são o RPR (*Rapid Plasma Reagin*) e VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) (Pastuszczak, Wojas-Pelc, 2013).

Em ambos os testes utilizam-se partículas revestidas com um antígeno que se ligam ao anticorpo que lhe é específico de forma a criar aglutinados visíveis macroscopicamente ou microscopicamente.

A VDRL pesquisa um anticorpo semelhante a um anticorpo reagina, que se liga ao antígeno do teste, partículas de colesterol revestidas de lecitina e cardioplipina, provocando a aglutinação (Turgeon, 2018d).

O RPR utiliza o mesmo antígeno que a VDRL mas ligado a partículas de carvão que permitem a aglutinação visível macroscopicamente (Lee et al., 2014; Lehman, 2015).

Na presença de anticorpos reagina por infeção de *T. pallidum* permite a ligação das partículas lipídicas do antígeno, promovendo a aglutinação. As partículas de carvão coalescem com os anticorpos e é visível no cartão branco de plástico aglomerados negros. No caso de não haver anticorpos, a solução permanece uniforme sem aglutinados (Lee et al., 2014).



Figura 24 - Teste RPR (Rapid Plasma Reagin) (Disponível em Laboratory Info).

Testes treponémicos

Os testes treponémicos são utilizados para confirmar os testes com reatividade para a sífilis. Baseiam-se na identificação e quantificação de anticorpos anti- *T. pallidum*, sendo os mais sensíveis e específicos (Turgeon, 2018d).

No protocolo para o rastreio de sífilis é usado o teste não treponémico seguido de um teste treponémico no caso de confirmação de amostra positiva. O teste treponémico é ideal para os casos de deteção da sífilis em estádios avançados. No entanto, na deteção de sífilis primária, quando existe uma quantidade abaixo do limite de deteção para este teste, só é detetável com o uso dos testes não treponémicos.

No LACCSMC é utilizado o método *Syphilis TP* que faz uma deteção qualitativa de anticorpos *T. pallidum* no soro humano.

Utiliza-se uma amostra de micropartículas revestidas com antígenos recombinantes de *T. pallidum*, aos quais se ligam os anticorpos anti-*T. pallidum* presentes no soro do indivíduo infetado.

Após a adição de anticorpos anti-IgG e anti-IgM marcados com éster de acridina, estes ligam-se aos anticorpos anti- *T. pallidum* do soro do indivíduo, resultando numa reação quimioluminescente (Turgeon, 2012).

3.5. ARQUITECT® CI 8200 DA ABBOTT DIAGNOSTICS

Na figura está representado um aparelho autoanalisador dividido em dois módulos, a bioquímica e a imunologia.

É neste o aparelho que se faz a serologia viral e bacteriana com o princípio instrumental de imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA) (Abbott, 2016).



Figura 25 - ARQUITECT® ci 8200
Da Abbott Diagnostics (Fotografia:
LACCSMC).

4. MICROBIOLOGIA

Este setor engloba a pesquisa de microrganismos, permitindo o diagnóstico e identificação microbiológica.

O setor de microbiologia é o que possui menos automatização o que tornará possível a realização de exames diretos e inoculação de várias amostras biológicas em meios de cultura apropriados.

A análise sumária de urina e sedimento urinário, bem como a urocultura, representam as análises mais solicitadas no LACCSMC. No caso de urocultura ser positiva, procede-se à sua quantificação, identificação e antibiograma.

Relativamente a amostras de fezes, realiza-se coprocultura para a pesquisa de *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter* em meios adequados, bem como, exame parasitológico de fezes e pesquisa de sangue oculto por testes imunocromatográficos.

A cultura de exsudato nasal realiza-se para pesquisa de *Staphylococcus aureus*.

Outras análises, mas menos frequentes, passam pela pesquisa de fungos em raspados de unha e pele.

5. BIOQUÍMICA

Este representa o setor com maior número de análises de rotina, determinando parâmetros bioquímicos, para o possível diagnóstico ou monitorização de determinadas patologias.

Estes parâmetros bioquímicos permitem avaliar indiretamente as diferentes funções do organismo, nomeadamente, a função renal, hepática, pancreática e cardíaca.

Os marcadores de diagnóstico possibilitam a compreensão do tipo de alterações estruturais, bioquímicas ou funcionais que afetaram o organismo, desencadeando determinada sintomatologia.

A amostra normalmente utilizada nestas determinações é o soro e os parâmetros analíticos, são analisados num dos módulos do aparelho ARQUITECT® ci 8200 da Abbott Diagnostics, à exceção da hemoglobina glicada (HbA1c).

CONCLUSÃO

O estágio curricular representa uma mais valia do Mestrado em Análises Clínicas, possibilitando a aplicação de conhecimentos adquiridos em contexto teórico.

Deste modo, torna-se viável a resolução de casos clínicos pela associação dos variados parâmetros analisados nos diferentes setores e quadro clínico do utente.

O sentido de responsabilidade no laboratório é essencial para o controlo de qualidade, visando a obtenção de confiança nos resultados, tendo sido essencial a aprendizagem das suas regras gerais de funcionamento.

Como a área de análises clínicas se encontra em constante mudança, com o aumento da tecnologia e automatização, é fundamental a capacidade crítica e por parte do especialista sugerindo ao clínico determinadas análises.

A interpretação dos resultados obtidos é uma rede complexa entre o historial do utente e a sua terapêutica, de forma a uma melhor interpretação dos mesmos.

Uma das limitações identificadas no estágio, prende-se com o facto de algumas análises se realizarem esporadicamente, devido à condicionante económica do laboratório.

Com a realização do estágio, desenvolvi um vasto leque de competências profissionais e pessoais, entre as quais, competências técnico-científicas, iniciativa, trabalho de equipa, coordenação e autonomia laboratorial que me proporciona um melhor desempenho enquanto profissional de saúde.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. Introduction to the Immune System. In Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. 5th ed. Elsevier. USA. 1(2016)1-24.

Abbott. ARCHITECT ci8200. (2016). [Acedido a 19 de maio de 2018] Disponível na Internet: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/architect/architectci8200>

Adamson J. W., Longo, D. L. The Cellular Basis of Hematopoiesis. In HARRISON'S Hematology and Oncology. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 2(2010) 9-21.

Adamson J. W., Longo, D. L. The Cellular Basis of Hematopoiesis. In HARRISON'S Hematology and Oncology. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 5(2010) 9-68.

Arkin C. F., Bessman J. D., Calam R. R., Ernst D. J., Parish G. T., Szamosi D. I., Warunek D. J., Wiseman J. D., Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard, NCCLS West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 23 (2003a) 19087-1898.

Arkin C. F., Davis B. H., Bessman J. D., Houwen B., LaDuca F. M., Michaud G. Y., Van Assendelft O. W. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline. 2nd ed. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Pennsylvania, USA. 24(2004) 1-34.

Arkin C. F., Ernst D. J., Marlar A., Parish G. T., Szamosi D. I., Wiseman, J. D. Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Standard, 5th Ed. NCCLS West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 23 (2003b) 19087-1898.

Ayodele O. J. Megaloblastic Anemia. In Current Topics in Anemia. InTec. Nigeria. 2(2018) 29-44.

Beckman Coulter. About Beckman Coulter / Company History. 2018. [Acedido a 17 de março de 2018] Disponível na Internet: <https://www.beckmancoulter.com/en/about-beckman-coulter/history>

Bishop M. L., Fody E. P., Schoeff L. E. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer. Philadelphia, USA, 6(2010) 180-183.

Blanche S. Mother to child HIV transmission. Bulletin de l'Academie Nationale de Medicine. France. 200(2016) 91-97.

Burns G.S., Thompson A. J. Viral Hepatitis B: Clinical and Epidemiological Characteristics. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Australia 4(2014) 1-14.

Butenas, S. Mann, K. Review: Blood coagulation. Biochemistry. Moscow. 67(2002): 3-12.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Acedido a 8 de maio de 2018] Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/serologicchartv8.pdf>

Chang M., Liaw Y. Hepatitis B flares in chronic hepatitis B: Pathogenesis, natural course, and management. Journal of Hepatology. European association for the study of the liver. Taiwan. 61(2014) 1407-1417.

Chen M., Ma Y., Yang C., Yang L., Chen H., Dong L., Dai J., Jia M., Lu L. The Combination of Phylogenetic Analysis with Epidemiological and Serological Data to Track HIV-1 Transmission in a Sexual Transmission Case. PLoS ONE. China. 10(2015) 1-12.

Clinical Hematology Atlas. Lymphocyte maturation. 2015. [Acedido a 7 de março de 2018] Disponível na Internet: <https://clinicalgate.com/lymphocyte-maturation/>

Colman, R., Clowes, A., Goldhaber, S., Marder, V. e George, J. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins. USA. (2006).

Cuthbert J. A. Hepatitis A: Old and New. American Society for Microbiology. USA. 14(2001) 38-58.

D'Orazio P., Meyerhoff M. E. Electrochemistry and Chemical Sensor. In Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th ed. Saunders Elsevier, USA, 5(2008) 84-101.

Dahabieh M., Battivelli E., Verdin E. Understanding HIV Latency: The Road to a HIV Cure. HHS Public Access. 66(2015) 407-421.

Direção-Geral da Saúde. Norma nº 058/2011 atualizada a 10/12/2014. Diagnóstico e Rastreio Laboratorial da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Portugal. 2014. [Acedido a 4 de julho de 2018] Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0582011-de-28122011-jpg.aspx>

Gerlich W. H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Gerlich Virology Journal*. BioMed Central. Germany 10(2013) 1-25.

Goasguen J. E., Bennett J. M., Bain B. J., Vallespi T., Brunning R., Mufti G. J. Morphological Evaluation Of Monocytes And Their Precursors. *Haematologica* 94(2009) 994-997.

Golijan E. F. Red Blood Cell Disorders. In *Rapid Review Pathology*. 4th ed. Elsevier Saunders. USA. 2(2014) 300-370.

Gómez-Gil P., Ramírez-Cortés M., González-Bernal J., Pedrero Á. G., Prieto-Castro C. I., Valencia D., Lobato R., Alonso J. E. A Feature Extraction Method Based on Morphological Operators for Automatic Classification of Leukocytes. *Seventh Mexican International Conference on Artificial Intelligence (MICAI)*. IEEE Computer Society. 2008, 227-232.

Higgins, T., Beutler E., Doumas B. T. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. In *Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6th ed. Saunders Elsevier, USA, 28(2008) 1509-526.

Hoffbrand A. V., Moss P. A. H. Haematological changes in systemic diseases. In *Hoffbrand's Essential Haematology*, 7th ed. John Wiley & Sons Ltd. USA. 29(2016d) 321-332.

Hoffbrand A. V., Moss P. A. H. Platelets, blood coagulation and haemostasis. In *Hoffbrand's Essential Haematology*, 7th ed. John Wiley & Sons Ltd. USA. 24(2016b) 264-277.

Hoffbrand A. V., Moss P. A. H. The white cells 1: granulocytes, monocytes and their benign disorders. In *Hoffbrand's Essential Haematology*, 7th ed. John Wiley & Sons Ltd. USA 8(2016a) 87-101.

Hoffbrand A. V., Moss P. A. H. Thrombosis 2: treatment. In *Hoffbrand's Essential Haematology*, 7th ed. John Wiley & Sons Ltd. USA. 28(2016c) 311-320.

Holland S. M., Gallin J. I., Disorders of Granulocytes and Monocytes. In *HARRISON'S Hematology and Oncology*. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 5(2010) 42-56.

Jobin, F. L'Hemostase, Les Presses de L'Université Laval, Editions Maloine. France. (1995).

Jou J. M., Cocola F., Davis B. H., Derioni C., Dorman J., Koepke J. A., Lewis S. M., Montanari R., Parikh M., Plebani M., Smith S. S. Procedures for the Erythrocyte Sedimentation Rate Test; Approved Standard. 5th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. (11)2011 1-23.

Kalpathi R., Atkinson M. A., Warady B. A. Special Populations with Anemia: Anemia in the Pediatric Patient. Springer Science and Business Media LLC. USA. 12(2018) 199-240.

Kawthalkar S. M. Approach to Diagnosis of Anaemias. In Essentials of Haematology. 2nd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers. India. 2(2013) 52-70.

Kim C. W., Chang K. Hepatitis C vírus: virology and life cycle. Clinical and Molecular Hepatology. USA. 19(2013) 17-25.

Klee G. G., Westgarg. J. O. Quality Management. In Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th ed. Saunders Elsevier, USA, 16(2008) 249-262.

Koenig K. L., Shastry S., Burns M. J. Hepatitis A Virus: Essential Knowledge and a Novel Identify-Isolate-Inform Tool for Frontline Healthcare Providers. Western Journal of Emergency Medicine. USA. 18(2017) 1000-1007.

Kratz A. Plebani M., Peng M., Lee Y.K. McCafferty R. Machin S. J. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. International Journal of Laboratory Hematology. USA. (2017) 448-457.

Laboratory Info. Rapid Plasma Reagin (RPR) Test: Principle, Procedure, Interpretation and Limitations. (2017). [Acedido a 17 de maio de 2018] Disponível em <https://laboratoryinfo.com/rpr/>

Lawrence L. W., Broussard L. A. Porphyrins and Hemoglobin. In Clinical Chemistry Tecniques, Principles, Correlations. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 18(2010) 424-442.

Lee J. H., Lim C.S., Lee M., Kim H. BMJ. Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing. BMJ Open. Korea 4(2014) 1-6.

Lehman D. C. Immunodiagnosis of Infectious Diseases. In Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Saunders Elsevier. USA. 10(2015) 198-225.

Li H., Lo S. Hepatitis C vírus: Virology, diagnosis and treatment. World Journal of Hepatology. Taiwan. 7(2015) 1377-1389.

Liang T. J. Hepatitis B: The Virus and Disease. In Hepatology. National Institutes of Health. USA. 49(2009) 13-2.

Longanbach S., Chapman D. H. Miers M. K. Automated Cell-Counting Instrumentation. In Hematology Clinical Principles and applications. 4th ed. Elsevier Saunders. USA. 39(2012) 598-625.

Longo, D. L., Fauci A. S., Kasper D. L., Braunwald E., Hauser S. L., Jameson J. L., Loscalzo J. In HARRISON'S Hematology and Oncology. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 1(2010) 1-11.

Manchanda N. Anemias. Red Blood Cell Morphology and Approach to Diagnosis. In Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications. 5th ed. Elsevier Saunders. USA. 19(2016) 284-296.

Mattei P., Beachkofsky T., Gilson R., Wisco O. Syphilis: A Reemerging Infection. American Family Physician. USA 86(2012) 433-440.

McNabb K. M. Clinical Virology. In Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Saunders Elsevier. USA. 29(2015) 688-725.

Medical Biochemistry. Processo of Erythropoiesis. PT Magazine. (2018). [Acedido a 25 de fevereiro de 2018] Disponível na Internet: <http://www.medbiochemistry.com/process-of-erythropoiesis/>

Morshed M. G. Current Trend on Syphilis Diagnosis: Issues and Challenges. In Infectious Diseases and Nanomedicine II. Springer (2014) 51-64.

Muñoz M., García-Erce J. A., Remacha A. F. Disorders of iron metabolism. Part I: molecular basis of iron homeostasis. J Clin Pathol. Spain. 64(2011) 281-286.

Napolitano M., Schmaier A. H., Kessler C. M. Coagulation and Fibrinolysis. In HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 23th ed. ElsevierUSA. 39(2017) 794-811.

Pastuszczak M., Wojas-Pelc A. Current standards for diagnosis and treatment of shypilis: selection of some practical issues, based on the European (IUSTI) and U.S. (CDC) guidelines. Postep Derm Alergol. Poland. 4(2013) 203-210.

Prokopia V., Paparizos V., Ilektra N., Christina A., Katsambas A., Rigopoulos D. Predictive and diagnostic value of VZV infections in HIV patients: Clinical and laboratory cross-correlations between VZV and HIV infections. Global Dermatology. Grece 3(2016) 351-355.

Razooky B S., Pai A., Aull K., Rouzine I.M., Weinberger L. S. A hardwired HIV latency program. HHS Public Access 160(2015) 990-1001.

Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Italy. 1(2015) 1-9.

Salmona M., Delarue S., Delaugerre C., Simon F., Maylin S. Clinical evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1 p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody. Journal of Clinical Microbiology. France 52(2014) 113-107.

Scadden D. T., Longo, D. L. Hematopoietic Stem Cells. In HARRISON'S Hematology and Oncology. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 1(2010) 1-8.

Sebastian S., Nelson A. M. HIV and the spectrum of human disease. Journal of Pathology. USA. 235(2015) 229-241.

Tefferi A. Anemia in Adults: A Contemporary Approach to Diagnosis. Mayo Clin Proc. USA. 78(2003) 1274-1280.

Turgeon M. L. Acquired Immunodeficiency Syndrome. In Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 6th ed. Elsevier 25(2018c) 322-345.

Turgeon M. L. An Overview of Immunology. In Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 6th ed. Elsevier 1(2018a) 1-13.

Turgeon M. L. Immunology and Serology. In Linne & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: the basics and routine techniques. 6th ed. Elsevier Mosby. USA. 17(2012) 520-540.

Turgeon M. L. Syphilis. In Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 6th ed. Elsevier 17(2018d) 225-240.

Turgeon M. L. Viral Hepatitis. In Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 6th ed. Elsevier 23(2018b) 287-314.

Weitz J. I. Antiplatelet, Anticoagulant, and Fibrinolytic Drugs. In HARRISON'S Hematology and Oncology. McGraw-Hill Companies, Inc. USA 22(2010) 264-282.

World Health Organization. Global Nutrition Targets 2025 Anaemia Policy Brief. WHO. Switzerland. 2014.