



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Isabel Ferreira Rodrigues

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular, realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Isabel Ferreira Rodrigues

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular, realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023

“A vida é maravilhosa quando não se tem medo dela.”

Charles Chaplin

Agradecimentos

O presente Relatório de Estágio marca o fim de mais uma etapa no meu percurso académico, e não podia deixar de expressar o meu agradecimento a todos aqueles que me acompanharam e apoiaram durante esta caminhada e, de que alguma forma, contribuíram para o meu sucesso. Em especial:

Aos meus pais, agradeço por me terem dado a oportunidade de prosseguir com a minha formação académica, por estarem sempre do meu lado a darem alento e nunca me deixarem desistir, mesmo nos momentos difíceis, e por todo o esforço que fazem para me dar o melhor que conseguem. Ao meu irmão Francisco obrigada pelo animo e força.

Aos meus avós, muito obrigada por me encorajarem a seguir os meus sonhos.

Ao Zé, à Lena e ao Jorge obrigada pela força e ajuda que me deram.

Às minhas companheiras de Laboratório, agradeço o terem partilhado comigo os vossos conhecimentos. Expresso os meus agradecimentos também à Professora Doutora Ana Miguel Matos, que tão humana e sabiamente me orientou e sempre se mostrou disponível para me ajudar. À Daniela Veiga, agradeço os seus conselhos e apoio, que muitas vezes acalmaram o meu coração. À D. Dulce, obrigada pelo seu carinho e pelos bons momentos que partilhamos. À Ana Rita, Dona Dulce e Teresa um especial obrigado pela calorosa integração, carinho e força que me deram.

Agradeço também à Professora Doutora Cristina Luxo a colaboração prestada.

A ti Coimbra, obrigada pelos bons momentos, por me ajudares a crescer enquanto pessoa, pelas pessoas com quem tive a oportunidade de conviver, pelos “*sonhos e tradições*”. Sem dúvida ensinaste-me a “*dizer saudade*”.

Um obrigada de coração,

Ana Rodrigues

Índice

Lista de Abreviaturas	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xii
Resumo	xiii
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório de Estágio	2
3. Controlo de qualidade	3
3.1 Controlo interno de qualidade.....	3
3.2 Controlo externo de qualidade	3
4. Atividades desenvolvidas	4
4.1. Fase pré-analítica	4
4.1.1 Amostras analisadas	4
4.2 Fase analítica	5
SETOR DE HEMATOLOGIA	5
A. Amostra	7
B. Hemograma.....	8
B.1 Eritrócitos.....	9
B.2 Leucócitos	10
B.3 Plaquetas	11
C. Esfregaço do sangue periférico	12
D. Alterações das linhagens celulares	13
D. 1 Alterações dos eritrócitos.....	13
D.2 Alterações dos leucócitos.....	15
D.3 Alterações das plaquetas	17
E. Velocidade de sedimentação dos eritrócitos.....	18
F. Grupos sanguíneos.....	19
F.1 Sistema AB0.....	19
F.2 Sistema Rh	20
Caso Clínico 1	21
G. Hemostase.....	23
G. 1 Avaliação laboratorial da hemostase	25
G.1.1 Tempo de protrombina (PT)	26
G.1.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)	26
Caso Clínico 2.....	27
SETOR DE IMUNOLOGIA	29
A. Amostra	31
B. Serologia infecciosa	32
B.1 Vitek Immuno Diagnostic Assay System.....	32
B.1.1 Vírus da imunodeficiência humana.....	33
B.1.2 Vírus da hepatite B	34
B.1.3 Hepatite C.....	35
B.1.4 Toxoplasma gondi	36
B.1.5 Citomegalovírus	38

B.1.6 Rubéola.....	39
B.2 Técnicas de aglutinação.....	40
B.2.1 Sífilis.....	40
Caso Clínico 3.....	42
B.3 Lateral flow assays.....	42
B.3.1 Calprotectina.....	43
Caso Clínico 4.....	44
B.3.2 Streptococcus pyogenes	45
B.3.3 Campylobacter	45
B.3.4 SARS-CoV-2	46
C. Doenças autoimunes.....	46
C.1 Regulação do eixo hipotálamo hipófise tiroide.....	46
C.2 Alteração da função tiroideia	47
C.2.1 Tiroide te Hashimoto	48
C.2.2 Doença de Graves	48
Caso Clínico 5.....	48
SETOR DE MICROBIOLOGIA.....	49
SETOR DE BIOQUÍMICA	50
SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR	51
4.3 Apoio a estudos e investigação.....	51
4.4 Fase pós-analítica	52
5. Conclusão.....	53
6. Referências.....	56

Lista de Abreviaturas

- **AEQ** - Avaliação externa da qualidade
- **Ag HBc** - Antígeno do core do vírus da hepatite B;
- **Ag HBe** - Antígeno da cápside do vírus da hepatite B;
- **Ag HBs** - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- **Anti-HBc** - Anticorpos contra o antígeno do core do vírus da hepatite B;
- **Anti-HBe** - Anticorpos contra o antígeno da cápside do vírus da hepatite B;
- **Anti-HBs** - Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- **Anti-Tg** - Auto-anticorpos da tiroglobulina;
- **Anti-TPO** - Auto-anticorpos contra a peroxidase da tiróide;
- **API** - Analytical Profile Index
- **APTT** - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada;
- **CD** - Cluster of differentiation
- **CHCM** - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média;
- **CIEPQPF** - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta
- **CMV** - Citomegalovírus;
- **COVID-19** - Doença resultante do coronavírus 2019
- **CQE** - Controlo da Qualidade Externo;
- **CQI** - Controlo da Qualidade Interno;
- **DAMP** - Damage-associated molecular pattern
- **DNA** - Ácido desoxirribonucleico;
- **EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;
- **ELFA** - Enzyme Linked Fluorescent Assay
- **ELISA** - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- **ESP** - Esfregaço de Sangue Periférico
- **FTA-ABs** - Fluorescent Treponemal Antibody Absortion Test
- **Hb A** - Hemoglobina A;
- **Hb A2** - Hemoglobina A2;
- **Hb F** - Hemoglobina fetal;
- **HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média;
- **HCT** - Hematócrito

- **HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana;
- **IDP/PDW** - Índice de Dispersão das Plaquetas;
- **IgD** - Anticorpos de imunoglobulina D;
- **IgE** - Anticorpos de imunoglobulina E;
- **IgG** - Anticorpos de imunoglobulina G;
- **IgM** - Anticorpos de imunoglobulina M;
- **INR** - Razão Internacional Normalizada;
- **INSA** - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
- **ISI** - Índice de Sensibilidade Internacional;
- **LACUC** - Laboratório de Análises da Universidade de Coimbra;
- **LED** - Diodo Emissor de Luz
- **MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade
- **NK** - Células Natural Killer;
- **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase;
- **RDW** - Índice de Distribuição dos Eritrócitos;
- **RNA** - Ácido ribonucleico;
- **RPR** - Rapid Plasma Reagin
- **SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- **T3** - Triiodotironina;
- **T4** - Tiroxina;
- **TBG** - Globulina de ligação à tiroxina
- **TF** - Fator tecidual;
- **TP** - Tempo de Protrombina;
- **TPPA** - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada;
- **TRH** - Hormona libertadora de tireotrofina;
- **TSH** - Hormona estimulante da tiroide;
- **VCM** - Volume Corpuscular Médio;
- **VHB** - Vírus da hepatite B
- **VHC** - Vírus da Hepatite C
- **VIDAS** - Vitek Immuno Diagnostic Assay System
- **VMP** - Volume Plaquetário Médio;
- **VS** - Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos;
- **VWF** - Fator von Willebrand.

Índice de Figuras

Figura 1: Processo de hematopoiese na medula óssea.....	7
Figura 2: Técnica manual para determinar a velocidade de sedimentação..	19
Figura 3: Determinação do sistema Rh do utente.....	22
Figura 4: Determinação do sistema AB0 do utente.	22
Figura 5: Resultado obtido resultante da realização do teste do D fraco.	23
Figura 6: Representação esquemática da cascata de coagulação do sangue.	24
Figura 7: Esfregaço de sangue periférico ao microscópio ótico do utente a 1000X (100X da objetiva e 10X da ocular) (fotografado no LACUC).....	27
Figura 8: Diluições serológicas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) e subsequente teste RPR de cada uma. Ponteados cinzentos resultam de reações de aglutinação (fotografado no LACUC).....	42
Figura 9: Medição de calprotectina fecal pelo aparelho automático após migrar num lateral flow assay (fotografado no LACUC).....	44
Figura 10: Imagem do resumo do poster apresentado no 10º Congresso de Virologia, “Pandemias na Era da Globalização & VI Congresso Nacional de Virologia”, organizado pela Sociedade Portuguesa de Virologia, decorrido em Coimbra, Portugal.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1: Equipamentos usados no LACUC em cada área laboratorial e a sua técnica de determinação.....	2
Tabela 2: Tubos utilizados no LACUC para colheita de sangue venoso e aplicação dos diferentes produtos obtidos nos respetivos setores.	5
Tabela 3: Classificação do tipo de anemias com base nos índices eritrocitários e os principais tipos de anemias.	14
Tabela 4: Parâmetros eritrocitários determinados pelo analisador automático DxH500....	15
Tabela 5: Alterações quantitativas relativas aos leucócitos e as principais situações clínicas associadas.	16
Tabela 6: Presença dos diferentes antigénios à superfície dos eritrócitos de acordo com os diferentes grupos sanguíneos, os sistemas ABO e Rh.....	21
Tabela 7: Resultados hematológicos e bioquímicos obtidos pelo autoanalisador DxH 500 e Architect, respetivamente.....	27
Tabela 8: Tipo de imunoglobulinas sintetizadas pelos plasmócitos e as suas principais funções.	31
Tabela 9: Diagnóstico serológico com base nos marcadores serológicos indicativos de hepatite B presentes no soro do utente.	35
Tabela 10: Diagnóstico com base nos marcadores serológicos de <i>Toxoplasma Gondii</i> presentes no soro do utente.	38
Tabela 11: Parâmetros de avaliação da função tiroideia do utente e os respetivos resultados.	48

Resumo

Ao longo dos últimos anos, a área das análises clínicas tem vindo a tornar-se uma ferramenta insubstituível no âmbito da saúde e cuidados médicos, pois é um elemento essencial para o diagnóstico e monitorização clínica e tomada de decisões. Assim, além de necessitar de constante atualização e formação dos profissionais que intervêm no serviço clínico, também é primordial que o laboratório promova responsabilidade, trabalho em equipa, transdisciplinaridade, qualidade no serviço prestado ao utente e melhoria dos seus procedimentos de modo a assegurar resultados analíticos o mais realístico possíveis.

O estágio Curricular, que teve lugar no Laboratório de análises Clínicas da Universidade de Coimbra, e o presente relatório surgem no âmbito do 2º ano de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio curricular realizado no período de janeiro a junho de 2023 foi essencial para consolidar o conhecimento adquirido ao longo destes dois anos teóricos. Assim, este relatório é reflexo do trabalho que acompanhei e realizei, bem como a caracterização dos procedimentos realizados em cada uma das valências laboratoriais, com especial destaque para a Hematologia e Imunologia.

Palavras-Chave: Análises Clínicas, Hematologia, Imunologia, Patologia clínica, Controlo de qualidade.

Abstract

Over the past few years, the area of clinical analysis has become an irreplaceable tool in health and medical care, as it is an essential element for diagnosis and clinical monitoring and decision making. Thus, in addition to requiring constant updating and training of professionals involved in the clinical service, it is also essential that the laboratory promotes responsibility, teamwork, transdisciplinarity, quality of service to the user and improvement of its procedures in order to ensure the most realistic analytical results possible.

The curricular internship, which took place in the Laboratory of Clinical Analyses of the University of Coimbra, and the present report are part of the 2nd year of the Master's Degree in Clinical Analyses of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The curricular internship carried out from January to June 2023 was essential to consolidate the knowledge acquired over these two theoretical years. Thus, this report reflects the work that I followed and performed, as well as the characterization of the procedures performed in each of the laboratory valences, with special emphasis on Hematology and Immunology.

Keywords: Clinical Analysis, Hematology, Immunology, Clinical Pathology, Quality Control.

I. Introdução

Desde cedo que o Homem teve necessidade de compreender o organismo humano e demonstrou interesse em perceber o binómio saúde e doença. Por exemplo, o povo da Grécia antiga afirmava que “*o sangue continha algo maligno e que deveria ser libertado para que o doente fosse curado*”. (Barata, 2021) Embora este procedimento não possua nenhum fundamento científico, se interpretássemos esse raciocínio à luz do conhecimento atual, poder-se-á afirmar que os analitos precisam de estar dentro dos limites de referência na corrente sanguínea para haver um equilíbrio saudável.

Ao longo do tempo verificou-se uma evolução do estudo do organismo humano e, consequentemente, um desenvolvimento das técnicas laboratoriais e um aumento do número de analitos investigados de modo acompanhar o progresso médico. Por isso, as análises clínicas têm vindo a assumir uma importância significativa e a ter um impacto crescente em vários domínios, tais como a predisposição, deteção precoce, diagnóstico, personalização e monitorização do tratamento. Desta forma, é imperativo haver um aperfeiçoamento e melhoria constante do conhecimento analítico e das técnicas laboratoriais, uma vez que todas as informações que se podem obter através do diagnóstico laboratorial são cruciais para a tomada de decisões clínicas, serviços de saúde, melhoria dos cuidados e, consequentemente, para a saúde e qualidade de vida da população.

Para minimizar a probabilidade de erros laboratoriais e aumentar a produtividade, a utilização de métodos automáticos para processamento das amostras tem vindo a aumentar cada vez mais. No entanto, isto não dispensa que o técnico use o seu espírito crítico e compreenda o princípio de funcionamento dos aparelhos para que consiga interpretar corretamente os resultados.

Este estágio curricular surgiu no âmbito do 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio iniciou-se a 9 de janeiro de 2023 no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos e da Professora Doutora Cristina Luxo.

De facto, este estágio serviu para consolidar e aplicar as aprendizagens adquiridas durante estes dois anos e, principalmente, alcançar competência técnica, profissionalismo, rigor, responsabilidade e desenvolver a capacidade de trabalho em equipa. Para tal, durante estes meses tive a oportunidade de contactar com cinco valências laboratoriais, hematologia, bioquímica, imunologia, microbiologia e biologia molecular, nos quais aprendi a trabalhar com os diversos equipamentos, executei as diferentes técnicas manuais, interpretei os resultados obtidos e, ainda adaptei-me à dinâmica e rotina de trabalho laboratorial.

O relatório apresentado reflete a minha experiência enquanto estagiária no LACUC, sendo nele abordadas as valências laboratoriais que desenvolvi durante estes 6 meses de estágio, com especial destaque para as valências de Hematologia e Imunologia.

2. Caracterização do Laboratório de Estágio

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) localizava-se no edifício da Faculdade de Farmácia desde 1983 e servia a população em geral, auxiliava a formação dos estudantes e apoiava a investigação e estudos da comunidade académica.

Desde 2020, sob a direção técnica da Professora Doutora Ana Miguel Matos, as instalações reabriram no polo I no edifício da Faculdade de Medicina, para servir inicialmente apenas o diagnóstico e monitorização da infeção por SARS-CoV-2. Mais tarde retomou as funções já anteriormente realizadas, atuando nas diferentes valências laboratoriais: bioquímica, hematologia, microbiologia e imunologia.

A equipa laboratorial é composta por uma equipa multidisciplinar, com farmacêuticos especialistas em Análises Clínicas e técnicos superiores de saúde.

Entre as 8.30h e as 16h de segunda a sexta é possível fazer a colheita de sangue, exsudados faríngeos e nasais e recolha de outros produtos biológicos, como fezes, urina, exsudados uretrais e vaginais, que auxiliam o rastreio, diagnóstico e monitorização clínica de diferentes patologias.

O LACUC possui vários equipamentos que dão suporte às valências referidas anteriormente, que estão indicados na Tabela I. Contudo, a área de microbiologia ainda assenta em técnicas manuais, pelo que não são referidos equipamentos. No entanto, o LACUC não realiza todas as determinações analíticas e ensaios laboratoriais e, por isso, subcontrata um laboratório externo para a realização das mesmas.

Tabela I: Equipamentos usados no LACUC em cada área laboratorial e a sua técnica de determinação.

Área	Equipamento	Metodologia
Bioquímica	Arquitect c4000 <i>Abbot</i>	Espetrofotometria Imunoturbidimetria Potenciometria
Imunologia	VIDAS <i>bioMérieux</i>	ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)
	Arquitect i1000 <i>Abbot</i>	CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)
Hematologia	DxH500 <i>Beckman Coulter</i>	Princípio de <i>Coulter</i> e Perda de Luz Axial
Biologia Molecular	Alinity m da <i>Abbot</i>	Polymerase Chain Reaction em tempo real

3. Controlo de qualidade

Todos os laboratórios de análises clínicas devem assegurar que os resultados analíticos fornecidos ao utente e/ou clínico sejam o reflexo fidedigno da condição clínica do utente. Assim, a implementação de um programa de controlo de qualidade num laboratório é imprescindível de forma que os resultados obtidos sejam uma ferramenta útil para estabelecer o correto diagnóstico, tratamento e prognóstico do utente. Deste modo, o controlo de qualidade num laboratório de análises clínicas engloba um conjunto de procedimentos que visam assegurar a qualidade e fiabilidade dos resultados prestados aos seus utentes, sem comprometer a sua segurança, inclusive resolver as não conformidades instauradas e promover a melhoria contínua. (Vieira *et al.*, 2011)

Diariamente o LACUC tem o compromisso de garantir o sucesso e qualidade de todas as áreas laboratoriais ao longo das suas fases laboratoriais (pré-analíticas, analítica e pós analítica) através de tarefas e procedimentos, que fazem parte do controlo de qualidade interno e externo.

3.1 Controlo interno de qualidade

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste num conjunto de práticas de controlo e manutenções diárias, semanais e mensais aplicadas aos procedimentos técnicos e equipamentos em todas as áreas laboratoriais, que permitem avaliar a precisão dos procedimentos analíticos. Assim, esta avaliação torna-se importante para monitorizar, identificar e verificar a ocorrência de erros que possam afetar a precisão dos resultados. Na eventualidade dos resultados do CQI serem discordantes dos valores esperados, pode-se previamente instaurar ações corretivas de modo a não afetar os resultados determinados e ações para prevenir futuros erros. (Nichols, 2011)

Esta avaliação é de extrema importância para melhorar de forma contínua a qualidade do serviço prestado aos utentes.

3.2 Controlo externo de qualidade

O controlo de qualidade externo (CQE) consiste num programa interlaboratorial que visa avaliar o desempenho do laboratório, assim como os procedimentos realizados. (Badrick, 2021)

A exatidão dos resultados fornecidos pelo LACUC é assegurada pela participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), e supervisionado, nomeadamente, pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Para a realização destas avaliações o INSA envia ao LACUC amostras que posteriormente devem ser processadas como amostras normais, e os resultados obtidos serão reportados via online. O INSA avaliará os resultados e emitirá um relatório que é comunicado à equipa técnica de forma a corrigir as eventuais falhas e implementar medidas de melhoria.

4. Atividades desenvolvidas

4.1. Fase pré-analítica

De acordo com a Norma ISO 15189:2012 para acreditação laboratorial, a fase pré-analítica compreende as etapas desde solicitação pelo clínico e requisição do exame, a preparação do doente, a colheita da amostra primária, até ao transporte ao laboratório e termina quando começa o processo analítico. Admite-se que em qualquer uma destas etapas pode ocorrer um erro que pode ter influência nos resultados obtidos. (Plebani *et al.*, 2014)

Embora se tenha verificado uma diminuição significativa do número de erros a nível dos laboratórios clínicos, a fase pré-analítica continua a ser a fase mais vulnerável à ocorrência de erros. Cerca de 70% dos erros laboratoriais ocorridos são erros pré-analíticos, sendo crucial o laboratório implementar estratégias preventivas. Tendo em conta que cerca de 65% dos dados laboratoriais afetam decisões para o doente, como a medicação, admissão ou alta hospitalar, o trabalho realizado a nível laboratorial tem impacto para a qualidade do serviço prestado. (Rin, Da, 2009) Os erros pré-analíticos mais frequentes prendem-se com o incumprimento das instruções de colheita, como o jejum adequado obrigatório ou toma de medicamentos, incorreta identificação dos tubos, contaminação da amostra pelos aditivos presentes no tubo e transporte inadequado e condições de armazenamento ineficazes. (Jafri *et al.*, 2022)

No LACUC, o serviço prestado ao utente inicia-se com a ativação da prescrição, a inscrição do utente e o registo das análises requisitadas no sistema informático de gestão laboratorial designado por *Appolo*.

4.1.1 Amostras analisadas

Uma das amostras mais colhidas no LACUC é o sangue venoso. Existem diferentes tubos de colheita (Tabela 2) que obedecem a um código de cores universal, e que são escolhidos tendo em conta a análise pretendida. O sangue é recolhido para os diferentes tubos segundo uma ordem padronizada, de modo a evitar a contaminação do sangue com os aditivos presentes nos tubos e, conseqüentemente, a alteração dos resultados analíticos. A ordem

correta de introdução do sangue nos tubos é a seguinte: o tubo sem anticoagulante, o tubo com EDTA, o tubo com citrato de sódio a 3,8% e, por fim, o tubo com citrato de sódio a 3,2%.

Assim, em cada tubo obtém-se produtos derivados da amostra diferentes que, por sua vez, são utilizados para fazer diferentes determinações analíticas, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Tubos utilizados no LACUC para colheita de sangue venoso e aplicação dos diferentes produtos obtidos nos respectivos setores.

Cor do tubo	Anticoagulante presente	Produto obtido	Setor/utilidade
Vermelho	Sem anticoagulante	Soro	Bioquímica e Imunologia
Roxo	EDTA*	Sangue total	Hematologia Velocidade de sedimentação Hemograma Eletroforese de hemoglobinas Hemoglobina glicada Esfregaço do sangue periférico
Azul	Citrato de sódio (3,2%)	Plasma	Provas de coagulação Tempo de Protombina (TP) Tempo de Tromboplastina ativada (TTPa)
Preto	Citrato de sódio (3,8%)	Sangue total	Velocidade de sedimentação dos eritrócitos

* EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

Para além do sangue venoso, o LACUC também procede à análise de outros produtos biológicos colhidos pelos técnicos, como exsudados da nasofaringe e orofaringe para microbiologia e ainda, produtos colhidos pelo utente e, posteriormente, entregues no laboratório para análise, como a urina, fezes e exsudados vaginais e uretrais.

4.2 Fase analítica

SETOR DE HEMATOLOGIA

O sangue é um tecido conjuntivo constituído por elementos celulares suspensos numa matriz extracelular (plasma). (Betts *et al.*, 2017) Os elementos celulares constituem cerca de 45% e o plasma cerca de 55% do volume total do sangue. O sangue desempenha inúmeras funções, inclusivamente, o transporte de hormonas, nutrientes, produtos de excreção celular e gases, defesa do organismo, distribuição do calor e manutenção da homeostase. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Os elementos celulares que constituem o sangue são os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) O plasma é constituído principalmente por água, cerca de 92%, o que torna o sangue um tecido fluído com elementos celulares com capacidade de circular por todo o organismo. O plasma também possui uma pequena percentagem de substâncias dissolvidas que estão presentes em diferentes proporções. (Betts *et al.*, 2017) A maioria desses componentes presentes no plasma são proteínas, como a albumina, as globulinas e o fibrinogénio, e em menor quantidade as hormonas, enzimas, proteínas reguladoras, iões, gases dissolvidos (como o oxigénio e o dióxido de carbono), e outras moléculas, como glucose, aminoácidos, lípidos e vitaminas. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

A hematopoiese é o processo pelo qual se produz continuamente sangue (Figura 1) e o local em que esta ocorre varia ao longo da idade. Durante o desenvolvimento uterino realiza-se no saco vitelino, fígado, baço e medula óssea pelas células estaminais hematopoiéticas. Mas após o nascimento, a hematopoiese realiza-se essencialmente na medula óssea e alguns tecidos linfoides. Por fim no ser adulto, este processo está confinado à medula óssea de alguns ossos, como costelas, esterno, vertebrae, pélvis e extremidades do fémur e úmero. A hematopoiese inicia-se com a estimulação da célula estaminal pluripotente (célula indiferenciada) por fatores de crescimento hematopoiéticos. Em consequência da estimulação, a célula divide-se por mitose e origina duas células, uma delas irá substituir a célula estaminal pluripotente que assegura a produção de células hematopoéticas (*self-renewal*) e a outra célula irá prosseguir o seu desenvolvimento e maturação até se transformar numa célula progenitora de uma das linhagens (mieloide ou linfóide). O desenvolvimento, diferenciação e maturação que ocorre ao longo da hematopoiese é regulado pela presença de fatores de crescimento hematopoiéticos específicos de cada linhagem. Deste modo, é possível direcionar a diferenciação e maturação em dois tipos de linhagens diferentes. A linhagem mieloide origina os eritrócitos, as plaquetas, os monócitos e os três tipos de leucócitos granulares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. E a linhagem linfóide vai originar outros tipos de leucócitos, como células B, células T e as células NK. (Hoffbrand e Moss, 2016)

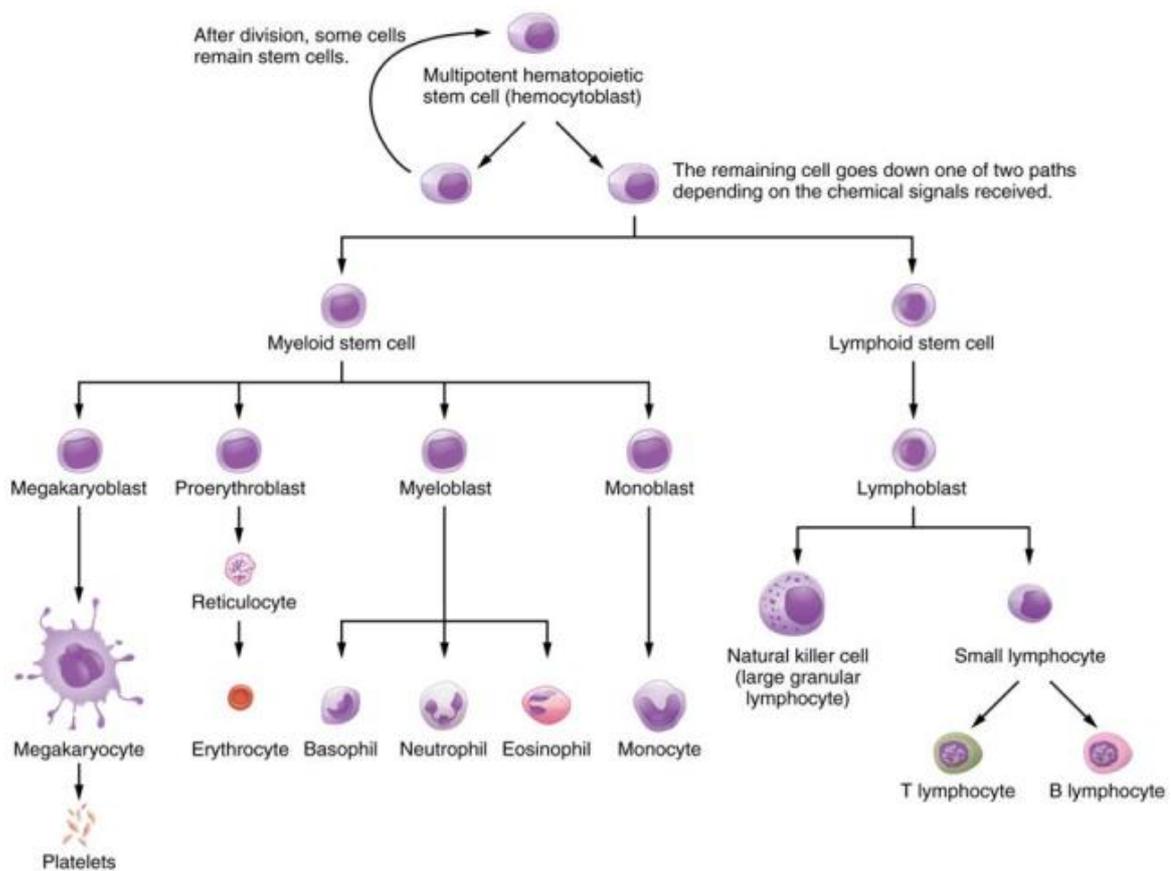


Figura 1: Processo de hematopoiese na medula óssea.

Adaptado de Anatomy & Physiology, Betts, J. G., College, T. J., Desaix, P., Johnson, J. E., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2013)

A. Amostra

Para a realização das atividades no setor de hematologia é necessário recolher o sangue venoso através uma punção na veia antecubital. (Bain *et al.*, 2017) De acordo com o tipo de análise requisitada será necessário colher tubos contendo anticoagulantes diferentes.

As amostras de sangue periférico destinadas à realização do hemograma são colhidas para tubos contendo o anticoagulante EDTA tripotássico (EDTA-K3). Este anticoagulante é um quelante de íons divalente, como o Ca^{2+} , que é um íon promotor da cascata de coagulação. Quando quelado pelo anticoagulante há inibição da formação de coágulo e, assim obtém-se o sangue total. Simultaneamente, o EDTA é um anticoagulante que preserva a morfologia dos glóbulos vermelhos e leucócitos e facilita a contagem de plaquetas quando observado o esfregaço do sangue periférico ao microscópio. (Bain *et al.*, 2017)

Para a realização de provas de coagulação é recomendado fazer a recolha do sangue para um tubo com o citrato de sódio de modo a obter o plasma, após a centrifugação. Este anticoagulante também inibe a cascata de coagulação através da quelação com o Ca^{2+} e o seu efeito é revertido pela adição de cálcio ao plasma. (Bain *et al.*, 2017)

B. Hemograma

Embora o hemograma seja uma análise que fornece um vasto número de informações, geralmente essas informações são inespecíficas. No entanto, o hemograma é um recurso importante na avaliação de diversas situações clínicas, como o diagnóstico, monitorização da evolução de anemias, doenças hematológicas, detecção de quadros infecciosos e monitorização da terapêutica institucionalizada, desde que sejam conhecidas as funções celulares e os mecanismos fisiológicos alterados. (Direção-Geral de Saúde, 2011)

No LACUC, o hemograma constitui a análise hematológica laboratorial mais requisitada. O hemograma é realizado com recurso a um equipamento hematológico automático designado *DxH50* (Beckman Coulter), que analisa os três principais tipos de células. (Beckman Coulter, 2022)

Este aparelho quantifica os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas através do Princípio de *Coulter* (impedância). (Beckman Coulter, 2022) A quantificação celular assenta no princípio de que as células, previamente suspensas numa solução condutora, atravessam em linha uma abertura com dois eléctrodos produtores de corrente eléctrica. À medida que cada célula atravessa a abertura provoca um aumento da resistência eléctrica que é traduzido num impulso eléctrico mensurável. Tendo em conta que, cada célula que atravesse o orifício provoca um impulso eléctrico, o número total de impulsos eléctricos produzidos corresponde ao número de células quantificadas, enquanto a altura do impulso correlaciona-se com o volume celular. O *DxH500* também quantifica a hemoglobina por unidade de volume de sangue recorrendo a um método espectrofotométrico. Após lisar os eritrócitos, a hemoglobina é convertida a oxi-hemoglobina estável ou carboxiemoglobina (se presente), que é medido a 545 nm com recurso a um LED. Adicionalmente, o analisador também caracteriza os diferentes tipos de leucócitos pela tecnologia de perda de luz axial, que permite distinguir os cinco tipos de leucócitos. Quando os leucócitos atravessam a abertura, interrompem o feixe de luz e, simultaneamente, haverá um sensor que deteta a luz dispersa durante a sua passagem pelo canal. Deste modo, a cada alteração detetada pelo sensor corresponde a um tamanho e complexidade que é característico de um determinado tipo de leucócito. (Beckman Coulter, 2022; Brutis e Bruns, 2015)

Além dos valores referidos acima, o diagnóstico preciso e o tratamento eficaz dependem da valorização dos índices quantitativos, assim como dos aspetos morfológicos que são observados no esfregaço e o conhecimento fisiopatológico das alterações hematopoiéticas.

B.1 Eritrócitos

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais abundantes na corrente sanguínea, no entanto, a sua quantidade varia consoante o género. Cada indivíduo produz diariamente cerca de 10^{12} eritrócitos, sendo o processo de eritropoiese estritamente regulado pela libertação da hormona eritropoietina pelo rim. A principal função dos eritrócitos é transportar o oxigénio inalado pelos pulmões para os tecidos do organismo e, complementarmente, recolher o dióxido de carbono produzido a nível dos tecidos e conduzi-lo para os pulmões para ser exalado. (Hoffbrand e Moss, 2016) Estas células não têm núcleo e possuem a forma de disco bicôncavo. Além desta forma particular aumentar a razão área-volume, aumentando a área disponível para as tocas gasosas, também torna a célula mais flexível permitindo alterar a sua conformação aquando da sua passagem pelos vasos de menor calibre. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Os reticulócitos são células jovens precursoras dos eritrócitos maduros. Estas células resultam da perda do núcleo e da maioria dos organelos pelo normoblasto tardio, permanecendo, no entanto, o RNA ribossómico que ainda é capaz de sintetizar hemoglobina. Esta célula é enviada para a corrente sanguínea e, após cerca de dois dias torna-se madura, uma vez que perde completamente o RNA. (Hoffbrand e Moss, 2016)

O principal componente dos eritrócitos é a hemoglobina, sendo produzida em menor quantidade no eritroblasto e cerca de 35% pelos reticulócitos. A hemoglobina é constituída por quatro cadeias proteicas, designadas por globinas, e cada globina está ligada a um grupo heme, que contém um átomo de ferro responsável pela pigmentação vermelha. Existem várias formas de hemoglobina que diferem na composição em aminoácidos e, conseqüentemente, possuem diferentes graus de afinidade de ligação ao oxigénio. A hemoglobina fetal (Hb F) e a hemoglobina A2 (Hb A2) encontram-se em maior quantidade durante o desenvolvimento uterino. Aos 3-6 meses após o nascimento, e a partir daí, predomina no sangue a hemoglobina A, que contém duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$). No adulto mantém-se outros tipos de hemoglobina, que não possuem a cadeia beta, a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) e Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$), embora em menor quantidade. (Hoffbrand e Moss, 2016) Após cerca de 120 dias (4 meses) em circulação, os eritrócitos tornam-se frágeis, e podem romper durante a passagem pelos capilares, pelo que são removidos pelos macrófagos presentes no fígado, baço e medula óssea. No interior dos macrófagos ocorre a degradação da hemoglobina e libertam-se os elementos que a constituem. As cadeias das globinas são degradadas em aminoácidos que são reciclados para a síntese de novas proteínas e o ferro poderá ser armazenado no fígado e baço sob a forma de ferritina para posteriormente ser usado na eritropoiese. A parte não férrica do grupo heme é

convertida a biliverdina e, após algumas reações, transforma-se em bilirrubina conjugada que é facilmente eliminada na bÍlis e na urina. (Betts *et al.*, 2017)

B.2 Leucóciitos

Ao contrário dos eritróciitos, os leucóciitos são células com maiores dimensões que possuem núcleo e organelos. (Betts *et al.*, 2017) Existem diferentes tipos de leucóciitos, cuja função primordial é defender o organismo, quer seja através da destruição e eliminação dos microrganismos invasores, remoção de células com mutações no DNA, ou recolha do debris celulares e células envelhecidas. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) De modo a exercerem a sua função, estas células têm a capacidade de abandonar da corrente sanguínea e deslocarem-se para os tecidos (diapedese). (Betts *et al.*, 2017) Os leucóciitos podem ser classificados em dois grupos principais, de acordo com a presença ou ausência de grânulos no citoplasma: os granulócitos e os agranulócitos. Os granulócitos incluem os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos e são células provenientes da linhagem mielóide, que contêm grânulos abundantes no citoplasma e um núcleo lobulado. Os agranulócitos são células com núcleo não lobulado, com grânulos finos e pequenos no citoplasma. Os agranulócitos incluem os linfócitos e os monócitos, provenientes da linhagem linfoide e mieloide, respetivamente. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Os neutrófilos estão presentes em maior quantidade no sangue periférico, cerca de 50-70% de todos os leucóciitos, com 10-12 µm de diâmetro, cujo citoplasma possui numerosos grânulos finos e neutros, que quando corados adquirem cor clara rosa-avermelhada ou lilás. O núcleo, inicialmente em banda, torna-se lobulado, com 2-5 lóbulos unidos entre si por filamentos finos. (Betts *et al.*, 2017) Após permanecer cerca de 12 horas na corrente sanguínea, migram para os tecidos para combater uma possível infeção onde sobrevivem durante 1 a 2 dias. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) Estas células respondem rapidamente ao local da infeção e fagocitam eficazmente as bactérias em conjunto com a libertação defensinas e lisozimas. (Betts *et al.*, 2017)

Os eosinófilos correspondem a 2-4% do total dos leucóciitos e possuem atividade antihistamina essencial para diminuir atividade inflamatória, mas também libertam moléculas tóxicas contra parasitas e fagocitam eficazmente quando os anticorpos se ligam ao alvo e formam um complexo antígeno-anticorpo. (Betts *et al.*, 2017) Estes elementos celulares possuem 12-17 µm de diâmetro, o seu núcleo possui 2 a 3 lóbulos e o citoplasma contém grânulos grandes que coram com a eosina (corante ácido), tornando-os com cor vermelho-alaranjado. (Bain *et al.*, 2017)

Os basófilos são o tipo de leucócitos mais raros em circulação (<1%) e possui 8-10 µm de diâmetro. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) O núcleo denso, irregular e compacto, é bilobado. O citoplasma contém grânulos de histamina e serotonina com tamanho variável e que coram de azul ou púrpura, sendo que muitas vezes se sobrepõem ao núcleo, podendo até dificultar a sua visualização. No citoplasma pode ainda observar-se vacúolos que se devem à sua desgranulação. (Bain *et al.*, 2017) Estas células desgranulam e libertam mediadores que intensificam a resposta inflamatória, como histamina, mas também libertam heparina que impede a coagulação sanguínea. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Os monócitos medem cerca de 12-20 µm, com citoplasma cinza-azulado, podendo conter vacúolos finos e número variável de grânulos azurófilos. (Hoffbrand e Moss, 2016) O núcleo não segmentado é grande e curvo, em forma de ferradura. A cromatina é mais fina e mais uniformemente distribuída do que nos neutrófilos. (Bain *et al.*, 2017) Após cerca de 3 dias na corrente sanguínea, estas células saem da circulação e deslocam-se para os tecidos, onde se transformam em macrófagos. Nos tecidos, os macrófagos fagocitam detritos, microrganismos estranhos e células mortas, desgastadas ou danificadas. Além disso, os macrófagos libertam defensas antimicrobianas e produtos químicos quimiotáticos. No entanto, alguns macrófagos ocupam locais fixos nos tecidos. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Os linfócitos podem ter dimensões variáveis (6 a 14 µm), com uma relação núcleo-citoplasma menor e, ocasionalmente, possuir alguns grânulos azurófilos. (Betts *et al.*, 2017) Por vezes, o citoplasma é quase impercetível, observando-se apenas um fino anel em redor do núcleo. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) O núcleo redondo é notavelmente uniforme em tamanho (cerca de 9 µm de diâmetro) e possui a cromatina homogénea com alguma aglomeração na periferia nuclear. (Bain *et al.*, 2017)

B.3 Plaquetas

Os megacariócitos são células de grandes dimensões, com cerca de 50 a 100 µm de diâmetro, que possuem um único núcleo lobulado. Após fragmentação na medula óssea, esta célula liberta para a corrente sanguínea cerca de 1.000 a 5.000 fragmentos do seu citoplasma, designados de plaquetas. (Hoffbrand e Moss, 2016) Os megacariócitos remanescentes, que são pouco mais que um núcleo celular, são removidos pelos macrófagos. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) As plaquetas são pequenos fragmentos resultantes da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, com cerca de 2–4 µm de diâmetro, em forma de disco, que possuem contorno irregular com finos grânulos vermelhos. (Betts *et al.*, 2017)

Depois de entrar na circulação sanguínea, uma parte das plaquetas migra para o baço, para aí ser armazenada. Em caso de rutura de um vaso sanguíneo, essas plaquetas são libertadas

novamente para o sangue ou após cerca de 10 dias, são fagocitadas por macrófagos. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

As plaquetas intervêm na manutenção da homeostasia aquando de um dano num vaso, mas também na reparação do tecido lesionado. (Betts *et al.*, 2017) Para a realização das suas funções, é crucial que as plaquetas possuam proteínas e glicoproteínas na sua membrana celular, responsáveis pela agregação entre si e adesão ao tecido lesado, A presença de grânulos citoplasmáticos com diferentes proteínas desempenham um papel na formação do coágulo e o citoesqueleto, como miosina e actina. (Hoffbrand e Moss, 2016)

C. Esfregaço do sangue periférico

Com o desenvolvimento de analisadores automatizados para quantificar e caracterizar as células presentes no sangue, a realização de esfregaços do sangue periférico (ESP) tem vindo a diminuir na prática laboratorial. No entanto, a sua avaliação não deixa de ser uma peça fundamental para completar o estudo hematológico, pois permite confirmar os dados fornecidos pelo aparelho e obter dados adicionais para auxiliar o diagnóstico ou monitorização de patologias. Assim, o ESP efetua-se caso seja requisitado pelo médico ou quando surgem alterações inesperadas relativas às contagens e/ou parâmetros hematológicos notificados pelo analisador automático.

A observação do sangue periférico ao microscópio permite quantificar o número de células, avaliar a morfologia celular, verificar a presença de células imaturas e, ainda, detetar a presença de microrganismos, como por exemplo *Plasmodium spp.* No LACUC, o esfregaço do sangue periférico é realizado manualmente a partir de uma amostra de sangue total anticoagulado com EDTA. Seguidamente os esfregaços são fixados e, tendo em conta o objetivo do mesmo, pode realizar-se duas colorações: a coloração de May-Grunwald-Giemsa e a coloração azul de cresil supra vital que servem para visualizar as células do sangue periférico e os reticulócitos, respetivamente. (Bain, 2015)

Relativamente à coloração de May-Grunwald-Giemsa possui dois corantes, o azul de metileno que é um corante básico que cora de azul-púrpura os componentes ácidos das células, como o RNA e os grânulos basófilos, enquanto, a eosina, um corante ácido, cora de vermelho-alaranjado os componentes celulares básicos, como a hemoglobina e os grânulos eosinófilos. A observação do ESP avalia os três tipos elementos celulares. Na linhagem vermelha é importante observar a presença de alterações morfológicas, como a cor, tamanho, agrupamento, inclusões e maturação. Relativamente à série branca, tem-se em conta a

contagem diferencial e maturidade das células. Na linhagem plaquetária, deve-se ter em conta o tamanho, presença de agregados e suas alterações se presentes. (Bain *et al.*, 2017)

Por outro lado, a coloração de azul de cresil supra vital serve fundamentalmente para visualizar os reticulócitos no esfregaço do sangue periférico. O corante azul de metileno novo é um corante básico com afinidade para os ribossomas remanescentes, precipitando grânulos ou filamentos de RNA corados de um azul intenso, enquanto o citoplasma da célula cora de cinzento. Através desta coloração, é possível verificar o estágio de maturação dos reticulócitos, uma vez que quanto maior a maturidade celular, menor será a presença dos precipitados azuis. (Bain *et al.*, 2017) O número dos reticulócitos presentes no sangue periférico é um reflexo da capacidade eritropoética da medula óssea. Por esse motivo, a contagem de reticulócitos ao microscópico é importante para distinguir situações de anemia aplásica ou anemias regenerativas. Se o número de reticulócitos estiver baixo, significa que a medula não está a conseguir realizar a eritropoiese eficazmente, podendo tratar-se de uma anemia aplásica. Pelo contrário, se os valores de reticulócitos estiverem dentro dos valores normais, significa que a medula consegue realizar a eritropoiese, podendo ser uma anemia regenerativa. (Hoffbrand e Moss, 2016)

D. Alterações das linhagens celulares

D. I Alterações dos eritrócitos

As alterações do tamanho, da forma, ou do número de eritrócitos e da quantidade de hemoglobina presente nos mesmos são importantes para inferir o estado de saúde de um indivíduo. (Betts *et al.*, 2017)

A perda de sangue, a eritropoiese deficiente e destruição excessiva de eritrócitos são fatores que podem provocar anemia. (Rodak e Carr, 2017) A anemia caracteriza-se pela diminuição da concentração de hemoglobina no sangue. Para além de haver uma diminuição dos níveis de hemoglobina, também pode haver uma diminuição do número de eritrócitos e, conseqüentemente, uma diminuição do hematócrito. (Hoffbrand e Moss, 2016) Existem vários tipos de anemias (esquematizado na Tabela 3) cuja classificação é baseada nos valores dos índices hematológicos, que estão indicados na Tabela 4.

Tabela 3: Classificação do tipo de anemias com base nos índices eritrocitários e os principais tipos de anemias.

Tipo de Anemia	Índices hematológicos	Tipos de anemias
Microcítica Hipocrômica	VCM < 80 fl HCM < 27 pg	Anemias sideroblásticas Anemias ferropénicas Talassemias
Normocítica Normocrômica	80 < VCM < 96 fl 27 < HCM < 33 pg	Anemias hemolíticas Doenças renais Anemia das doenças crónicas Perda de sangue aguda
Macrocíticas	VCM > 96 fl	Anemia megaloblástica: deficiência por vitamina B12 e ácido fólico Anemia não-megaloblástica: álcool, doença hepática, anemia aplástica

Adaptado de: Hoffbrand, A. V. e Moss, P. A. H. - Essencial haematology (2011).

De acordo com valores de volume corpuscular médio (VCM), as anemias podem ser classificadas em anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas, ou anemias hipocrômicas e normocrômicas dependendo dos valores de concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos (CMCM). Além destes dois índices hematológicos, o valor de distribuição do volume de eritrócitos (RDW) traduz o grau de variação dos tamanhos dos eritrócitos (anisocitose) (Bain *et al.*, 2017). Contudo, a determinação de outros parâmetros analíticos é fundamental para completar as informações que são transmitidas pelo hemograma e pelo esfregaço do sangue periférico e, assim, determinar a possível causa de anemia.

De modo a completar as informações obtidas pelo hemograma e ESP e confirmar a origem da anemia, o clínico também pode pedir a avaliação do ferro, ferritina, vitamina B-12, ácido fólico e testes de avaliação renal, e ainda a contagem de reticulócitos presentes no sangue periférico.

Nem todas as alterações morfológicas dos eritrócitos decorrem de situações que afetam a produção de hemoglobina, por exemplo, há alterações genéticas que afetam a síntese de proteínas da membrana ou das cadeias globínicas, e que podem resultar na alteração dos índices hematológicos. (Bain *et al.*, 2017)

A observação do esfregaço do sangue periférico permite identificar eritrócitos com diferentes formas, tamanhos, e a cor dos eritrócitos. Mas também permite detetar a presença de agrupamentos celulares e inclusões citoplasmáticas presentes nos eritrócitos, que podem ser sugestivos de determinadas patologias. (Rodak e Carr, 2017)

Um aumento do número de eritrócitos, designado por policitemia ou eritrocitose, também pode ocorrer, e é acompanhado pela elevação do hematócrito. A policitemia pode

dever-se a uma situação não fisiopatológica, quando se trata de uma desidratação que diminui o volume plasmático, por exemplo. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) No entanto, também pode dever-se a situação fisiopatológica, designadamente a policitemia vera, que é um tipo de doença associada à medula óssea caracterizada pela produção excessiva de eritrócitos imaturos. (Prchal, 2001) A policitemia pode ser uma situação clínica grave, pois como aumenta a viscosidade do sangue conduz a uma redução do fluxo sanguíneo e ao desenvolvimento de hipertensão. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Tabela 4: Parâmetros eritrocitários determinados pelo analisador automático DxH500.

Parâmetro hematológico	Significado
Contagem dos eritrócitos ou Red blood Cell (RBC)	Corresponde ao número total de eritrócitos por microlitro de sangue.
Hemoglobina (Hb)	Concentração total de hemoglobina presente na amostra de sangue, expressa em g/dL.
Hematócrito (HCT)*	Representa a porção de eritrócitos presente no volume total de sangue, expresso em percentagem (%)
Volume Corpuscular (VCM)	Representa o volume médio dos eritrócitos, expresso em fentolitros (fL).
Hemoglobina Corpuscular (HCM) *	Corresponde à quantidade média de hemoglobina presente em cada eritrócito, expresso em picogramas (pg)
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) *	Concentração hemoglobina presente em cada eritrócito, o valor é apresentado em g/dL.
Distribuição do Volume de Eritrócitos (RDW) *	Avalia o índice de anisocitose, ou seja, a variação do tamanho dos eritrócitos, expresso em percentagem (%).

*Parâmetros calculados pelo analisador a partir da contagem dos eritrócitos.

D.2 Alterações dos leucócitos

Alterações relativas ao número e alterações morfológicas da série branca são importantes para fazer o diagnóstico e prognóstico de algumas patologias.

Se o número de leucócitos for superior aos valores de referência para o sexo e idade denomina-se por leucocitose. Se houver uma diminuição da sua contagem designa-se por leucopenia. No entanto, em ambas as situações deve-se ter em consideração a contagem diferencial de cada tipo de células, uma vez que as alterações presentes podem decorrer de uma resposta imune ou situações fisiopatológicas (Tabela 6). (Bain, 2015) De modo a completar a informação clínica do hemograma, a observação de possíveis alterações morfológicas no esfregaço no sangue periférico pode ser indicativa de alguma situação clínica. (Bain, 2015)

Os neutrófilos podem conter granulações tóxicas, com aumento da quantidade de grânulos e coloração mais densa, que pode ser indicativo de infeção bacteriana ou até de

anemias aplásicas. A presença de neutrófilos hipogranulares e agranulares pode ocorrer em síndromes mielodisplásicas e alguma formas de leucemia mieloide. A nível nuclear poderá haver alterações na segmentação, com hiposegmentação ou hipersegmentação, que poderão ser sugestivas de doenças congénitas e/ou doenças crónicas. (Rodak e Carr, 2017)

Os basófilos e eosinófilos também poderão apresentar alterações dos seus grânulos, nomeadamente hipogranulares como acontece em algumas síndromes mielodisplásicas, respetivamente. (Bain, 2015)

Relativamente aos linfócitos, em algumas infeções virais, como mononucleose infecciosa, podem-se observar linfócitos reativos, também designados por linfócitos atípicos ou linfócitos transformados. (Rodak e Carr, 2017) Normalmente apresentam um tamanho superior e o citoplasma abundante, muitas vezes vacuolizado, com aparência “recortada” na periferia que pode ter uma cor mais intensa. O núcleo destas células tem, normalmente, uma cromatina mais fina. (Simon, 2003)

Tabela 5: Alterações quantitativas relativas aos leucócitos e as principais situações clínicas associadas.

Tipo de célula leucocitária	Alteração quantitativa	Situações clínicas
<i>Neutrófilo</i>	Aumento	Algumas doenças mieloproliferativas e algumas leucemias, infeções, queimaduras, traumas, cirurgias e doenças inflamatórias, como febre reumática.
	Diminuição	Administração de fármacos, doenças autoimunes, como lúpus sistémico eritematoso e infeções virais, como HIV.
<i>Basófilo</i>	Aumento	Doenças mieloproliferativas como, policitémia vera e leucemia mieloide, alergias infeções parasitárias e hipotiroidismo.
<i>Eosinófilo</i>	Aumento	Condições alergias, infeções parasitárias, leucemias eosinofílicas e algumas doenças autoimunes como, síndrome hipereosinofílica idiopática.
	Diminuição	Administração prologada de esteroides e stress.
<i>Linfócito</i>	Aumento	Infeções virais e alguns tipos de cancro.
	Diminuição	Doenças crónicas, imunossupressão como infeção por HIV e terapia com esteroides.
<i>Monócito</i>	Aumento	Algumas infeções crónicas bacterianas, como tuberculose, doenças inflamatórias crónicas como, doença de Crohn e artrite reumatoide, algumas formas de leucemia e infeções por protozoários.
	Diminuição	Supressão da medula óssea.

D. 3 Alterações das plaquetas

De acordo com a contagem das plaquetas fornecidas pelo *DXH500* pode-se distinguir duas situações: a trombocitopenia e a trombocitose. (Betts *et al.*, 2017)

Na presença de uma trombocitopenia deve-se fazer o esfregaço do sangue periférico, de modo a distinguir uma falsa trombocitopenia (pseudotrombocitopenia) de uma verdadeira trombocitopenia.

A falsa trombocitopenia pode-se verificar na presença de coágulos sanguíneos na amostra, formação de agregados plaquetares ou satelitismo plaquetário (as plaquetas aderem à superfície dos neutrófilos) que são visíveis no esfregaço do sangue periférico ao microscópio. (Bain *et al.*, 2017) Tecnicamente, quando passa um agregado de plaquetas pela abertura do analisador hematológico, apenas há emissão de um pulso elétrico, assim o analisador apenas quantifica como uma única plaqueta, no entanto, estes agregados não refletem alterações na coagulação ou função plaquetar. (Bain *et al.*, 2017) Embora o EDTA não promova a aglutinação, em algumas amostras colhidas com este anticoagulante poderá ocorrer agregação das plaquetas, no entanto, quando se observa o ESP verifica-se uma contagem normal das plaquetas. Para resolver esta situação, pode ser solicitada uma nova colheita em citrato de sódio e rapidamente analisada. (Bain *et al.*, 2017) Pode ainda ocorrer, embora raramente, o satelitismo plaquetar que resulta da ativação das plaquetas por anticorpos, que promove a aderência a neutrófilos. (Bain, 2015; Dusse, Vieira e Carvalho, 2004)

No entanto, uma verdadeira trombocitopenia pode ocorrer em virtude de diversas circunstâncias: a diminuição da produção de plaquetas; o aumento da sua destruição devido à produção de autoanticorpos, como na púrpura trombocitopénica imune; infeções, como a provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH); quimioterapia; excesso de ingestão de álcool e ingestão de fármacos, como diuréticos. (Bain, 2015)

A trombocitose pode ocorrer em consequência de alterações hereditárias, como no gene trombopoietina (TPHO), em consequência de deficiência de ferro, elevada perda de sangue resultante de traumas e cirurgias, esplenectomia e hipoesplenismo, administração de trombopoietina, infeções e inflamações e em consequência de algumas fisiopatologias, como alguns casos de neoplasias mieloproliferativas. (Bain, 2015)

Existem outros parâmetros que refletem a morfologia das plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM) e a distribuição da largura média (PDW) que também são informações calculadas pelo analisador que refletem o tamanho e o grau de anisocitose plaquetar, respetivamente. Embora sejam valores de referência que variam consoante o analisador, estes parâmetros podem ser orientadores da causa da alteração plaquetar. (Bain, 2015)

E. Velocidade de sedimentação dos eritrócitos

A velocidade de sedimentação dos eritrócitos (VS) corresponde à taxa de sedimentação dos eritrócitos presentes numa amostra de sangue durante 1 hora. (Aytekin, 2018) A VS, frequentemente requisitada por médicos, é uma forma fácil e acessível de proceder ao diagnóstico e monitorização do estado inflamatório agudo ou crónico. (Kim *et al.*, 2018)

O processo de sedimentação dos eritrócitos compreende três fases. Na primeira fase, os eritrócitos dispersos no plasma começam a formar agregados, sendo a sua formação proporcional à quantidade de proteínas plasmáticas e à diminuição do hematócrito. Numa segunda fase, os agregados começam a sedimentar, sendo a velocidade de sedimentação influenciada pelo tamanho do agregado. A terceira fase é essencialmente caracterizada pela compactação, uma vez que a velocidade de sedimentação vai diminuindo e os agregados estão na sua maioria depositados no fundo. (Higuchi e Watanabe, 2022)

A VS dos eritrócitos é uma determinação analítica influenciada por vários fatores, e poderá estar alterada em situações não patológicas, como idade, género, ciclo menstrual ou terapêutica medicamentosa ou em situações patológicas, como anemia, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico, neoplasias malignas e infeções. (Olshaker e Jerrard, 1997) Embora seja um ensaio inespecífico, a VS pode ser clinicamente relevante para situações clínicas associadas ao aumento de proteínas de fase aguda. No entanto, o facto de a VS se apresentar normal não significa que se possa descartar a hipótese de doença ou infeção. (Bain *et al.*, 2017; Santos, Cunha e Cunha, 2000)

O aumento de proteínas plasmáticas de fase aguda, como a proteína C reativa, o fibrinogénio, a haptoglobina, a α 1-glicoproteína ácida e a ceruloplasmina ou a diminuição da albumina, a diminuição do hematócrito e ainda a morfologia das hemácias são fatores que alteram a VS, aumentando-a. (Higuchi e Watanabe, 2022) Em situações de resposta de fase aguda, aquando da inflamação, verifica-se um aumento dos leucócitos, mas também destas proteínas. Em elevada quantidade, as proteínas interagem com os eritrócitos, facilitando a formação de agregados e agrupamentos em “*rouleaux*”, levando a que rapidamente se depositem relativamente aos eritrócitos individuais devido às forças de gravidade. (Kumar, Abbas e Aster, 2013)

A VS pode estar diminuída em situações de policitemia, hipofibrinogenemia, insuficiência cardíaca congestiva e em situações de alterações morfológicas dos eritrócitos, como poiquilocitose, esferocitose ou presença de células falciformes. (Bain *et al.*, 2017)

No LACUC, a determinação da VS é realizada através de uma técnica manual, em que o sangue total é introduzido num tubo colocado na vertical como representado na Figura 2. Ao longo do tempo, os eritrócitos depositam-se no fundo do tubo gradualmente e, após 1 hora, é verificado o volume de hemácias depositado. Posteriormente, o resultado da VS é expresso em ml por hora.

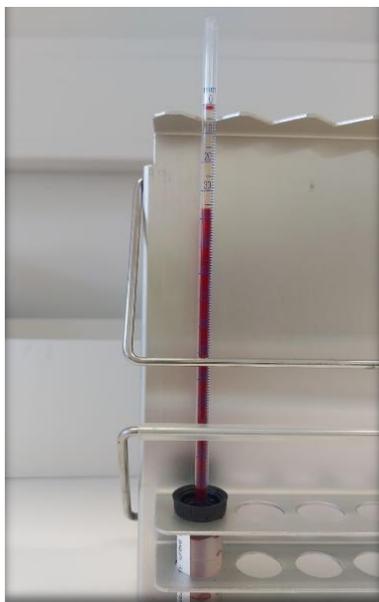


Figura 2: Técnica manual para determinar a velocidade de sedimentação. Neste exemplo, o valor obtido foi de 36 mm/h, que está acima do valor de referência (fotografado no LACUC).

F. Grupos sanguíneos

As primeiras transfusões de sangue em humanos eram procedimentos arriscados até à descoberta dos principais grupos sanguíneos. Até então, ocorriam reações transfusionais, como coagulação ou até mesmo a morte do recetor, quando o tipo de sangue transfundido no paciente era incompatível com o seu próprio sangue. Em 1900, Karl Landsteiner descobriu que era possível combinar os tipos sanguíneos de doadores e recetores e prevenir reações transfusionais e mortes. (Bain *et al.*, 2017)

Os eritrócitos possuem diferentes proteínas e hidratos de carbono na superfície da membrana, designados por antigénios. Desta forma, a determinação do grupo sanguíneo de um indivíduo consiste na pesquisa e identificação desses antigénios. Note-se que, o grupo sanguíneo é determinado geneticamente. Embora seja possível classificar os grupos sanguíneos de acordo com vários sistemas, o sistema AB0 e Rh são os mais importantes clinicamente. (Pourazar, 2007)

F.1 Sistema AB0

A determinação do sistema AB0 destina-se à pesquisa da presença dos antigénios glicoproteicos A (N-acetilgalactosamina) e B (D-galactose) na superfície da membrana dos

eritrócitos. Neste sentido, os indivíduos que possuem o antígeno A na membrana dos eritrócitos pertencem ao grupo A, enquanto os indivíduos que possuem o antígeno B pertencem ao grupo B. Os indivíduos que possuem os dois antígenos são do grupo AB e caso não possuam nenhum dos antígenos, pertencem ao grupo 0. (Betts *et al.*, 2017)

Normalmente, os anticorpos desenvolvem-se contra um dado antígeno se houver exposição prévia a esse antígeno. No entanto, no sistema AB0, sem haver exposição prévia, os indivíduos do grupo A possuem anticorpos anti-B no plasma e os indivíduos do grupo B possuem anticorpos anti-A. Por outro lado, indivíduos AB não possuem anticorpos contra esses antígenos e os indivíduos 0 têm ambos os anticorpos. (Betts *et al.*, 2013) Uma possível justificação para tal será o facto que antígenos A e B, presentes em alimentos e bactérias do trato gastrointestinal, embora diferentes daqueles que estão nas hemácias, estimulam a produção de anticorpos anti-A e anti-B. Esta hipótese é corroborada pelo facto de aos 2 meses de vida de um indivíduo ainda não haver estes anticorpos no plasma. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

F.2 Sistema Rh

Relativamente ao sistema Rh, este engloba cerca de 50 antígenos que são expressos na membrana dos eritrócitos, porém os antígenos D, C, c, E e e são os mais frequentemente identificados. O antígeno D é mais frequentemente associado a patologias devido à sua alta imunogenicidade. Assim sendo, um indivíduo é Rh positivo se possuir o antígeno D na superfície membranar dos eritrócitos ou Rh negativo se o antígeno D estiver ausente. (Pourazar, 2007)

Ao contrário do sistema AB0, os anticorpos contra o antígeno D raramente ocorrem naturalmente, ou seja, apenas se desenvolvem se houver contacto sanguíneo de um indivíduo Rh negativo com sangue Rh positivo (sensibilização). (Betts *et al.*, 2017) A produção de anticorpos contra o antígeno D tem especial importância, por exemplo, quando uma grávida gera um feto Rh positivo. Nesta gravidez, a mãe desenvolve anticorpos contra os antígenos D do feto. Numa próxima gravidez, se gerar um feto Rh positivo, os anticorpos produzidos na gravidez anterior podem reconhecer o antígeno D, tendo como consequência a doença hemolítica do recém-nascido. (Avent e Reid, 2000)

Normalmente, o sistema AB0 e Rh são determinados em conjunto laboratorialmente. Para ambos os sistemas sanguíneos são efetuados ensaios imunohematológicos, que assentam no princípio da deteção do complexo antígeno-anticorpo. Assim, se houver reconhecimento

e aglutinação do anticorpo com o antígeno observa-se a aglutinação dos eritrócitos. Em virtude deste princípio, a presença de aglutinação revela um teste positivo.

No LACUC, o sistema AB0 e Rh são determinados pela da prova globular, ou seja, pesquisa de antígenos no sangue total. No entanto, pode-se proceder à realização da prova sérica para a pesquisa os anticorpos no plasma ou soro, para confirmar o resultado inferido previamente pela prova globular.

Na realização do teste para determinação do grupo Rh deve-se ter em atenção ao resultado principalmente quando não se verifica a formação de agregados eritrocitários. Pois, o facto de não se observar agregados não significa que o indivíduo seja Rh negativo, uma vez que pode haver uma fraca expressão do antígeno D e a aglutinação formada não ser tão evidente. (Jala *et al.*, 2021) Assim, para confirmar o fator Rh faz-se o teste do D fraco ou DO Du, que tal como nos ensaios anteriores, se baseia na deteção do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, o teste é positivo se houver aglutinação dos eritrócitos.

Tabela 6: Presença dos diferentes antígenos à superfície dos eritrócitos de acordo com os diferentes grupos sanguíneos, os sistemas AB0 e Rh.

		A ⁺	A ⁻	B ⁺	B ⁻	AB ⁺	AB ⁻	O ⁺	O ⁻
Sistema AB0	Antígeno A	+	+	-	-	+	+	-	-
	Antígeno B	-	-	+	+	+	+	-	-
	Anticorpo Anti-A	-	-	+	+	-	-	+	+
	Anticorpo Anti-B	+	+	-	-	-	-	+	+
Sistema Rh	Antígeno D	+	-	+	-	+	-	+	-

Caso Clínico I

No dia 22 de fevereiro, um indivíduo do sexo masculino dador de sangue, dirige-se ao LACUC para a determinação do grupo sanguíneo. O indivíduo tinha a informação prévia de que pertencia ao grupo B e Rh positivo.

Procedeu-se à determinação do grupo sanguíneo relativamente ao sistema AB0 e ao sistema Rh, cujos resultado obtidos estão ilustrados nas imagens abaixo.

Reagente Anti-A Reagente Anti-B Reagente Anti-AB



Figura 3: Determinação do sistema AB0 do utente. Determinação do sistema AB0 do utente. Da esquerda para a direita, tem-se a lâmina 1, na qual foi adicionado o reagente anti-A; na lâmina 2 foi adicionado o reagente anti-B e na lâmina 3 adicionou-se o reagente anti-AB. A presença de aglutinação (fotografado no LACUC).

Reagente C Anti-D Reagente T Anti-D

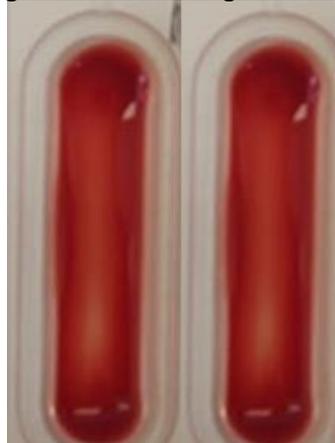


Figura 4: Determinação do sistema Rh do utente. Determinação do sistema Rh do utente. Da esquerda para a direita, tem-se a lâmina 1, em que se adicionou o reagente T (anti-D da casa comercial T), e na lâmina 2 foi adicionado o reagente C (anti-D da casa comercial C). Em ambas as lâminas, não se verificou a presença de aglutinação (fotografado no LACUC).

Relativamente ao sistema AB0 (Figura 3), após a adição do reagente anti-A na lâmina 1 não se observou a presença de aglutinação dos eritrócitos com o anticorpo anti-A, pelo que se pode concluir que os eritrócitos não possuem antígeno A à sua superfície. Na lâmina 2, quando adicionado o reagente anti-B observou-se a aglutinação dos eritrócitos com anticorpo anti-B, podendo-se concluir que o indivíduo possui o antígeno B na sua superfície. Quando adicionado o reagente anti-AB na lâmina 3 ocorre aglutinação, uma vez que os anticorpos anti-B adicionados reconhecem o antígeno B na superfície dos eritrócitos e, por isso, ocorre aglutinação. Tendo em conta, estes dois resultados poder-se-á concluir que o indivíduo pertence ao grupo B.

Relativamente à determinação do sistema Rh (Figura 4), verificou-se ausência de aglutinação em ambas as lâminas, o que numa visão inicial poder-se-á deduzir que os eritrócitos do indivíduo não expressão antígeno D e, por isso, não ocorre aglutinação. No entanto, deve-se descartar a hipótese de haver uma fraca expressão do antígeno D na superfície dos eritrócitos e, por isso, foi realizado o teste do D fraco. Para a realização do D fraco utilizou-se dois reagentes diferentes de anti-D, o reagente T e o reagente C, e os resultados obtidos foram discordantes, como evidenciado na imagem abaixo.

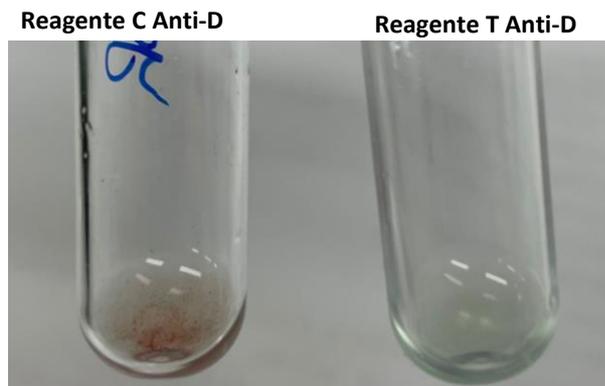


Figura 3: Resultado obtido resultante da realização do teste do D fraco. No tubo 1 (esquerda) utilizou-se o reagente C e observou-se a aglutinação dos anticorpos com o antígeno D na superfície dos eritrócitos. No tubo 2 (direita) utilizou-se o reagente T e não se observou aglutinação. (fotografado no LACUC)

Quando se utilizou o reagente C verificou-se a presença de aglutinação, sugerindo que os eritrócitos possuem antígeno D na sua superfície, contrariamente à utilização do reagente T. Este resultado pode dever-se ao facto de que os reagentes C e T detetam diferentes epitopos, isto é, diferentes regiões do antígeno D.

G. Hemostase

Quando ocorre uma lesão dos vasos sanguíneos há uma perda de sangue, que caso não seja interrompida pode conduzir à perda de elevadas quantidades e, conseqüente diminuição da pressão sanguínea. No entanto, o nosso organismo tem a capacidade de interromper a perda de sangue e manter a hemostase. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) No processo de hemostase intervêm três mecanismos que limitam a perda de sangue: a constrição do músculo liso da parede do vaso; a formação do tampão plaquetário e a formação do coágulo sanguíneo. (Betts *et al.*, 2017)

Em resultado da lesão, há exposição do fator de von Willebrand (VWF), que é uma proteína sintetizada pelas células endoteliais e pelos megacariócitos, que medeia a adesão das plaquetas ao colagénio exposto pelos vasos, e é importante para desencadear a formação do coágulo. Além disso, também as plaquetas se agregam entre si através da ligação dos recetores GPIIb/IIIa ao VWF e ao fibrinogénio. Durante este processo também são libertados conteúdos que estão presentes nos grânulos, como ADP, serotonina, prostaglandinas e tromboxanos que também contribuem para agregação plaquetar. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os processos de adesão e agregação são mecanismos, importantes para a formação do tampão plaquetar, que visam diminuir a perda de sangue e manter a integridade do vaso. (Hoffbrand e Moss, 2016) Estes mecanismos anteriores embora reparadores não são suficientes, sendo necessário a etapa da coagulação, para tornar o processo de reparo mais

duradouro e eficaz. (Betts *et al.*, 2017) O processo de coagulação envolve duas vias diferentes, a via intrínseca e via extrínseca. Em ambas as vias dá-se por proteólise a ativação de compostos (fatores), que, de forma sequencial, convergem posteriormente para uma via comum (Figura 6). A via comum culmina na formação de trombina, que converte o fibrinogénio solúvel em fibrina. A fibrina infiltra-se nos agregados plaquetares anteriormente formados e torna-os mais estáveis, firmes e definitivos, constituindo-se assim o coágulo sanguíneo. (Hoffbrand e Moss, 2016)

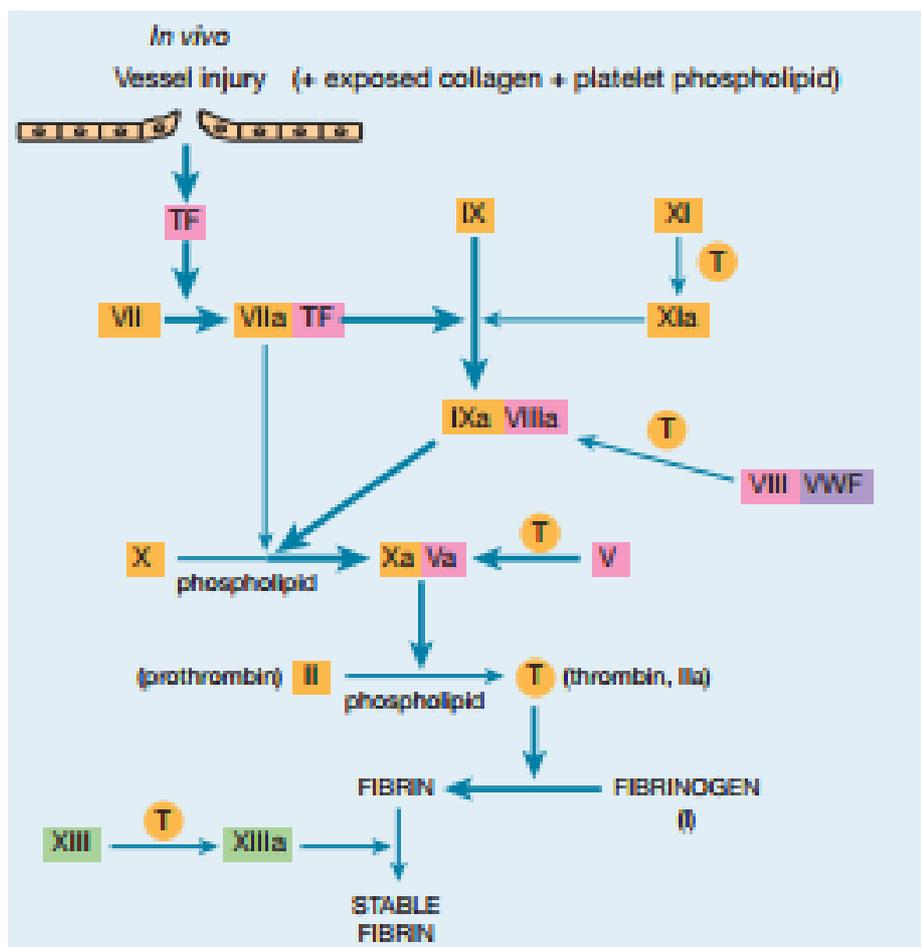


Figura 4: Representação esquemática da cascata de coagulação do sangue.

Quando o plasma entra em contacto com o fator tecidual (TF) forma-se o complexo fator VII-FT. Os fatores X e IX são ativados pelo complexo TF-VII ativado (VIIa). O complexo VIIIa-IXa aumenta a ativação do fator X (Xa). A formação de trombina a partir da protrombina, pela ação do complexo Xa-Va, leva à produção de fibrina. A trombina também ativa os fatores V, XI e XIII. A separação entre o fator VIII e o fator von Willebrand (VWF), pela trombina, resulta num aumento acentuado da formação do complexo VIIIa-IXa e do complexo Xa-Va. A hidrólise do fibrinogénio, pela ação da trombina, resulta na formação de fibrina que origina tampões plaquetários estáveis. Adaptado de: Hoffbrand, A. V. e Moss, P. A. H. - *Essential haematology* (2011).

Caso o processo de coagulação não seja descontinuado poderá levar à oclusão dos vasos sanguíneos (trombose). Por esse motivo, a coagulação é estritamente regulada e não ocorre infinitamente. A existência de mecanismos fisiológicos antitrombóticos, como o fluxo

sanguíneo, os inibidores dos fatores de coagulação e a fibrinólise limitam a coagulação. (Hoffbrand e Moss, 2016) Após restaurar o fluxo sanguíneo normal, o coágulo formado deverá ser destruído através da sua retração e dissolução (fibrinólise). (Bain *et al.*, 2017) A fibrinólise é um processo que envolve a destruição da fibrina em porções mais pequenas pela plasmina. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) A degradação desencadeada pela plasmina deve-se à sua ativação pelo ativador plasminogénio tecidual, pela trombina, pelo fator XII e elementos libertados pelo tecido lesado. (Bain *et al.*, 2017) O processo de fibrinólise também é um processo limitado por vários elementos, nomeadamente, a α 2-antiplasmina. (Hoffbrand e Moss, 2016)

G. I Avaliação laboratorial da hemostase

A produção excessiva ou ineficiente de plaquetas pode resultar em situações clínicas graves, como a formação de coágulos que podem ocluir os vasos sanguíneos (trombose) ou levar a episódios de sangramento excessivo, respetivamente.

Inclusivamente, a hemorragia pode resultar de uma falha do processo de coagulação, para o qual podem contribuir vários fatores, designadamente, a produção reduzida de plaquetas (trombocitopenia), a produção de plaquetas disfuncionais e, ainda, a produção de um ou mais fatores de coagulação disfuncionais. (Betts *et al.*, 2017) Assim, torna-se importante fazer o estudo de possível tendência hemorrágica na presença de um indivíduo com clínica de hemorragia ou que possuidor de história familiar, monitorização de indivíduos anteriormente diagnosticados ou indivíduos submetidos a cirurgias ou diagnosticados com coagulação intravascular disseminada. (Bain *et al.*, 2017)

Os testes de coagulação em laboratório visam mimetizar *in vitro* os processos que ocorrem *in vivo*. Contudo, para a investigação de uma suspeita de distúrbio vascular, para além do estudo da coagulação, deve-se ter em conta a contagem de plaquetas e a observação do tamanho das plaquetas. (Bain *et al.*, 2017)

De forma a avaliar a homeostase, o LACUC realiza a determinação do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA). Estes dois ensaios são determinados no analisador automatizado *Yumizen 400* (Horiba medical) que determina o tempo de coagulação do plasma do utente através da medição da intensidade da luz dispersa à medida que o coágulo de fibrina se vai formando (método de deteção foto-ótica de coágulos).

G.1.1 Tempo de protrombina (PT)

O tempo de protrombina mede o tempo de coagulação após incubar uma concentração ótima de tromboplastina, equivalente ao fator tecidual do vaso, com plasma do utente. Assim, o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina definirá o tempo de protrombina. (Bain *et al.*, 2017) Este teste reflete eficácia global da via extrínseca e comum, como tal, avalia a funcionalidade dos fatores VII, X, V, protrombina e fibrinogénio. A deficiência nestes elementos da cascata de coagulação traduz-se num aumento do tempo necessário para formar o coágulo. (Hoffbrand e Moss, 2016)

O resultado do TP pode ser expresso em segundos, percentagem e através da Razão Internacional Normalizada (INR) (Hoffbrand e Moss, 2016). O INR é um parâmetro usado mundialmente para expressar o TP. A maioria dos laboratórios utiliza-o de forma a padronizar os resultados da TP. O INR é calculado através do quociente entre o TP do utente e um TP padrão normal, elevado ao Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) do reagente tromboplastina usado. (Hobbs *et al.*, 1999)

O aumento do PT pode resultar da inibição ou deficiência de um ou mais dos fatores anteriormente referidos. Mais concretamente, este aumento decorre de várias causas possíveis, nomeadamente, da administração oral de anticoagulantes, como warfarina (antagonista da vitamina K, que é crucial para o desempenho dos fatores II, VII e X), da doença hepática e da deficiência da vitamina K. (Bain *et al.*, 2017)

G.1.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)

O tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) mede o tempo de coagulação do plasma, na ausência de tromboplastina tecidual, após a ativação dos fatores de contato, como caulino, que produz o XIIa, que por sua vez, cliva o XI em XIa. No entanto, a coagulação apenas progride quando se adiciona o cloreto de cálcio (CaCl_2). (Bain *et al.*, 2017)

Este parâmetro é expresso em segundos e avalia a eficácia da via intrínseca, pois avalia a funcionalidade dos fatores V, VIII, IX, X, XI, XII, protrombina e do fibrinogénio. (Hoffbrand e Moss, 2016)

O aumento do APTT resulta da inibição ou deficiência de um ou mais dos fatores de coagulação mencionados, que podem ter na sua origem a doença hepática, a administração com heparina e a warfarina, a hemofilia (deficiência do fator VIII) e a deficiência de vitamina K. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Caso Clínico 2

Um indivíduo do sexo feminino com 29 anos de idade recorreu ao LACUC com a prescrição médica de um hemograma e alguns parâmetros bioquímicos. Na tabela abaixo estão indicados os parâmetros analisados, assim como os valores obtidos.

Tabela 7: Resultados hematológicos e bioquímicos obtidos pelo autoanalisador DxH 500 e Arquitect, respetivamente.

Hemograma	Resultado	Valores de referência no LACUC
Eritrócitos	$4,22 \times 10^{12}/L$	$3,85-5,10 \times 10^{12}/L$
Hemoglobina	9,79 g/dL	12,0 - 15,3 g/dL
Hematócrito	32,5%	36,0 - 46,0%
VCM	77,0 fL	88,0 - 97,0 fL
HCM	23,2 pg	26,0 - 34,0 pg
RDW	18,4%	10,5 - 15,0%
Parâmetros Bioquímico	Resultado	
Ferritina	4,51 ng/mL	4.63 - 240 ng/mL
Ferro	42 µg/dL	50 - 170 µg/dL
Capacidade total de fixação do ferro	Normal	

Tendo em conta os valores obtidos dos índices hematológicos verifica-se que há uma diminuição dos níveis de hemoglobina e do hematócrito, que é acompanhado pelos baixos valores de MCV e MCH. Estes valores hematológicos são sugestivos de uma anemia microcítica hipocrômica. Os parâmetros de ferro e ferritina diminuídos permitem apontar para uma anemia por deficiência de ferro, já que este elemento é importante para a síntese de hemoglobina. Tendo em conta os resultados do hemograma obtidos seria importante

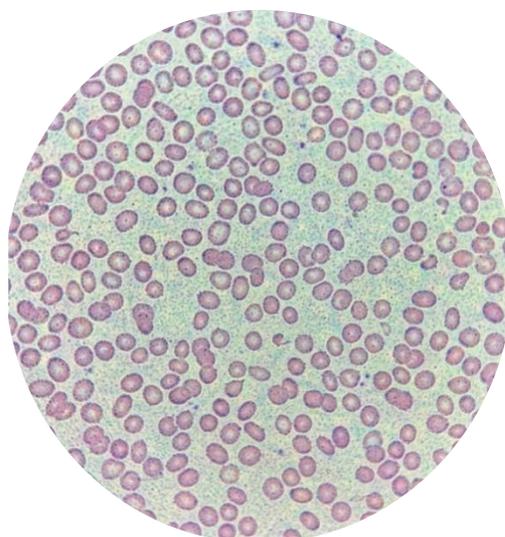


Figura 5. Esfregaço de sangue periférico ao microscópio ótico do utente a 1000X (100X da objetiva e 10X da ocular) (fotografado no LACUC).

visualizar as células ao microscópio ótico. A Figura 7 representa um dos campos visualizados ao microscópio do ESP da amostra em análise.

Na visualização do ESP é possível verificar a existência de:

- Poiquilocitose, como eliptócitos
- Microcitose
- Hipocromia
- Eritrócitos policromatófilos

A observação do esfregaço é concordante com os valores de hemograma obtidos. Assim, tendo em conta estes resultados é possível que se suspeite de uma anemia ferropénica, no entanto, apenas o clínico, mediante a história clínica poderá fazer o diagnóstico.

SETOR DE IMUNOLOGIA

O sistema imune é um sistema complexo e organizado essencial para a sobrevivência humana, uma vez que tem a capacidade de distinguir moléculas que pertencem ao hospedeiro (*self*) daquelas que não lhe pertencem (*não-self*), como microrganismos ou moléculas tóxicas, mas também é capaz de detetar a presença de ameaças internas, como células infetadas ou células tumorais. (Turgeon, 2014)

Embora o nosso organismo possua barreiras físicas que impedem a entrada dos microrganismos, muitas das vezes estas não são suficientes. O sistema imune é constituído por células que atuam na imunidade inata, como monócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, e células com funções na imunidade adaptativa, como os linfócitos B e T, que participam no reconhecimento, captura e eliminação do agente estranho. A formação destas células ocorre na medula óssea, assim como a sua maturação celular, à exceção os linfócitos T que completam o processo de maturação no timo.

Após a entrada de um microrganismo no hospedeiro, desenvolve-se, inicialmente, uma resposta imune inata que envolve mecanismos não-específicos. (Turgeon, 2014) O sucesso desta resposta depende da ação de diferentes células, que atuam de forma coordenada de modo a reconhecer e remover o antigénio. Se eventualmente a resposta imune inata não for suficiente, inicia-se uma resposta imune específica contra o antigénio, a resposta imune adaptativa, na qual intervém essencialmente os linfócitos. (Owen *et al.*, 2019)

Os linfócitos são os principais intervenientes na imunidade adaptativa e caracterizam-se pela especificidade de resposta, memória e distinção do *self* do *não-self*. Os linfócitos são células pequenas, com capacidade de migrar para os tecidos, contudo sem capacidade fagocítica. Os linfócitos subdividem-se em linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK. Após a interação dos linfócitos T e B *naïve* com o antigénio, estas células ficam ativadas e diferenciam-se em células efetoras e células de memória. As células efetoras desempenham funções específicas contra o antigénio, enquanto as células de memória persistem no hospedeiro. Os linfócitos NK são células linfoides, que não expressam recetores antígeno-específicos e são considerados parte do sistema imune inato, no entanto, relacionam-se intimamente com os linfócitos B e T. Estas células são eficazes na eliminação de células alteradas, sejam infetadas por vírus ou células tumorais. (Owen *et al.*, 2019)

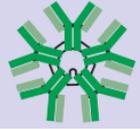
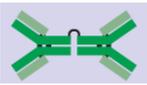
Os linfócitos T subdividem-se em dois tipos de linfócitos, os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e os linfócitos T auxiliares (CD4⁺).

Os linfócitos T só reconhecem o antígeno processado e associado a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC). As células envolvidas no processo de apresentação do antígeno aos linfócitos T são designadas por células apresentadoras de antígenos. Este é um grupo de células que engloba células dendríticas, monócitos e macrófagos. (Turgeon, 2014) Os linfócitos T auxiliares são ativados após a interação entre o seu recetor e o antígeno associado a moléculas de MHC e libertam citocinas específicas que irão promover a multiplicação e diferenciação em subtipos de linfócitos T, consoante o tipo de infeção presente. (Owen *et al.*, 2019) Os linfócitos T citotóxicos têm a capacidade de reconhecer e induzir a morte por apoptose das células infetadas por vírus e células tumorais. (Betts *et al.*, 2017)

Os linfócitos B são ativados após reconhecerem o antígeno específico através das suas imunoglobulinas de superfície. Após cerca de 5 dias, diferencia-se em plasmócitos e linfócitos B de memória. Os plasmócitos sintetizam e libertam para o plasma anticorpos específicos do antígeno que os estimulou. (Betts *et al.*, 2017) Ao longo do tempo, os linfócitos B podem aumentar a afinidade de ligação a um antígeno específico contra o qual são direcionados através de um processo designado por hipermutação somática e, inclusive, gerar anticorpos com classe funcionais diferentes (class switching), primeiramente surgem IgM e depois IgG (Turgeon, 2014) No entanto, também há produção de mais três classes de anticorpos, como está indicado na tabela 8. Os anticorpos possuem estrutura semelhante, que inclui uma região constante comum a praticamente todos os anticorpos e uma região variável, que é responsável por se ligar ao antígeno e difere de anticorpo para anticorpo. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) A função primordial dos anticorpos é a eliminação dos antígenos através de vários mecanismos como, neutralização, impedindo que o antígeno cause dano; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos; ativação do complemento; opsonização que promove fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos e imunidade das mucosas. (Owen *et al.*, 2019)

Após o primeiro contacto com o antígeno são gerados linfócitos B de memória que são fulcrais num próximo contacto com o mesmo antígeno, uma vez que irão responder rapidamente e desencadeiam a produção de elevadas quantidades de anticorpos. Este mecanismo de memória confere imunidade, que é um dos princípios imunológicos desenvolvidos após a toma de vacinas. (VanPutte, Regan e Russo, 2014)

Tabela 8: Tipo de imunoglobulinas sintetizadas pelos plasmócitos e as suas principais funções.

Tipo de anticorpo	Função
<p>Ig M (pentâmero)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Corresponde a cerca de 10% do total de imunoglobulinas. • É o primeiro anticorpo produzido numa resposta imune contra o antígeno. • Altamente eficaz nas reações de aglutinação e reações citolíticas. • Encontra-se maioritariamente no sangue e devido ao seu grande tamanho não consegue atravessar os espaços extravasculares.
<p>Ig G (monómero)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • É o anticorpo que se encontra em maior quantidade no sangue (cerca de 80%). • Atravessa facilmente os espaços extravasculares e, por isso, pode atravessar a placenta e conferir proteção ao feto. • Neutraliza toxinas ou microrganismos.
<p>Ig A (dímero)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • É a principal imunoglobulina presente nas secreções e mucosas, como trato gastrointestinal, saliva, lágrimas e muco presente na árvore respiratória. • É produzida pelos plasmócitos presentes nas mucosas. • Liga-se a antígenos de bactérias e vírus, que ficam retidos no muco, dificultando a sua infeção e adesão, que contribui para a sua eliminação. • A sua presença no leite materno é responsável pela imunização passiva do recém-nascido no primeiro mês de vida.
<p>Ig D (monómero)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Está presente no plasma em baixas concentrações. • Ainda sem função efetora totalmente conhecida.
<p>Ig E (monómero)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Embora produzida em baixas quantidades, tem alto potencial imunológico. • Liga-se aos recetores dos mastócitos (tecidos) e basófilos (sangue) e, simultaneamente ao antígeno, mediando a libertação de histamina e heparina por estas células, estimulando a resposta inflamatória. • São responsáveis pelas alergias. • São essenciais na defesa contra parasitas.

Adaptado de Anatomy & Physiology, Betts, J. G., College, T. J., Desaix, P., Johnson, J. E., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2013)

A. Amostra

A amostra utilizada no setor de imunologia é o soro, obtido a partir da colheita de sangue venoso para um tubo sem anticoagulante.

No LACUC, as determinações realizadas no setor de imunologia visam essencialmente duas vertentes: a serologia infecciosa e as doenças auto-imunes.

B. Serologia infecciosa

O diagnóstico serológico de uma infecção ou a avaliação do estado imunológico de um doente tira partido da capacidade do sistema imune produzir anticorpos em resposta a um agente invasor.

Através da combinação de vários marcadores serológicos presentes no soro de um indivíduo, como os anticorpos e os antigénios, é possível verificar se um indivíduo é suscetível, está infetado, ou imune a um agente infeccioso.

Algumas infeções, como toxoplasmose, rubéola e infeção por citomegalovírus, são assintomáticas na maioria dos indivíduos imunocompetentes e, por isso, principalmente em mulheres que pretendam engravidar torna-se importante fazer o rastreio antes e ao longo da gestação para rastrear a possível infeção e evitar consequências graves para o feto.

As determinações serológicas realizadas no LACUC incluem a técnica de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) realizado pelo aparelho automático Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS), técnicas de aglutinação e *lateral flow assay*.

B.1 Vitek Immuno Diagnostic Assay System

No LACUC, o diagnóstico serológico de algumas infeções é feito recorrendo a um aparelho designado de Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS). O VIDAS deteta anticorpos específicos do tipo IgM e quantifica anticorpos específicos do tipo IgG desenvolvidos numa determinada infeção ou decorrente da vacinação. Este equipamento também permite detetar antigénios, utilizando em ambos os casos o método de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) com leitura final em fluorescência, chamada de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA). (Biomérieux, 2023)

O método de ELISA é um imunoensaio sensível e específico que permite quantificar anticorpos ou antigénios através de uma reação enzimática que ocorre quando a enzima ligada a um anticorpo degrada o substrato. Além disso, existem diferentes configurações desta técnica dependendo do que se pesquisa, como por exemplo, a ELISA indireta e a ELISA sandwich. (Bio-Rad, 2019)

A ELISA indireta permite detetar a presença de anticorpos no soro, que reconhecem o antigénio aderido na superfície sólida. Por sua vez, os anticorpos presentes no soro são reconhecidos por um segundo anticorpo que está ligado a uma enzima. A ELISA sandwich visa a pesquisa antigénios presentes na amostra. O antigénio a pesquisar liga-se ao anticorpo aderido à superfície sólida. Por sua vez, o antigénio é reconhecido por um segundo anticorpo também ligado a uma enzima. (Hnasko, 2015) Em ambas as configurações de ELISA, é

necessário adicionar um substrato (4-metil-umbeliferil-fosfato), que será degradado pela enzima ligada ao anticorpo. Posteriormente, é medido por fluorescência (a 450nm) o produto resultante da reação, sendo o sinal da fluorescência emitida proporcional à concentração de anticorpo ou antígeno presentes na amostra. (Brutis e Bruns, 2015; Owen *et al.*, 2019)

No LACUC este autoanalisador é utilizado no diagnóstico de infecções por vírus da imunodeficiência humana, vírus da rubéola, vírus da hepatite B e C, citomegalovírus e *Toxoplasma gondi*.

B.1.1 Vírus da imunodeficiência humana

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um retrovírus, pertencente à subfamília *Lentivírus*. Atualmente são conhecidos dois tipos de VIH, o tipo 1 e o tipo 2, cujos genomas diferem 30-40%. Embora ambos sejam responsáveis pela síndrome imunodeficiência adquirida (SIDA). (Turgeon, 2014) O VIH-1 é normalmente mais patogénico e o mais frequente nas infecções por VIH a nível mundial. (Deeks *et al.*, 2015)

O VIH encontra-se presente em alguns fluidos biológicos, como o sangue, secreções genitais e leite materno e a transmissão está associada à prática de relações sexuais desprotegidas, partilha de objetos cortoperfurantes, transmissão através da placenta durante a gravidez, durante o parto e ainda durante a amamentação. (Turgeon, 2014)

O VIH é responsável por uma infeção crónica caracterizada por três fases clínicas. Após a entrada do vírus nas células que expressam o marcador CD4, como os linfócitos T, os monócitos, os macrófagos e células dendríticas, presentes no local de entrada, o vírus começa a produzir novos vírus. Os novos vírus são libertados e irão infetar novas células, dando início à fase aguda que pode ser sintomática com sintomas como mialgia, febre, mal-estar, linfadenopatias, que duram poucos dias e muitas vezes são desvalorizados. (Deeks *et al.*, 2015) A fase aguda caracteriza-se por um aumento dos níveis de RNA viral e uma diminuição de linfócitos T CD4⁺ associada à replicação viral. Ainda nesta fase, a intervenção dos linfócitos T CD8⁺ ajuda a controlar a replicação viral fazendo com que a diminuição dos linfócitos T CD4⁺ não seja tão acentuada. Após cerca de 6 semanas instaura-se a fase latente, na qual, apesar de assintomática, continua a haver replicação e destruição gradual de linfócitos T CD4⁺. (Deeks *et al.*, 2015) Na ausência de tratamento, os esforços do sistema imune tornam-se insuficientes devido à disfunção das células imunes, acentuando a destruição de linfócitos T CD4⁺. A ausência de células funcionais promove uma imunossupressão acompanhada pelo aumento dos níveis de RNA viral no plasma. Quando o utente possui linfócitos T CD4⁺ abaixo

dos 200/ μ l torna-se mais suscetível a infeções e doenças oportunistas, o que caracteriza a fase de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). (Turgeon, 2014)

O diagnóstico serológico de infeção por VIH assenta no método de ELISA para pesquisa de anticorpos e antígenos virais. (Turgeon, 2014) A ELISA indireta permite fazer a pesquisa e quantificação de anticorpos anti-VIH-1 e anti-VIH-2. Pela ELISA sandwich pesquisa-se o antígeno viral p24. (Biomérieux, 2023; Turgeon, 2014) A presença de p24 no soro está associada à replicação viral e pode ser detetada antes do surgimento dos anticorpos no soro. (Turgeon, 2014)

B.1.2 Vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (VHB) pertence à família *Hepadnaviridae*. Este vírus é responsável pela hepatite B, uma inflamação do tecido hepático que pode manifestar-se de diferentes formas, tais como: hepatite subclínica, hepatite autolimitada aguda, hepatite fulminante e, ainda, hepatite crónica. (António Gomes *et al.*, 2013; Turgeon, 2014)

O VHB encontra-se no sangue e outros fluidos corporais, como saliva, sêmen e leite materno, e, portanto, a sua transmissão pode ocorrer pela via perinatal, percutânea e através de relações sexuais desprotegidas. (Turgeon, 2014)

As alterações no tecido hepático devem-se ao dano causado pela resposta imune desenvolvida contra as células infetadas, que é responsável pelo aparecimento dos sintomas clínicos característicos, como fadiga, mal-estar, náuseas, febre, dor no hipocôndrio, icterícia e aumento das enzimas hepáticas. (Yuen *et al.*, 2018) Embora história clínica associada à elevação sérica das enzimas hepáticas sem outra causa aparente possa sugerir infeção, o diagnóstico definitivo é realizado com base em métodos serológicos. (Turgeon, 2014)

O VHB incorpora na sua estrutura o antígeno da superfície (Ag HBs) presente no envelope, o antígeno do core (Ag HBc) e o antígeno da cápside (Ag HBe), contra os quais são produzidos anticorpos. A partir da combinação dos antígenos e anticorpos presentes no soro pode-se identificar a fase clínica em que o indivíduo se encontra, como está ilustrado na Tabela 9. (Turgeon, 2014)

Cerca de 2 semanas após a infeção e antes do aparecimento dos sintomas, surge o primeiro marcador, o Ag HBs, e permanece cerca de 3 meses, sendo posteriormente eliminado pelos anticorpos anti-HBs, no caso de uma infeção aguda resolvida. (Yuen *et al.*, 2018) Contudo, nos portadores crónicos, o Ag HBs persiste no soro por mais de 6 meses. Os anti-HBs não surgem durante a fase aguda e a sua presença indica recuperação, conferindo imunidade duradoura à infeção. O Ag HBc é um antígeno intracelular que não é detetado no

soro, no entanto, desenvolvem-se anticorpos contra este antígeno, inicialmente do tipo IgM que posteriormente são substituídos por IgG, que perdura toda a vida. Assim, a presença de IgM anti-HBc indica que se trata de uma infecção recente, enquanto o IgG anti-HBc sugere a aquisição de memória. (Ferreira, 2000) A presença do Ag HBe é um marcador de replicação viral ativa e surge nos primeiros dias após infecção. A persistência do Ag HBe pode indicar progressão para uma infecção crónica. Nos indivíduos com infecção crónica permite ainda inferir sobre o prognóstico, uma vez que a sua presença no soro está associada a replicação viral ativa, logo pior prognóstico. (Yuen *et al.*, 2018).

A hepatite B é uma infecção que pode ser prevenida através do *screening* dos dadores de sangue, redução de comportamentos de risco e ainda através da vacinação. A vacina é constituída por Ag HBs que estimulará o sistema imune a produzir anti-HBs, conferindo assim, imunidade. (Yuen *et al.*, 2018)

Tabela 9: Diagnóstico serológico com base nos marcadores serológicos indicativos de hepatite B presentes no soro do utente.

	IgM Anti-HBc	Total Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe
Infeção aguda	+	+	+	-	+	-
Resolução da infeção aguda	-	+	-	+	-	+/-
Infeção crónica replicativa	-	+	+	-	+	-
Infeção crónica não replicativa	-	+	+	-	-	+
Resolução da infeção	-	+	-	+	-	+
Vacinação	-	-	-	+	-	-

Adaptado de *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*, Rehermann B, Nascimbini M (2005) e *Immunology and Serology in Laboratory Medicine*, Turgeon M (2014)

B.1.3 Hepatite C

O vírus da hepatite C (VHC) pertence à família *Flaviviridae* e é igualmente causador de uma hepatite. A maioria dos indivíduos com infecção hepática aguda por VHC progride para infecção crónica. Nestes casos, é maior o risco de desenvolver fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Nos casos mais graves pode ser necessário proceder a transplante, dada a possibilidade de risco de vida. (Manns *et al.*, 2017)

A forma de transmissão da infecção é através do contacto com sangue, ou outros fluídos biológicos, por via percutânea ou através da mucosa e, ainda, através da placenta durante a

gravidez. A forma mais frequente de transmissão é através da partilha de agulhas contaminadas associada à utilização de drogas intravenosas. (Turgeon, 2014)

Após a infeção por VHC é desencadeada uma resposta imune contra o vírus. Numa fase inicial, a replicação viral diminui, mas a certo momento há uma diminuição de linfócitos T, principalmente de linfócitos T CD4⁺, disfunção dos linfócitos NK e infiltração hepática, fatores estes que contribuem para a morte celular e que estão na origem da cronicidade do estado inflamatório. (Rehermann e Nascimbeni, 2005)

O longo período de incubação e ausência de sintomas na fase inicial dificulta o diagnóstico precoce. Porém, o vírus continua a replicar-se e a gerar dano no tecido hepático. O RNA viral atinge um pico antes do aumento das enzimas hepáticas. Cerca de 12 semanas após a infeção, os anticorpos específicos do VHC tornam-se detetáveis na maioria dos doentes. (Strauss, 2001; Turgeon, 2014) A hepatite C crónica caracteriza-se por flutuações nos níveis das enzimas hepáticas e anticorpos VHC, e níveis elevados de RNA viral continuam elevados. Após a recuperação da infeção por VHC, os anticorpos específicos permanecem no soro durante anos. (Rehermann e Nascimbeni, 2005)

O ELISA é útil para o diagnóstico das hepatites crónicas, especialmente nos indivíduos com alterações de transaminases e clínica sugestiva. No entanto, em infeções agudas recentes pode-se obter um resultado negativo, atrasando o diagnóstico. (Strauss, 2001)

No LACUC, é utilizado o VIDAS, que realiza um imunoensaio para a pesquisa de anticorpos IgG presentes no soro contra proteínas do core do vírus da hepatite C. (Biomérieux, 2023)

B.1.4 Toxoplasma gondi

O *Toxoplasma gondi* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo *Apicomplexa*, responsável pela toxoplasmose. Os hospedeiros definitivos são os gatos domésticos e outros felídeos, enquanto o Homem, outros mamíferos e aves funcionam como hospedeiros intermediários. (Rey, 2010)

A reprodução sexuada ocorre nos felídeos e culmina com eliminação fecal de oocistos não esporulados que se tornam infetantes no ambiente. (Tong et al., 2021) Estas estruturas são ingeridas pelo hospedeiro intermediário e no trato gastrointestinal dá-se a libertação dos esporozoítos presentes no seu interior. Posteriormente ocorre a transformação em taquizoítos que se reproduzem assexuadamente e se disseminam para invadir novas células. Nos tecidos, os taquizoítos transformam-se em quistos que podem persistir toda a vida do hospedeiro, tornando a infeção crónica e latente. A infeção com *T.*

gondii induz respostas imunes responsáveis pelo desaparecimento precoce dos taquizoítos do sangue periférico durante a infecção aguda e limita a carga parasitária nos órgãos. Porém, se o hospedeiro sofrer uma imunossupressão há uma reativação dos quistos e dos bradizoítos presentes no seu interior e estes podem invadir outros órgãos. (Tong et al., 2021) Normalmente, a transmissão ao Homem é acidental, mas pode ocorrer através da ingestão do ooquisto maduro, ingestão de quistos presentes na carne contaminada, transplantes de órgãos e ainda, através dos taquizoítos que atravessam a placenta quando a mãe adquire a infecção durante a gravidez. (Gockel-Blessing, 2013)

Os indivíduos imunocompetentes são, normalmente, assintomáticos, mas doentes imunocomprometidos podem desenvolver formas graves, como erupção maculopapular, hepatite, encefalite ou miocardite. Os fetos que contraíram a infecção podem desenvolver complicações neurológicas e oculares graves, atraso mental e psicomotor, sendo por esta razão importante que se faça a monitorização dos anticorpos anti-toxoplasma antes e durante a gravidez. (Mahon e Lehman, 2019)

Em imunocompetentes a infecção é, geralmente, impercetível e sem consequências, e, por isso, muitas das vezes não é diagnosticada. No entanto, o diagnóstico é importante em indivíduos imunodeprimidos, recém-nascidos que contraíram a infecção durante a gestação (infecção congénita) e, sobretudo no diagnóstico pré-natal de modo a inicializar o tratamento para evitar transmissão e/ou minimizar consequências para o feto. (Direção-Geral da Saúde, 2013; Mahon e Lehman, 2019)

Após a infecção com *T. gondii*, os anticorpos IgM aparecem no final da primeira semana e atingem um pico geralmente dentro de um mês, decrescendo os seus títulos a partir daí. A presença de anticorpos IgM pode indicar infecção ativa, infecção recente ou então uma reativação. (Rey, 2010) Os anticorpos IgG surgem cerca de segunda semana e podem persistir por toda a vida, indicando imunidade. (Turgeon, 2014) Para além da determinação dos títulos destes anticorpos, poderá ser necessário complementar estes resultados com o teste de avididade para IgG. O teste de avididade para IgG permite estimar a ocorrência da infecção quando há suspeita de ser uma infecção adquirida recentemente, isto é, quando os anticorpos IgM e IgG são positivos. Este teste assenta no princípio que a força de ligação do anticorpo ao antígeno (avididade) aumenta ao longo do tempo, sendo que uma forte avididade indica que a infecção foi adquirida há mais de 4 meses. (Tong et al., 2021) A Tabela 10 indica possíveis combinações serológicas dos anticorpos.

Tabela 10: Diagnóstico com base nos marcadores serológicos de *Toxoplasma Gondii* presentes no soro do utente.

Situação	Observação
IgM negativo e IgG negativo	Ausência de infeção e de imunidade.
IgM positivo e IgG negativo	Possível infeção aguda. Na eventualidade de se tratar de uma mulher grávida dever-se-á repetir os testes cerca de 3 semanas mais tarde. Se as IgG positivarem confirma-se que se trata de uma primoinfeção recente.
IgM negativo e IgG positivo	Poderá ser uma infeção relativamente antiga e, portanto, o indivíduo está imunizado.
IgM positivo e IgG positivo	Pode se tratar de uma infeção relativamente recente ou infeção antiga com IgM residuais e deve-se fazer nessa mesma amostra o teste da avidéz.

Adaptado de MARTINS, Carlos - *Toxoplasma na Gravidez*. Revista Portuguesa de Clínica Geral 2002

B.1.5 Citomegalovírus

O Citomegalovírus (CMV) é um herpesvírus pertencente ao género *Cytomegalovirus* com a capacidade de infetar diferentes tipos de células do hospedeiro humano, levando ao aumento do seu tamanho e ao desenvolvimento de inclusões intracelulares, alterações citopáticas características deste agente. (Turgeon, 2014; Dioverti e Razonable, 2016)

A infeção por CMV pode ser transmitida por via sexual, mas também devido ao contacto com outros fluídos biológicos infetados como o sangue, o leite materno e ainda, através da saliva, gotículas respiratórias, urina, fezes e transplantes de órgãos provenientes de pessoas infetadas. (Turgeon, 2014) No entanto, a forma mais preocupante de transmissão é a infeção congénita.

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infetados é assintomático, embora alguns indivíduos possam manifestar síndrome autolimitada semelhante à mononucleose com febre, mialgias, linfadenopatias e hepatite. Contrariamente, em indivíduos imunocomprometidos a sintomatologia é mais grave devido à disseminação sistémica, podendo em alguns casos ser fatal. As infeções congénitas também são casos sintomáticos graves, sendo normalmente o risco de transmissão maior quando a mãe adquire a infeção primária durante os primeiros meses de gravidez. Alguns bebés podem nascer com a doença das inclusões citomegálicas caracterizada por petéquias, hepatoesplenomegalia, microencefalia, cororetinite, atraso no crescimento intrauterino e, embora possam ser assintomáticas no período neonatal, podem mais tarde desenvolver complicações neurológicas. (Malm e Engman, 2007)

Uma vez adquirido, o CMV persiste nas células do hospedeiro como infecção crónica e, em caso de comprometimento da imunidade, o vírus que estava no estado latente até então pode ser reativado e provocar sintomatologia. (Mahon e Lehman, 2019; Malm e Engman, 2007)

No LACUC são detetados anticorpos produzidos em resposta ao vírus, para diagnosticar uma infecção ou avaliar um contacto prévio. Normalmente, a presença de IgM é indicativo de uma infecção ativa ou recente, podendo também ser detetado durante a reativação da infecção. Mais tarde desenvolvem-se as IgG, que podem indicar uma infecção passada. Para completar o diagnóstico pré-natal e natal, também se pode fazer o teste de avididade das IgG, caso os anticorpos IgM e IgG sejam positivos, no sentido de tentar datar a infecção.

B.1.6 Rubéola

O vírus da rubéola, pertencente ao género *Rubivirus* é o agente etiológico da rubéola. Normalmente em crianças e adultos, a rubéola é uma doença infecciosa autolimitada cujos sintomas se caracterizam pela presença de febre leve acompanhada de uma erupção cutânea eritematosa, maculopapular e discreta com linfadenopatia pós-auricular e suboccipital, sendo raras as complicações. (Mahon e Lehman, 2019)

A transmissão deste agente viral ocorre através da inalação de aerossóis provenientes de pessoas infetadas. Inicialmente, este vírus replica-se nas células do trato respiratório superior e após alcançar o tecido linfóide, dissemina-se pelos diferentes órgãos, inclusive atravessa a placenta durante a gravidez, sendo transmitido ao feto. (Winter e Moss, 2022)

A rubéola congénita pode ter efeitos graves, especialmente quando é adquirida no primeiro trimestre de gravidez. O feto pode apresentar complicações nos diferentes órgãos, como encefalite, hepatomegalia, defeitos ósseos, atraso mental, esplenomegalia, podendo mesmo levar à morte. (Banatvala e Brown, 2004)

Após cerca de 10 dias do início dos sintomas clínicos, os anticorpos do tipo IgM atingem o seu pico e tornam-se indetectáveis após cerca 5 semanas. Geralmente, a presença de IgM no soro sugere que o utente está perante uma infecção ativa. Posteriormente, os IgG têm um aumento abrupto e depois estabilizam, permanecendo indefinidamente, conferindo imunidade e proteção.

B.2 Técnicas de aglutinação

Os métodos de aglutinação assentam no princípio de que os antígenos presentes na superfície de partículas são reconhecidos por anticorpos presentes no soro do utente, formando um precipitado visível. (Mahon e Lehman, 2019)

No LACUC, esta técnica de deteção é realizada manualmente para o screening e monitorização da sífilis.

B.2.1 Sífilis

A sífilis é uma doença infecciosa sexualmente transmissível causada por uma espiroqueta designada de *Treponema pallidum*. A sua transmissão ocorre através de relações sexuais desprotegidas, contacto com lesões cutâneas de sífilis, através da placenta durante os estágios iniciais da infeção materna ou por transfusões sanguíneas. (Kumar, Abbas e Aster, 2013)

A infeção apresenta três fases de clínicas. A sífilis primária, caracterizada por uma úlcera com margens definidas, endurecidas e indolores na genitália, designada por cancro duro, acompanhado de infiltração de linfócitos e plasmócitos no local. Após cerca 2 meses dá-se a resolução do cancro duro e desenvolve-se a sífilis secundária. Esta segunda fase caracteriza-se pela disseminação sistémica, levando frequentemente ao aumento dos nódulos linfáticos e aparecimento de lesões maculopapulares e pustulosas. Ainda nesta fase pode-se entrar num período latente, mas contagioso. A fase terciária, embora menos infecciosa, ocorre após um longo período latente, na ausência de tratamento, e caracteriza-se por sintomatologia e envolvimento de vários órgãos: coração, osso, pele, sistema nervoso central (neurosífilis). (Kumar, Abbas e Aster, 2013; Mahon e Lehman, 2019)

As espiroquetas podem ser transmitidas ao feto durante qualquer fase da gravidez, sendo mais comum durante as duas primeiras fases da sífilis. Em consequência da transmissão ao feto pode ocorrer aborto, sífilis infantil ou sífilis congénita. No entanto, as manifestações maternas são muitas vezes despercebidas, sendo, por isso, feito testes serológicos de rotina às grávidas. (Mahon e Lehman, 2019)

Ao longo da infeção, o sistema imune desenvolve uma resposta imune contra a bactéria, nomeadamente pela produção de anticorpos. O diagnóstico serológico é o principal método de diagnóstico. Para realizar este diagnóstico pode recorrer-se a dois tipos de ensaios, ambos serológicos: testes não treponémicos, como o Rapid Plasma Reagin (RPR), e testes treponémicos, como o Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-ABS). (Peeling *et al.*, 2017)

Os testes não treponémicos detetam a presença de anticorpos IgM e IgG inespecíficos no soro, designados por reaginas, contra os componentes celulares do hospedeiro (antigénios) libertados aquando da destruição celular, como cardiolipina, lectina, colesterol. (Satyaputra et al., 2021) Para a sua determinação, o soro do indivíduo é misturado com partículas de carvão revestidas por cardiolipina. Caso o soro do indivíduo possua anticorpos específicos contra a cardiolipina, que desenvolveu durante a infeção, ocorrerá ligação com a cardiolipina, originando uma reação de macrofloculação, surgindo um aglomerado cinzento contra um fundo branco. Na eventualidade do teste não treponémico ser reativo, tem-se de quantificar o anticorpo presente e relatá-lo como um título. Deve-se ainda fazer a sua confirmação, através da realização de um teste treponémico, que o médico deverá prescrever.

Após uma terapêutica eficaz, haverá uma diminuição de antigénios expostos e, por conseguinte, haverá uma diminuição anticorpos produzidos, por este motivo os testes não-treponémicos são úteis para realizar um *screening* inicial e para monitorizar a terapêutica. (Peeling et al., 2017; Satyaputra et al., 2021) Embora simples e acessíveis, os testes não treponémicos podem ser positivos em condições clínicas que não a infeção por *Treponema pallium*, pois há vários fatores que contribuem para a destruição celular e desenvolvimento de reaginas, como a idade, infeções causadas por outros microrganismos e, ainda, doenças autoimunes como síndrome do anticorpo antifosfolipídico. (Kumar, Abbas e Aster, 2013; Satyaputra et al., 2021)

Os testes treponémicos são ensaios mais sensíveis que quantificam os anticorpos presentes no soro, principalmente IgG específicos contra uma variedade de antigénios da bactéria. Os anticorpos desenvolvidos contra componentes bacterianos persistem ao longo da vida, o que torna os testes treponémicos ineficazes para distinguir uma infeção ativa de uma infeção passada e até mesmo para avaliar a eficácia da terapêutica. Assim, estes testes são usados apenas para confirmar infeção após um teste não treponémicos positivo. (Satyaputra et al., 2021) O laboratório externo quantifica os anticorpos específicos por FTA-Abs. Neste ensaio de imunofluorescência indireta, se o indivíduo produziu anticorpos contra a bactéria (anticorpo primário), estes anticorpos irão ligar-se aos antigénios aderidos ao poço. De forma a visualizar a reação adiciona-se um anticorpo secundário (anti-imunoglobulina humana) conjugada com um fluoróforo, que se liga ao anticorpo primário. Assim, visualiza-se ao microscópio de fluorescência a luz emitida pelo fluoróforo após ser excitado. (Mahon e Lehman, 2019; Satyaputra et al., 2021)

Caso Clínico 3

A 18 de janeiro de 2023, um indivíduo do sexo masculino, com 24 anos, dirigiu-se ao LACUC com a prescrição para rastreio de sífilis.

No LACUC, foi realizado um teste não treponémico, o RPR, cujo resultado foi reativo. Tendo em conta a positividade do teste procedeu-se diluições seriadas em que se obteve o título de 1/16, como está ilustrado na Figura 8.

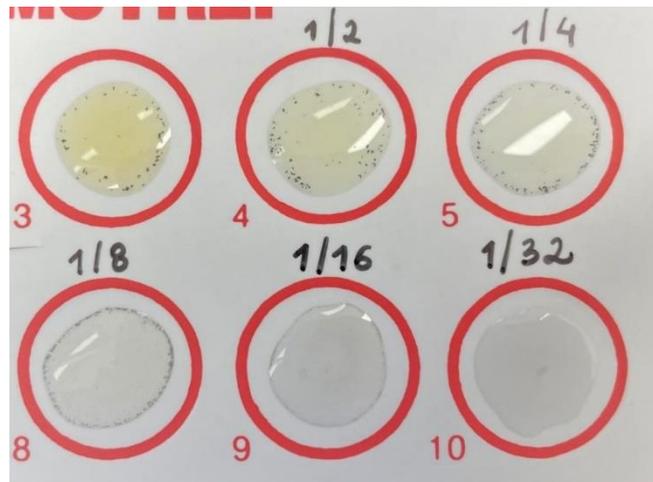


Figura 6: Diluições serológicas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) e subsequente teste RPR de cada uma. Ponteados cinzentos resultam de reações de aglutinação (fotografado no LACUC).

Tendo em conta a reatividade dos testes não treponémicos, era necessário proceder à realização de um teste treponémico para confirmar a presença de anticorpos anti-treponema. No entanto, o LACUC não realiza este ensaio e, por isso, o soro foi enviado para o laboratório externo. O resultado obtido no ensaio FTA-Abs revelou-se positivo, com um título 1/80.

O clínico prescreveu a terapêutica indicada para o utente, e este recorreu ao LACUC para fazer a monitorização da eficácia terapêutica. A 30 de março, o título do RPR ainda era reativo, com um título de 1/16. Posteriormente, a 17 de maio houve um decréscimo significativo dos títulos de anticorpos para 1/1.

B.3 Lateral flow assays

Os *lateral flow assay*, também designados de testes imunocromatográficos de fluxo lateral, são dispositivos que pesquisam a presença de antígenos ou anticorpos em diferentes tipos de amostras, como soro, plasma, sangue, urina e saliva. (Koczula e Gallotta, 2016)

Existem diferentes formatos de imunoenaios de fluxo lateral, o formato não competitivo e o formato competitivo. (Sajid, Kawde e Daud, 2015) No LACUC, a maioria dos testes usados para a detecção de antígenos são os *lateral flow assay* não-competitivos.

Para a realização deste imunoenensaio, é essencial que o antígeno, presente na amostra, esteja em solução de forma a facilitar o seu movimento ao longo da membrana de nitrocelulose. No *lateral flow assay* não-competitivo, à medida que a solução corre ao longo da membrana, o antígeno irá se ligar ao anticorpo específico de captura que está conjugado com partículas coloridas ou fluorescentes, como ouro coloidal, formando assim um complexo. Este complexo continua a migrar e vai ser reconhecido por um segundo anticorpo que está imobilizado em linha (linha teste) e, portanto, aparecerá uma linha vermelha. (Koczula e Gallotta, 2016) Na linha controlo existe um terceiro anticorpo imobilizado que interage com o anticorpo marcado não ligado ao antígeno (Sajid, Kawde e Daud, 2015) Assim, estes testes permitem determinar qualitativamente (a presença da banda reflete a sua presença) ou semiquantitativamente (a intensidade da cor da banda visualizada reflete a concentração do antígeno) o antígeno ou anticorpo. (Koczula e Gallotta, 2016)

Os ensaios *lateral flow assay* podem ser realizados fora do ambiente laboratorial, por pessoal não especializado, além de serem um teste barato e com especificidade adequada, permitem obter resultados mais rápidos com pouco volume de amostra. (Sajid, Kawde e Daud, 2015) No entanto, os órgãos reguladores aconselham em alguns casos a confirmação dos resultados positivos usando um método independente. (Koczula e Gallotta, 2016)

B.3.1 Calprotectina

A calprotectina é uma proteína citosólica, fixadora de cálcio, zinco e outros iões divalentes, e que se encontra em elevada quantidade nos neutrófilos. Esta molécula desempenha uma ação antimicrobiana, pois compete pelos mesmos iões que podem ser utilizados por agentes microbianos, e também possui uma ação imunomoduladora da resposta imune inata, uma vez que atua como molécula endógena de padrão molecular associada ao dano (DAMP). (Ayling e Kok, 2018)

As doenças inflamatórias intestinais são doenças recidivantes que causam dor, febre, náuseas, diarreia e perda de peso, com tendência para progredir para estenoses, perfurações, fístulas e grandes massas inflamatórias, e de diagnóstico complexo. (Jameson *et al.*, 2021) No entanto, a molécula calprotectina surge na clínica médica como um excelente biomarcador para auxiliar o diagnóstico, prever recidivas e monitorizar estas doenças inflamatórias intestinais, nomeadamente a colite intestinal e a doença de Crohn. A calprotectina é um

biomarcador muito sensível, e nos indivíduos diagnosticados com estas doenças a sua concentração nas fezes é cerca de seis vezes superior à do sangue. (Ayling e Kok, 2018) Os níveis de calprotectina nas fezes correlacionam-se significativamente com os dados clínicos e histológicos e a sua determinação não-invasiva, é uma mais-valia no estudo evolutivo da doença, uma vez que não são necessários métodos invasivos para fazer a monitorização. A quantidade de calprotectina nas fezes reflete a migração dos leucócitos e o estado inflamatório do trato gastrointestinal subjacente à patologia. (Manceau *et al.*, 2017) Contudo, não é muito específico, uma vez que os níveis de calprotectina podem ser afetados por condições não patológicas, incluindo fatores individuais, ambientais e o tipo de método usado para a sua determinação. (Ayling e Kok, 2018) No LACUC, faz-se a quantificação da calprotectina recorrendo a um lateral flow assay (imunoensaio).

Caso Clínico 4

Um indivíduo do sexo masculino, com 20 anos de idade, foi diagnosticado com uma doença inflamatória crónica. O indivíduo recorreu ao LACUC com a prescrição para dosear a calprotectina fecal e a proteína C reativa (PCR) no soro.

No momento da colheita das fezes, o indivíduo relatou que se encontrava numa fase de exacerbação dos sintomas, incluindo dores abdominais, náuseas e diarreia.

Após o conteúdo fecal migrar ao longo do *lateral flow assay*, o resultado da calprotectina fecal foi quantificado por um aparelho automático, como ilustrado na Figura 9.



Figura 7: Medição de calprotectina fecal pelo aparelho automático após migrar num lateral flow assay (fotografado no LACUC).

O valor obtido de calprotectina fecal determinado pelo aparelho foi de 308 $\mu\text{g}/\text{grama}$ de fezes. A nível sérico, o valor obtido da PCR foi um valor superior ao de referência (0,95 mg/dL).

A calprotectina fecal encontra-se significativamente elevada comparativamente ao valor de referência (<80 µg/g de fezes), pelo que é concordante com os sintomas descritos pelo utente e com a atividade inflamatória (compatível com o valor aumentado de PCR) decorrente de uma doença inflamatória intestinal.

B.3.2 Streptococcus pyogenes

O *Streptococcus pyogenes* é uma bactéria β-hemolítica pertencente ao grupo A de Lancefield, sendo responsável por situações de faringite e amigdalite. (Filho *et al.*, 2006) A sua transmissão ocorre durante o contato direto com pessoas infetadas ou colonizadas, por meio de gotículas de saliva emitidas através da tosse, espirros ou simplesmente através da fala. (Matas *et al.*, 2008)

Tendo em conta a solicitação específica pelo clínico para deteção da infeção por *S. pyogenes* através do teste lateral flow assay, recolhe-se o exsudado nasofaríngeo.

O teste imunocromatográfico permite detetar o hidrato de carbono (antigénio) presente na parede celular do agente bacteriano *Streptococcus* em 10-15 minutos. Um resultado positivo no teste diagnóstico orienta o tratamento com antibióticos. (Ruiz-Aragón, Rodríguez López e Molina Linde, 2010) A prescrição do tratamento correto é necessária para evitar a disseminação sistémica e consequentemente, surgimento de complicações graves após infeção, como a febre reumática ou glomerulonefrite aguda. (Mahon e Lehman, 2019)

B.3.3 Campylobacter

O género *Campylobacter* inclui várias espécies, no entanto, as espécies *C. jejuni* e *C. coli* são as principais bactérias envolvidas em gastroenterites em adultos e crianças. Estes agentes bacterianos provocam uma diarreia aguda com aspeto aquoso ou sanguinolento, acompanhada de febre, dor abdominal, perda de peso e cólicas, mas autolimitada. No entanto, os pacientes não tratados podem permanecer portadores por vários meses. (Tong *et al.*, 2021)

O *C. jejuni* e *C. coli* são comensais do trato intestinal de uma grande variedade de animais, como bovinos, suínos, aves e até cães e gatos. A sua transmissão ao Homem deve-se ao contato direto com estes animais, mas também devido ao consumo de água e laticínios contaminados e carne de aves malcozinhas. A transmissão de pessoa para pessoa pode também ocorrer. (Mahon e Lehman, 2019)

Além do teste de *lateral flow assay*, também se procede ao isolamento num meio seletivo, como Campyloset (CAM).

B.3.4 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertencente à família *Coronaviridae*, é responsável pela doença resultante do coronavírus 2019 (COVID-19). A sintomatologia provocada por este agente viral envolve febre, dor de garganta, tosse, dor torácica e muscular, dispneia, confusão, anosmia, ageusia e dor de cabeça. No entanto, pode levar a complicações mais graves e falência dos órgãos (síndrome respiratória aguda grave). (Kevadiya et al., 2021)

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por inalação das gotículas libertadas por uma pessoa infetada ou através de fómites infetados. Inicialmente, há multiplicação viral na área nasofaríngea e posteriormente disseminação para outros órgãos, incluindo os pulmões. (Harrison, Lin e Wang, 2020)

Face à situação epidemiológica ocorrida a nível mundial, o uso dos *lateral flow assay* para a pesquisa de antígenos tornou-se uma ferramenta muito útil e validada para controlar a disseminação da COVID-19, permitindo a rápida identificação da infeção ativa e isolamento de pacientes positivos. (Direção-geral de Saúde, Instituto Nacional de Saúde e Infarmed, 2020)

C. Doenças autoimunes

É inquestionável a importância de um sistema imune saudável de forma a responder face à invasão de um antígeno. É ainda é mais importante que o sistema imune consiga distinguir os antígenos estranhos dos antígenos presentes nas nossas células (antígenos *self*), a essa capacidade designa-se de tolerância. (Kumar, Abbas e Aster, 2013) A tolerância deve-se à intervenção dos linfócitos autoreativos, à prevenção da ativação dos linfócitos e à ativação de células T reguladoras, de forma que o sistema imune não ataque o próprio organismo. (VanPutte, Regan e Russo, 2014) No entanto, estes mecanismos de tolerância falham em alguns indivíduos levando à destruição, inflamação e morte de um tecido *self*, levando assim, ao aparecimento de sintomatologia inerentes ao órgão afetado (doenças auto-imunes). (Jameson et al., 2021)

No LACUC é muito frequente fazermos o diagnóstico e monitorização de doenças autoimunes da tiroide.

C.1 Regulação do eixo hipotálamo hipófise tiroide

A hormona libertadora de tireotrofina (TRH) e a hormona estimuladora da tiroide (TSH) trabalham de forma conjunta de modo a regular a secreção de triiodotironina livre (T3) e de tiroxina livre (T4) pela tiroide. Diversos estímulos contribuem para a libertação da TRH pelo hipotálamo para o sistema porta hipofisário, incluindo, o frio, o stress, a diminuição da

síntese e liberação das hormonas da tiroide, que por sua vez promove a liberação da TSH pela adenohipófise. A TSH após ser libertada entra na corrente sanguínea e vai atuar na tiroide. A ligação da TSH aos recetores das células foliculares da tiroide vai estimular a produção e liberação de T3 e T4. As hormonas tiroideias exercem um efeito de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a adenohipófise e assim, o seu aumento na circulação, promove a diminuição da secreção de TRH e TSH. (Betts *et al.*, 2017; Hall, 2011)

As hormonas T3 e T4 são sintetizadas pela tiroide e resultam da iodação de moléculas de tirosina ligadas à tiroglobulina. Os iões iodeto (I^-) provenientes da dieta entram nas células foliculares e são oxidados a iodo (I_2). Posteriormente, as enzimas peroxidases ligam o iodo aos aminoácidos de tirosina da molécula de tireoglobulina, previamente sintetizada pelas células foliculares. Desta ligação surgem duas moléculas intermediárias, o diiodotirosina e o monotirosina. Estas duas moléculas podem ligar-se entre si e formar a T3 e T4, que possuem três e quatro átomos de iodo ligados à tiroglobulina, respetivamente. A maior parte destas hormonas circula ligada a proteínas plasmáticas, como as globulinas de ligação à tiroxina (TBGs), até aos órgãos alvo, funcionando como um reservatório de hormonas tiroideias. Quando os níveis de produção das hormonas tiroideias diminuem, estas desligam-se das TBGs e atuam nas células alvo. A maioria das tiroglobulinas produzidas pela tiroide é a hormona T4. No entanto, a nível das células alvo ocorre conversão da hormona T4 em T3, sendo a hormona T3 a que exerce uma ação mais potente nos órgãos alvo. (Betts *et al.*, 2017; Hall, 2011)

A secreção de hormonas tiroideias possui um importante papel na maioria dos tecidos do nosso organismo, uma vez que são essenciais na regulação da temperatura corporal, na estimulação do metabolismo, crescimento e atividade celular, na atividade cardiovascular, gastrointestinal, neurológica e na metabolização de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Tendo em conta a diversidade de funções nos diversos órgãos, uma falha na homeostase destas hormonas traduz-se em efeitos opostos ou exacerbados, no caso de haver uma diminuição ou aumento da sua produção, respetivamente. (Hall, 2011)

C.2 Alteração da função tiroideia

Quando há uma disfunção na tiroide há alteração na síntese e liberação das hormonas tiroideias. (Gaw *et al.*, 2013)

O hipotireoidismo primário deve-se a uma diminuição da secreção de hormonas pela tiroide, que pode ter origem autoimune, na deficiência de iodo, em defeitos congénitos, em doenças hepáticas ou na administração de fármacos. Normalmente, a diminuição das hormonas tiroideias é acompanhada por um aumento da hormona TSH, de forma que por

retroalimentação negativa estimule a síntese pela tiroide. O hipotireoidismo secundário é menos comum, e deve-se a uma deficiência da produção da TSH ou a um defeito do recetor da TSH na tiroide. (Gaw *et al.*, 2013)

O hipertireoidismo primário traduz-se num aumento da produção das hormonas tiroideias devido a doenças autoimunes, adenomas ou nódulos tóxicos, que é acompanhado pela diminuição da TSH. O aumento das hormonas da tiroide pode ainda dever-se a uma causa secundária, isto é, haver um aumento da produção de TSH pela hipófise. (Gaw *et al.*, 2013)

C.2.1 Tiroide de Hashimoto

A tiroidite de Hashimoto é a uma doença autoimune responsável pela maioria dos casos de hipotireoidismo.

Esta patologia é caracterizada pela ocorrência de processos imunológicos mediados por células e autoanticorpos que destroem as células da tiroide e, em consequência, dá-se uma diminuição da produção de hormonas da tiroide. A maioria destes pacientes possuem anticorpos anti-peroxidase (anti-TPO) que inibem a sua função enzimática, e anticorpos contra a tiroglobulina (anti-Tg). (Jameson *et al.*, 2021)

C.2.2 Doença de Graves

A doença de Graves é a causa mais comum de hipertireoidismo que se deve principalmente à infiltração de células B na tiroide. Estas células B produzem anticorpos contra o recetor de TSH (TRAb) presentes nas células foliculares da tiroide. (Wémeau *et al.*, 2018) A ligação dos TRAbs aos recetores foliculares leva à ativação dos recetores e estimula a produção de hormonas T3 e T4. (Jameson *et al.*, 2021)

Caso Clínico 5

Um individuo do sexo feminino com 22 anos de idade recorreu ao LACUC com uma prescrição médica para o estudo da função tiroideia. As determinações analíticas e bem como o resultado analítico encontra-se na Tabela abaixo.

Tabela II: Parâmetros de avaliação da função tiroideia do utente e os respetivos resultados.

	Resultado/Unidades	Valores de referência
Tirotoxina Livre (FT4)	0,88 ng/dL	0,70-1,48 ng/dL
H. Tireoestimulante (TSH)	1,566 UI/mL	0,350-4,940 UI/mL
Anticorpos anti-tiroglobulina (Tg)	71,2 UI/mL	<4,1 UI/mL
Anticorpos anti-peroxidase (TPO)	24,31 UI/ml	<5,61 UI/mL

Tendo em conta a presença de anticorpos anti-TPO e anti-Tg em elevada quantidade, e os valores normais de T4 livre e TSH poder-se-á suspeitar de uma fase inicial de uma doença autoimune, nomeadamente a tiroidite de Hashimoto. Embora os anticorpos antitiroideos já estejam presentes, ainda não houve um compromisso da função tiroideia. Por isso, seria prudente o médico fazer a vigilância da função tiroideia.

SETOR DE MICROBIOLOGIA

As amostras mais processadas no setor da microbiologia são urinas destinadas à realização de uroculturas para o diagnóstico de infecções urinárias. Após a receção das urinas, inocula-se 10 µl de urina num meio cromogéneo, o CPSE elite, pela técnica de esgotamento do produto e posteriormente incuba-se durante 24 horas a 37°C. Após incubação das placas realiza-se a identificação presuntiva e a quantificação das colónias que cresceram na placa. Para realizar a identificação definitiva do agente causador da infeção procede-se à realização das provas bioquímicas recorrendo a galerias bioquímicas, como analytical profile index (API). Estes API's são diferentes consoante a suspeita do género responsável pela infeção. As bactérias mais comuns nas amostras de urina analisadas no laboratório foram *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Após a identificação é realizado o antibiograma para avaliar a sensibilidade aos antibióticos mais utilizados para tratar infeções urinárias e, assim, auxiliar o clínico na prescrição do melhor antibiótico.

Também se procede à recolha de fezes para a realização de coproculturas. Após a chegada das fezes é feito exame direto a fresco e a coloração de Gram de forma a observar se há predominância de uma morfologia e o movimento das bactérias presentes. Posteriormente, inocula-se as fezes em caldo de enriquecimento eletivo de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, designado de Rappaport, durante 24 horas a 37°C e, após esse período de incubação faz-se a repicagem para o meio Shigella-Salmonela e meio Hektoen para a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Simultaneamente, as fezes são inoculadas em meio Shigella-Salmonela e meio Hektoen para a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, que são incubados durante 24 horas a 37°C. Adicionalmente, também é realizada a pesquisa de *Campylobacter spp.*, em que as fezes são inoculadas em meio de cultura Campyloesel e incubadas em ambiente microaerofílicos a 42°C durante 48 horas. É também realizada a pesquisa do antigénio de *Campylobacter spp.* através de um lateral flow assay.

Após a colheita de exsudados orofaríngeos faz-se a inoculação para gelose de Sangue, para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes*, e a inoculação do exsudado nasal em gelose de Chapman para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*.

SETOR DE BIOQUÍMICA

No setor de bioquímica são processadas amostras de soro e urina para monitorização e diagnóstico de patologias, com base na determinação de certos parâmetros bioquímicos, através do analisador automático designado *Arquitect c4000*.

Este módulo realiza, através da espetofotometria, da imunoturbidimetria e da potenciometria, a quantificação dos parâmetros que permitem avaliar a função hepática e renal, o metabolismo lipídico, o metabolismo proteico e o metabolismo da glicose no soro.

Além disso, neste módulo também determina parâmetros no sobrenadante urinário, como a albumina e a creatinina, que permitem avaliar a função renal.

SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR

O setor de biologia molecular tem como objetivo detetar a presença de genoma de um agente infeccioso na amostra. O analisador automático *Alinity m* (Abbot) executa a extração do genoma presentes nas células, amplifica-o e deteta-o através da fluorescência emitida.

As amostras de urina, exsudados vaginais e uretrais são processados para a deteção de genoma de agentes responsáveis por infeções sexualmente transmissíveis, nomeadamente *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma spp.* e *Trichomonas vaginalis*. Para além disso, também se faz o diagnóstico de infeções respiratórias como o vírus Influenza A e B, vírus sincicial respiratório e o vírus SARS-CoV-2.

A biologia molecular teve uma grande importância face à situação de pandemia de COVID-19, quer seja para rastreio, diagnóstico e monitorização, mas também na identificação de novas variantes virais.

4.3 Apoio a estudos e investigação

O LACUC desempenha um papel ativo no auxílio a projetos de investigação que decorrem na Universidade de Coimbra.

Além disso, o laboratório desenvolve os seus próprios estudos. Inclusive, durante a realização deste estágio tive a oportunidade de participar na realização de um poster sobre a pandemia COVID-19 durante 2020 e 2022: “COVID-19 em Portugal: Efeito da vacinação na casuística de um laboratório da região centro” (resumo ilustrado na Figura 10). Este trabalho foi apresentado no 10º congresso organizado pela Sociedade Portuguesa de Virologia, “Pandemias na Era da Globalização & VI Congresso Nacional de Virologia”. Este poster resultou da colaboração da Técnica Superior Daniela Veiga e estagiários do LACUC com a Dra. Ana

Miguel Matos e a Dra. Joana Oliveira, do Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF).

A minha participação na realização deste projeto permitiu-me tomar consciência do papel desempenhado pelos laboratórios de Análises Clínicas no diagnóstico precoce e na monitorização da infeção por COVID-19. O meritório trabalho destes laboratórios visou reduzir a transmissão do vírus e mitigar a infeção, e, juntamente com o papel da vacinação no controlo da transmissão, criar a imunidade de grupo e diminuir a gravidade da infeção, ações que sem dúvida alguma foram necessários para a retoma da normalidade pré-COVID-19.

P13 | COVID-19 em Portugal: Efeito da vacinação na casuística de um laboratório da região centro

Autor Apresentador: Ana Miguel Matos

Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), Portugal; Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF), Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Outros Autores: Daniela Veiga¹; Joana Oliveira²; Ana Rodrigues¹; Daniela Saldanha¹; Ana Miguel Matos^{1,2}.

1 Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), Portugal; 2 Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF), Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Introdução: Em Portugal, os primeiros casos de COVID-19 foram confirmados a 2 de março de 2020. De forma a prevenir e controlar este grave problema de saúde pública, várias medidas higiénico-sanitárias foram implementadas, incluindo a testagem de todos os casos suspeitos e contactos de casos positivos. O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) assumiu um papel preponderante nesta missão, assegurando o reforço da testagem na Região Centro de Portugal. A 27 de dezembro de 2020, Portugal deu início ao plano de vacinação contra a COVID-19, outra medida fulcral no controlo da pandemia.

Objetivo: Retratar o efeito do plano de vacinação na evolução da pandemia de COVID-19, através da casuística de um Laboratório da Região Centro de Portugal.

Metodologia: Análise dos resultados de RT-PCR obtidos para pesquisa de SARS-CoV-2 no LACUC, durante um período de dois anos: abril de 2020 a março de 2022. O período de tempo foi selecionado por forma a abranger os principais picos pandémicos. Os dados disponíveis foram agrupados por trimestre, e em função da idade dos utentes, tendo esta sido categorizada em <18, 18-24, 25-49, 50-64, 65-79 e ≥80.

Resultados: No período selecionado foram analisadas 144 911 amostras, com uma percentagem de positividade de 10%. Os valores mais elevados de positividade ocorreram durante o primeiro trimestre de 2021 e de 2022. Os elevados valores no primeiro trimestre de 2022 coincidem com o período em que os testes de RT-PCR passaram a ser maioritariamente utilizados para confirmar testes rápidos de antígeno positivos.

Adultos com idade ≥80 anos representaram o grupo etário com maior percentagem de casos positivos até ao 1º trimestre de 2021, altura em que teve início a vacinação deste grupo populacional. No 3º trimestre de 2021 voltou a ser este o grupo populacional com maior percentagem de casos positivos, tendência que foi revertida após reforço da vacinação.

Conclusão: Os dados obtidos confirmam que o número de casos de COVID-19 em Portugal, variaram em função do plano de vacinação e da variação temporal da proteção conferida pelas várias doses da vacina, enfatizando a importância da adesão aos programas de vacinação.

Figura 8: Imagem do resumo do poster apresentado no 10º Congresso de Virologia, “Pandemias na Era da Globalização & VI Congresso Nacional de Virologia”, organizado pela Sociedade Portuguesa de Virologia, decorrido em Coimbra, Portugal.

O tema apresentado pelo LACUC e CIEPQPF remeteu para o tempo pandémico no qual o LACUC teve um papel preponderante no diagnóstico e monitorização da COVID-10: “COVID-19 em Portugal: Efeito da vacinação na casuística de um laboratório da região centro”.

4.4 Fase pós-analítica

Os erros que decorrem durante a fase pré-analítica e analítica, como hemólise da amostra devido ao tempo excessivo do torniquete e pipetagem incorreta das amostras, respetivamente refletem-se nesta última fase.

Após a obtenção dos resultados através dos ensaios realizados, estes devem ser posteriormente avaliados e validados por um especialista em Análises Clínicas. O especialista verifica a coerência dos resultados obtidos com o género e a idade do utente, a história clínica, o diagnóstico ou a sua suspeita e o tratamento, quando fornecidos pelo clínico e, ainda, com os resultados anteriores, se se tratar de um utente habitual do laboratório.

Contudo, após a emissão dos resultados de todas as análises requisitadas pelo utente, o laboratório tem a política de armazenar as amostras. Se, eventualmente, o clínico tiver dúvidas relativamente a um resultado, poder-se-á realizar novamente. Posteriormente, o LACUC arquiva os resultados e registos laboratoriais do utente.

5. Conclusão

A realização do estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra foi essencial para completar a aprendizagem adquirida na Licenciatura em Ciências Biomédicas e, principalmente, para estabelecer uma ponte entre o conteúdo lecionado no mestrado e contexto real de laboratório.

Além de o estágio contribuir para a consolidação dos conhecimentos, também foi uma ferramenta para adquirir novos conhecimentos, aprimorar a minha destreza prática para a realização dos procedimentos, aprender a trabalhar com os diferentes aparelhos automatizados das diferentes áreas laboratoriais, assim como acompanhar os seus controlos e manutenções. Ainda assim, aprendi sobre a importância de estabelecer um sistema de qualidade num laboratório, uma vez que são uma mais-valia para a segurança dos resultados por nós fornecidos.

Atualmente a maioria das determinações analíticas são realizadas com auxílio de autoanalisadores, a intervenção humana acaba por ser mais reduzida e os resultados são obtidos mais rapidamente e, simultaneamente mais sensíveis. No entanto, isto não dispensa a utilização do espírito crítico e constante atualização dos conhecimentos por parte dos técnicos profissionais.

A minha jornada pelo laboratório permitiu-me perceber o fundamento teórico das técnicas utilizadas e a realização de trabalhos semanais das diferentes áreas que contribuíram para o constante lembrar da componente teórica e facilitar a interpretação dos casos que surgiam.

Este estágio permitiu aprofundar a minha consciência da importância das Análises Clínicas e de como o profissionalismo, conhecimentos e formação contínua de uma equipa podem ter reflexo na prestação de serviços de qualidade ao utente e contribuir para o sucesso do diagnóstico, tratamento e monitorização de patologias.

O LACUC revelou ser um ótimo laboratório de formação, pois para além dos profissionais de saúde do laboratório me transmitirem o seu saber também contribuíram para a minha formação enquanto pessoa, pois inculcaram valores como trabalho em equipa, ajuda, cuidado pelas amostras e empatia pelo utente.

Durante estes 2 últimos anos adquiri as competências essenciais para o exercício profissional das Análises Clínicas, uma vez que obtive uma excelente formação teórica e prática e, por isso, considero que a minha experiência foi bastante enriquecedora e que os objetivos traçados foram atingidos.

No entanto, o trabalho não termina por aqui, pois exigirá sempre da minha parte a constante atualização da minha formação, de modo a conseguir acompanhar a evolução da ciência. Como diz o médico Içami Tiba “aprender é alimentar o saber”.

6. Referências

- AVENT, Neil D.; REID, Marion E. - The Rh blood group system: a review. *Blood*. ISSN 1528-0020. 95:2 (2000) 375–387. doi: 10.1182/blood.V95.2.375.
- AYLING, Ruth M.; KOK, Klaartje - Fecal Calprotectin. *Advances in Clinical Chemistry*. 87:2018) 161–190. doi: 10.1016/bs.acc.2018.07.005.
- AYTEKIN, Mujdat - The Current Use and the Evolution of Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement. *Middle Black Sea Journal of Health Science*. ISSN 2149-7796. 4:1 (2018) 17–23. doi: 10.19127/mbsjohs.393733.
- BADRICK, Tony - Integrating quality control and external quality assurance. *Clinical Biochemistry*. ISSN 0009-9120. 95 (2021) 15–27. doi: 10.1016/j.CLINBIOCHEM.2021.05.003.
- BAIN, Barbara - *Blood Cells: A Practical Guide*. 5. ed. United Kingdom: Wiley Blackwell, 2015
- BAIN, Barbara *et al.* - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12^a ed. China: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2.
- BANATVALA, J.; BROWN, D. - Rubella. *The Lancet*. ISSN 01406736. 363:9415 (2004) 1127–1137. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15897-2.
- BARATA, Lurdes - Tratamentos médicos aplicados ao longo da História, atual. set. 2021. (Consult. 28 jun. 2023). Disponível em: <https://www.medicina.ulisboa.pt/newsfmul-artigo/115/tratamentos-medicos-aplicados-ao-longo-da-historia>>.
- BECKMAN COULTER - Instructions for Use: DxH 500, atual. 22 jul. 2022. (Consult. 3 jul. 2023). Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/products/hematology/dxh500#/documents>>.
- BETTS, J. Gordon *et al.* - *Anatomy & Physiology*. Houston: Openstax, 2017. ISBN 978-1-938168-13-0.
- BIOMÉRIEUX - VIDAS: Sistema de imunoensaios automáticos, atual. 2023. [Consult. 27 jun. 2023]. Disponível em: https://www.biomerieux.pt/produto/vidasr#_vidas-strips-bio0946.jpg_0_1>.
- BIO-RAD - ELISA Basics Guide, atual. 2019. (Consult. 1 jul. 2023). Disponível em: https://www.bio-rad-antibodies.com/an-introduction-to-elisa.html?JSESSIONID_STERLING=9B99B900D7AFD2C97ABE758990013BDF.ecommerce2&evCntryLang=PT-en&cntry=PT&thirdPartyCookieEnabled=true>.

BRUTIS, Carl; BRUNS, David - Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7^a ed. St. Louis: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6.

DEEKS, Steven G. *et al.* - HIV infection. Nature Reviews Disease Primers. ISSN 2056-676X. 1:1 (2015) 15035. doi: 10.1038/nrdp.2015.35.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - Norma da Direção-Geral da Saúde: Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco (Consult. 28 jun. 2023). Disponível em: http://www.spp.pt/UserFiles/file/EVIDENCIAS%20EM%20PEDIATRIA/DGS_31_2011_ACTUALIZADA%2012.2013.pdf>.

DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE - Norma da Direção Geral da Saúde: Prescrição e Determinação do Hemograma, atual. 30 dez. 2011. (Consult. 21 jun. 2023). Disponível em: https://ordemosmedicos.pt/wpcontent/uploads/2017/09/Prescricao_e_Determinacao_do_Hemograma.pdf>.

DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE; INFARMED - Diagnóstico COVID-19 - Testes de pesquisa de antígeno, atual. 15 out. 2020. (Consult. 3 jul. 2023). Disponível em: <https://www.insa.min-saude.pt/diagnostico-covid-19-testes-de-pesquisa-de-antigenio/>>.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria Das Graças - Pseudotrombocitopenia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. ISSN 1676-2444. 40:5 (2004). doi: 10.1590/S1676-24442004000500007.

FERREIRA, Marcelo Simão - Diagnóstico e tratamento da hepatite B. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. ISSN 0037-8682. 33:4 (2000) 389–400. doi: 10.1590/S0037-86822000000400010.

FILHO, Bernardo Cunha Araujo *et al.* - Role of rapid antigen detection test for the diagnosis of group-A β -hemolytic streptococcus in patients with pharyngotonsillitis. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. ISSN 18088694. 72:1 (2006) 12–15. doi: 10.1016/S18088694(15)30027-6.

GAW, Allan *et al.* - Clinical Biochemistry: An Illustrated Colour Text. 5^a ed. British: Elsevier, 2013. ISBN 9780702054143.

GOCKEL-BLESSING, Elizabeth - Clinical Parasitology: A Practical Approach. 2^a ed. Minissouri: Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4160-6044-4.

- GOMES, Marcos *et al.* - Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)*. ISSN 22554823. 59:5 (2013) 514–524. doi: 10.1016/S2255-4823(13)70511-3.
- HALL, E. John - Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology. 12^a ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4160-4574-8.
- HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua - Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*. ISSN 14714981. 41:12 (2020) 1100–1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- HIGUCHI, Makoto; WATANABE, Nobuo - A rapid and accurate method for estimating the erythrocyte sedimentation rate using a hematocrit-corrected optical aggregation index. *PLOS ONE*. ISSN 1932-6203. 17:7 (2022) e0270977. doi: 10.1371/journal.pone.0270977.
- HNASKO, Robert – *ELISA Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2015 Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2742-5>. ISBN 978-1-4939-2741-8.
- HOBBS, F. D. *et al.* - Is the international normalised ratio (INR) reliable? A trial of comparative measurements in hospital laboratory and primary care settings. *Journal of Clinical Pathology*. ISSN 0021-9746. 52:7 (1999) 494–497. doi: 10.1136/jcp.52.7.494.
- HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul - *Hoffbrand's Essential Haematology*. 7^a ed. United States of America: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
- JAFRI, Lena *et al.* - Development of a virtual classroom for pre-analytical phase of laboratory medicine for undergraduate medical students using the Delphi technique. *PLOS ONE*. ISSN 1932-6203. 17:4 (2022) e0264447. doi: 10.1371/journal.pone.0264447.
- JALA, A. *et al.* - Distribuição alélica dos antígenos de neutrófilos humanos em doadores de sangue das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. ISSN 25311379. 43:2021) S318–S319. doi: 10.1016/j.htct.2021.10.539.
- JAMESON, Larry *et al.* - *Manual de Medicina de Harrison*. 20^a ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill Education, 2021. ISBN 9786558040002.
- KEVADIYA, Bhavesh D. *et al.* - Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature Materials*. ISSN 1476-1122. 20:5 (2021) 593–605. doi: 10.1038/s41563-020-00906-z.
- KIM, M. *et al.* - Erythrocyte sedimentation rate measured using microhemagglutination is not elevated in monoclonal gammopathy compared with other diseases. *International Journal of Laboratory Hematology*. ISSN 17515521. 40:5 (2018) 540–548. doi: 10.1111/ijlh.12859.

KOCZULA, Katarzyna M.; GALLOTTA, Andrea - Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*. ISSN 0071-1365. 60:1 (2016) 111–120. doi: 10.1042/EBC20150012.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. - Robbins patologia básica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. ISBN 978-85-352-6294-0.

MAHON, Connie; LEHMAN, Donald - Textbook of Diagnostic Microbiology. 6ª ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-48218-9.

MALM, Gunilla; ENGMAN, Mona-Lisa - Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. ISSN 1744165X. 12:3 (2007) 154–159. doi: 10.1016/j.siny.2007.01.012.

MANCEAU, Hana *et al.* - Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. ISSN 1437-4331. 55:4 (2017) 474–483. doi: 10.1515/cclm-2016-0522.

MARTINS, Carlos - Toxoplasmose na gravidez. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*. 18:5 (2002) 333–40. doi: 10.32385/rpmgf.v18i5.9891.

MANNS, Michael P. *et al.* - Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. ISSN 2056-676X. 3:1 (2017). doi: 10.1038/nrdp.2017.6.

MATAS, Lurdes *et al.* - Diagnóstico de las faringitis estreptocócicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ISSN 0213005X. 26: SUPPL. 13 (2008) 14–18. doi: 10.1157/13128775.

NICHOLS, James H. - Laboratory Quality Control Based on Risk Management. *Annals of Saudi Medicine*. ISSN 0256-4947. 31:3 (2011) 223–228. doi: 10.4103/0256-4947.81526.

OLSHAKER, Jonathan; JERRARD, David - The erythrocyte sedimentation rate. *The Journal of Emergency Medicine*. USA. 15:6 (1997) 869–874.

OWEN, Judith *et al.* - Kuby Immunology. 8ª ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2019. ISBN 9780702054143.

PEELING, Rosanna W. *et al.* - Syphilis. *Nature Reviews Disease Primers*. ISSN 2056-676X. 3:1 (2017) 17073. doi: 10.1038/nrdp.2017.73.

PLEBANI, M. *et al.* - Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clinica Chimica Acta*. ISSN 00098981. 432:2014) 44–48. doi: 10.1016/j.cca.2013.07.033.

POURAZAR, Abbasali - Red cell antigens: Structure and function. *Asian Journal of Transfusion Science*. ISSN 0973-6247. 1:1 (2007) 24. doi: 10.4103/0973-6247.28069.

- PRCHAL, Josef T. - Molecular Biology of Polycythemias. Internal Medicine. ISSN 0918-2918. 40:8 (2001) 681–687. doi: 10.2169/internalmedicine.40.681.
- REHERMANN, Barbara; NASCIMBENI, Michelina - Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nature Reviews Immunology. ISSN 1474-1733. 5:3 (2005) 215–229. doi: 10.1038/nri1573.
- REY, Luís - Bases da Parasitologia Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. ISBN 978-85-277-1580-5.
- RIN, Giorgio DA - Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. Clinica Chimica Acta. ISSN 00098981. 404:1 (2009) 68–74. doi: 10.1016/j.cca.2009.03.024.
- RODAK, Bernadette; CARR, Jacqueline - Clinical Hematology Atlas. 5ª ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-32249-2.
- RUIZ-ARAGÓN, J.; RODRÍGUEZ LÓPEZ, R.; MOLINA LINDE, J. M. - Evaluación de los métodos rápidos para la detección de Streptococcus pyogenes. Revisión sistemática y metaanálisis. Anales de Pediatría. ISSN 16954033. 72:6 (2010) 391–402. doi: 10.1016/j.anpedi.2009.12.012.
- SAJID, Muhammad; KAWDE, Abdel-Nasser; DAUD, Muhammad - Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. Journal of Saudi Chemical Society. ISSN 13196103. 19:6 (2015) 689–705. doi: 10.1016/j.jscs.2014.09.001.
- SANTOS, V. M. Dos; CUNHA, S. F. De C. Da; CUNHA, D. F. Da - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. Revista da Associação Médica Brasileira. ISSN 0104-4230. 46:3 (2000) 232–238. doi: 10.1590/S0104-42302000000300008.
- SATYAPUTRA, Ferris *et al.* - The Laboratory Diagnosis of Syphilis. Journal of Clinical Microbiology. ISSN 0095-1137. 59:10 (2021) e001000-21. doi: 10.1128/JCM.00100-21.
- SIMON, Michael W. - The atypical lymphocyte. International Pediatrics. 18:1 (2003) 20–22.
- STRAUSS, Edna - Hepatite C. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. ISSN 0037-8682. 34:1 (2001) 69–82. doi: 10.1590/S0037-86822001000100011.
- TONG, Wen Han *et al.* - Behavioral biology of Toxoplasma gondii infection. Parasites & Vectors. ISSN 1756-3305. 14:1 (2021) 77. doi: 10.1186/s13071-020-04528-x.
- TURGEON, Mary - Immunology & Serology in Laboratory Medicine. 5ª ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-323-08518-2.

VANPUTTE, Cinnamon; REGAN, Jennifer; RUSSO, Andrew - Anatomia & Fisiologia de Seeley. 10ª ed. São Paulo: AMGH, 2014. ISBN 9780073403632.

VIEIRA, Keila Furtado *et al.* - A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. ISSN 1676-2444. 47:3 (2011) 201–210. doi: 10.1590/S1676-24442011000300002.

WÉMEAU, Jean Louis *et al.* - Graves' disease: Introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors. *Annales d'Endocrinologie*. ISSN 00034266. 79:6 (2018) 599–607. doi: 10.1016/j.ando.2018.09.002.

WINTER, Amy K.; MOSS, William J. - Rubella. *The Lancet*. ISSN 01406736. 399:10332 (2022) 1336–1346. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02691-X.

YUEN, Man-Fung *et al.* - Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. . ISSN 2056-676X. 4:1 (2018) 18035. doi: 10.1038/nrdp.2018.35.