

Beatriz Isabel Alves Escada

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dra. Alice Mendes e pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Beatriz Isabel Alves Escada

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dra. Alice Mendes e pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Depois de concluída esta jornada de dois anos, é bom olhar para trás e ver que todo o esforço e trabalho são agora recompensados. Resta então agradecer a todas as pessoas que contribuíram para o meu sucesso nesta etapa.

À Professora Doutora Leonor Almeida pela orientação ao longo dos dois anos de mestrado e neste estágio e à Dr^a. Alice Mendes por me ter tão bem integrado e orientado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Ao Director do Serviço de Patologia Clínica, Dr. Fernando Rodrigues, por se ter revelado sempre disponível para resolver e ajudar em qualquer situação.

Agradeço ainda a todos os Médicos, Técnicos Superiores, Técnicos de Análises Clínicas e aos restantes funcionários do Serviço de Patologia Clínica por me terem transmitido os conhecimentos necessários para me tornar uma profissional melhor e sobretudo para respeitar o doente.

À minha família que é e sempre será o meu maior pilar e às pessoas que se cruzaram comigo neste mestrado e que foram excelentes colegas, principalmente a Ana Frias e a Solange Craveiro, companheiras de luta há 5 anos e que são como irmãs para mim.

Um muito obrigado!

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	2
3.	O SETOR DE IMUNOLOGIA	4
3.1.	Equipamentos e princípios de metodologia utilizados	4
3.2.	Estudo eletroforético das proteínas séricas.....	8
3.2.1.	As proteínas séricas e a sua análise por eletroforese de zona.....	8
3.2.2.	Alterações típicas do perfil eletroforético	12
3.2.3.	Imunoglobulinas monoclonais: estudo por imunofixação.....	14
3.3.	Estudo das proteínas urinárias.....	16
3.4.	Determinação da IgE específica	17
3.5.	Pesquisa e caracterização de crioglobulinas	19
3.6.	Estudo de proteínas do complemento.....	21
4.	O SETOR DE HEMATOLOGIA.....	24
4.1.	Equipamentos e técnicas associadas	24
4.2.	Hemograma.....	29
4.2.1.	Parâmetros eritrocitários	30
4.2.2.	Anemias.....	31
4.2.3.	Alterações na contagem diferencial de leucócitos	33
4.3.	Citologia.....	34
4.4.	Velocidade de sedimentação	38
4.5.	Hemóstase.....	38
4.5.1.	Testes de <i>screening</i> de coagulação	40
4.5.2.	Testes de coagulação específicos.....	41
5.	O SETOR DE BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	44
5.1.	Determinação automatizada da maioria dos parâmetros bioquímicos.....	44
5.2.	Determinação da hemoglobina glicada.....	45
5.3.	Análise sumária de urina	45
6.	O SETOR DE MICROBIOLOGIA	48
6.1.	Os diversos produtos biológicos e o seu processamento	48
6.2.	Identificação de Microrganismos	51
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ABREVIATURAS

AAG – α_1 -Glicoproteína ácida (<i>α_1-Acid glycoprotein</i>)	HG – Hospital dos Covões
ACP – Fosfatase ácida (<i>Acid phosphatase</i>)	HP – Hospital Pediátrico
ALP – Fosfatase alcalina (<i>Alkaline phosphatase</i>)	HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
ALT – Alanina aminotransferase	Ig – Imunogloblina
ApoA – Apolipoproteína A	Igs – Imunoglobulinas
ApoB – Apolipoproteína B	INR – Razão internacional normalizada (<i>international normalized ratio</i>)
ApoE – Apolipoproteína E	LCR – Líquido cefalorraquídeo
aPTT – Tempo de tromboplastina parcial activada (<i>activated partial thromboplastin time</i>)	LDH – Lactato desidrogenase
AST – Aspartato aminotransferase	LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (<i>Low density lipoproteins</i>)
BH – Caldo de <i>Brain-Heart</i>	Lipo (a) – Lipoproteína a
CH50 – Complemento total	MAC – Complexo de ataque membranar
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média	MALDI-TOF – <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	NRBC – Eritroblastos (<i>Nucleated Red Blood Cells</i>)
CK – Creatina Cinase	PCR – Proteína C-reactiva
CK-MB – Creatina cinase-MB	Pct – Trombócrito
CM – Caldo de <i>cooked-meat</i>	PT – Tempo de protrombina (<i>Protrombin time</i>)
ESP – Esfregaço de sangue periférico	PVX – <i>PolyVitex</i>
FEIA – Ensaio imunofluoro-enzimático (<i>fluoro-immuno-enzymatic assay</i>)	RBC – Eritrócitos (<i>Red Blood Cells</i>)
FR – Factor Reumatóide	RBP – Proteína ligadora do retinol (<i>Retinol binding protein</i>)
GGT – Gamaglutamil transferase	SMD – Síndrome Mielodisplásico
GS – Gelose de sangue	SPC – Serviço de Patologia Clínica
Hb – Hemoglobina	VCM – Volume corpuscular médio
HbA _{1c} – Hemoglobina glicada A _{1c}	VPM – Volume plaquetar médio
HCM – Hemoglobina corpuscular média	VSE – Velocidade de sedimentação eritrocitária
Hct – Hematócrito	WBC – Leucócitos (<i>White Blood Cells</i>)
HDL – Lipoproteínas de elevada densidade (<i>High density lipoproteins</i>)	

RESUMO

Os laboratórios de análises clínicas fornecem um excelente apoio ao diagnóstico clínico ajudando na caracterização de patologias e a acompanhar o estado de saúde dos doentes.

Este relatório é fruto do trabalho desenvolvido entre os meses de janeiro e julho de 2016 no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no âmbito do estágio curricular integrado no plano de estudos do mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Nele será apresentado o laboratório no seu todo, bem como a sua organização por setores de trabalho. O trabalho realizado nos setores de Imunologia e de Hematologia será apresentado com mais detalhe, pois estes correspondem às duas áreas de trabalho exigidas, seleccionadas por mim. Relativamente ao trabalho desenvolvido nos setores de Bioquímica e de Microbiologia será apresentado apenas um breve resumo, embora o estágio tenha sido igualmente distribuído pelas diferentes áreas de trabalho.

ABSTRACT

Clinical laboratories provide excellent support for medical diagnosis, in characterization of pathologies and monitoring the patient. This report is the result of my curricular internship between January and July of 2016 in the Clinical Pathology Department of the *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*, in the framework of the master degree program in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. It will be described the laboratory as a whole, as well as it's organization by sectors and work areas. The work done in Immunology and Haematology sectors will be reported with more detail, as the two required work areas, and only a brief summary of the work done in Biochemistry and Microbiology sectors will be included.

I. INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2014 foram prestados, nos hospitais do Sistema Nacional de Saúde, mais de 82 milhões de atos de análise clínicas (1). Para dar resposta a estas solicitações tem de existir uma boa gestão dos laboratórios, passando não só pelas pessoas que nele trabalham, como pelos recursos existentes (infraestruturas, equipamentos).

O laboratório de análises clínicas constitui pois um mundo vasto de técnicas, metodologias, parâmetros químicos e celulares, equipamentos diversos, material básico de laboratório e essencialmente doentes e pessoal técnico especializado, sem o qual esta gigante “fábrica” não poderia funcionar.

O estágio no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) teve a duração aproximada de sete meses (de janeiro a julho de 2016) tendo sido o tempo igualmente distribuído pelos diferentes laboratórios, nomeadamente Bioquímica, Urgência e Hormonologia, Imunologia e Autoimunidade, Hematologia e finalmente Microbiologia e Serologia.

Esta experiência em ambiente hospitalar foi fundamental para pôr à prova todos os conhecimentos adquiridos ao longo destes dois anos de mestrado, bem como aprender e executar técnicas e metodologias aprendidas.

O contacto direto com a doença, com tarefas diárias de um laboratório, a necessidade de executar e validar as análises em tempo útil, para dar resposta a uma determinada suspeita de diagnóstico ou tratamento é um desafio diário que dá ainda mais motivação para continuar a trabalhar e a aprender.

Ao longo destes sete meses, as áreas de Imunologia e Hematologia foram as que mais prenderam a minha atenção pelo que serão elas que irei desenvolver neste relatório.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Serviço de Patologia Clínica do CHUC localiza-se no Edifício São Jerónimo, nas proximidades do CHUC e tem como diretor o Dr. Fernando Rodrigues.

Este serviço engloba vários laboratórios e está dividido em vários setores, de modo a facilitar a organização do trabalho e das amostras, mas também a rentabilizar o espaço existente. Esses setores são: Imunologia, Autoimunidade, Serologia e Tratamento de Urinas, Bioquímica de Rotina e Bioquímica de Urgência, Hematologia, Hormonologia (todos situados no “Core”), Coagulação Especial, Microbiologia, Parasitologia e Micologia e, ainda, Tuberculose. Existe também a área de receção de amostras biológicas bem como infraestruturas de apoio, nomeadamente salas de validação de resultados (normalmente junto ao respetivo setor), salas de microscópios (para os setores de hematologia, imunologia e microbiologia), salas de lavagem e salas de saída de material limpo, salas de stock (reagentes, calibradores e controlos) e de armazenamento de amostras e, ainda, a biblioteca, a sala de reuniões e diversas salas de tarefas administrativas e de direção.

Da equipa presente diariamente a trabalhar no SPC incluem-se médicos, técnicos superiores de saúde, técnicos de análises clínicas, técnicos administrativos e auxiliares.

A sala de colheitas encontra-se aberta diariamente das 8 às 15 horas e 30 minutos, recebendo cerca de 500 utentes por dia. Existe um sistema de receção de doentes, organizado por prioridades de acordo com a seguinte ordem: transplantados e diabéticos, doentes em macas e em cadeiras de rodas, crianças e grávidas, doentes com consulta de hematologia e de oncologia, atendimento geral e para entrega de produtos biológicos de modo a uma melhor gestão de recursos e tempos de espera. Há 12 postos de colheitas de sangue e outros produtos (urina, fezes, expectorações). Os tubos de amostras são identificados com códigos de barras. A identificação inclui o número da amostra, antecedido de uma inicial que identifica o setor a que se destina (UQ – Bioquímica, Z – Urgência, G – Imunologia, N – Autoimunidade, L – Hormonologia, EU – Serologia, H – Hematologia e M, J, C e O – Microbiologia).

As amostras são colhidas em diferentes tubos consoante o pedido. Para as análises hematológicas são usados tubos com EDTA como anticoagulante e para a obtenção de plasma são usados tubos com citrato de sódio. As amostras de soro são colhidas para tubos sem anticoagulante e com partículas ativadoras de coagulação e gel separador. O soro é obtido após centrifugação a 1800 g durante 10 minutos. As amostras de soro são usadas nas análises efetuadas nos Setores de Imunologia, Autoimunidade, Bioquímica, Serologia e

Hormonologia. No Setor da Urgência são usadas amostras de plasma, obtidas de sangue colhido para tubos com heparina de lítio como anticoagulante.

Ao balcão da recepção de amostras chegam produtos das salas de colheitas, das enfermarias, do banco de urgência, do Hospital Pediátrico (HP), do Hospital dos Covões (HG) e Maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos. São recebidas pelos administrativos e integradas no sistema informático, já que é fundamental saber quando chegaram as amostras, qual a sua proveniência e quais os procedimentos analíticos requeridos.

A partir deste ponto, são distribuídas pelos setores sendo separadas para as respectivas salas. Esta separação é também auxiliada pelos equipamentos *AutoMate2500 Sample Processing Systems* e *OLA2500*, ambos da Beckman Coulter que separam os tubos consoante o setor de destino, em diferentes *racks*, cabendo ao utilizador ir recolher os suportes. Estes equipamentos fazem também alíquotas de acordo com o estipulado em cada setor.

O SPC está informatizado com o sistema de gestão *Cinidata®XXI, MaxData*, que permite a integração de todos os pedidos de análises bem como alguma informação clínica (segundo o critério do médico requisitante), o historial analítico dos doentes, permitindo a interligação de todos os setores, a organização e produção de listas de trabalho e a validação de resultados. Existe ainda o sistema de gestão *Hemagest*, integrado com a *Clinidata®XXI* aplicado ao Setor de Hematologia. Este serviço e o serviço de Urgência funcionam 24 horas por dia, e a partir das 16 horas asseguram também o tratamento de produtos biológicos para estudo microbiológico.

3. O SETOR DE IMUNOLOGIA

A imunologia é o estudo da imunidade, isto é dos acontecimentos celulares e moleculares que ocorrem depois do organismo ser exposto a microrganismos ou a moléculas estranhas, conferindo proteção ao organismo (2).

O sistema imunológico humano é composto por múltiplos sistemas de defesa, que atuam em simultâneo para proteger o organismo. Do sistema imunitário fazem parte as barreiras físicas, tais como a pele e o pH extremamente ácido do estômago, o sistema imune inato que engloba as células (macrófagos e neutrófilos) e o sistema do complemento e o sistema imune adquirido que é o mais específico e eficaz, causando a ativação dos linfócitos T e B e a produção de anticorpos (2).

As defesas específicas do sistema imunitário adquirido são produzidas após uma exposição prévia a determinados antígenos, moléculas que estimulam a produção de anticorpos (ou Igs) específicos pelos linfócitos (3).

O sistema do complemento é uma parte essencial do sistema imune inato e constitui uma defesa de primeira linha contra organismos invasores e componentes próprios anormais que podem causar doença (4). É ativado pela ligação de anticorpos a antígenos com o fim de levar à destruição de microrganismos reconhecidos por anticorpos (3). A ativação deste sistema desencadeia, pois, uma resposta inflamatória potente e tem como efeitos principais a opsonização e a inflamação (4).

3.1. Equipamentos e princípios de metodologia utilizados

Neste setor são estudados tanto os mecanismos do sistema imunológico inato como do adquirido. As amostras aqui processadas podem ser quer de soro ou plasma heparinizado, quer líquido cefalorraquídeo (LCR), urina de 24 horas ou fezes.

No setor de imunologia existe um equipamento *BN ProSpect*, da Siemens e dois equipamentos *BN II*, também da Siemens cujo princípio do método é a nefelometria, para as determinações de rotina, baseadas em reacções antígeno-anticorpo, descritas na tabela I. Um dos equipamentos *BN II* é destinado a determinações realizadas semanalmente, já que, pelo reduzido número de pedidos não é eficiente nem rentável fazer estas determinações diariamente.

A nefelometria é uma metodologia muito utilizada na quantificação das reações de precipitação de antígeno-anticorpo em suspensões muito diluídas. Baseia-se na medida da luz dispersa pelos imunocomplexos quando um feixe de luz passa através da amostra (5,6).

São usadas partículas de polistireno revestidas com anticorpos específicos para cada analito a determinar, que quando em contacto com o analito presente na amostra de soro do doente vão agregar-se. Estes agregados vão depois causar a dispersão do raio de luz incidente na amostra, sendo a intensidade da luz dispersa, detetada num ângulo de 90° , em relação à luz incidente (Figura 1), proporcional à concentração do imunocomplexos formado e, conseqüentemente, da proteína em análise na amostra. O resultado é avaliado em comparação a um padrão de concentrações conhecidas (6).

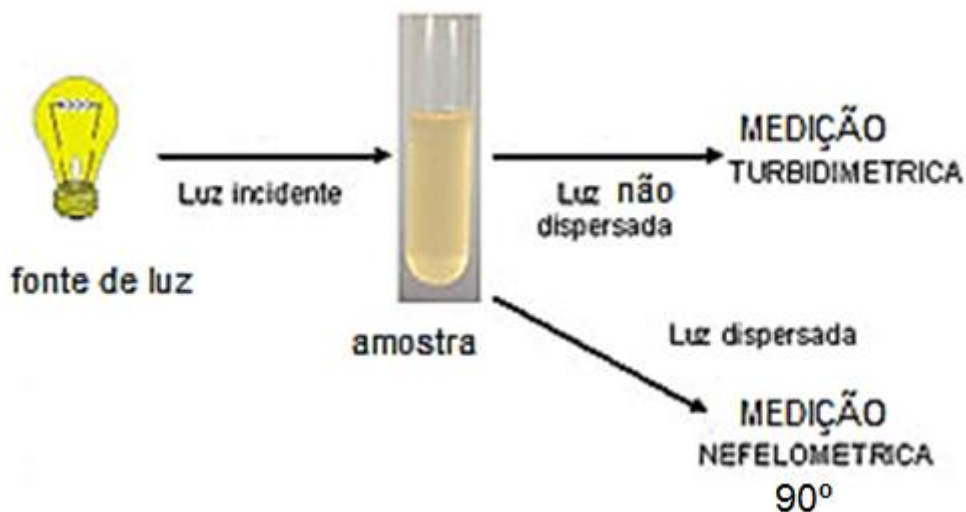


Figura 1 – Representação esquemática da instrumentação de nefelometria e de turbidimetria. A nefelometria mede a luz dispersa pelos imunocomplexos em suspensão na amostra, que causam a dispersão do raio de luz incidente, que é detetada num ângulo de 90° relativamente à luz incidente.

(Adaptado de http://l.bp.blogspot.com/_cSKO4Ryg4w/TZgalgIK4GI/AAAAAAAAAKE/sLrnioEOzp8/s1600/turbidimetria.jpg 05/09/2016).

Para além dos nefelómetros, neste setor, existem ainda três sistemas *Hydrasys*, da Sebia, para a realização de eletroforese de proteínas e imunofixação em gel de agarose. A eletroforese é uma técnica de separação de proteínas, baseada na sua migração, de acordo com as suas características (peso molecular, carga elétrica ou ponto isoelétrico) sob ação de um campo elétrico, do polo negativo para o polo positivo (Figura 2). A eletroforese é realizada em géis de polímeros, que apresentam ligações cruzadas e que agem como “peneiras” permitindo a migração das proteínas de acordo com a razão carga/massa (7).

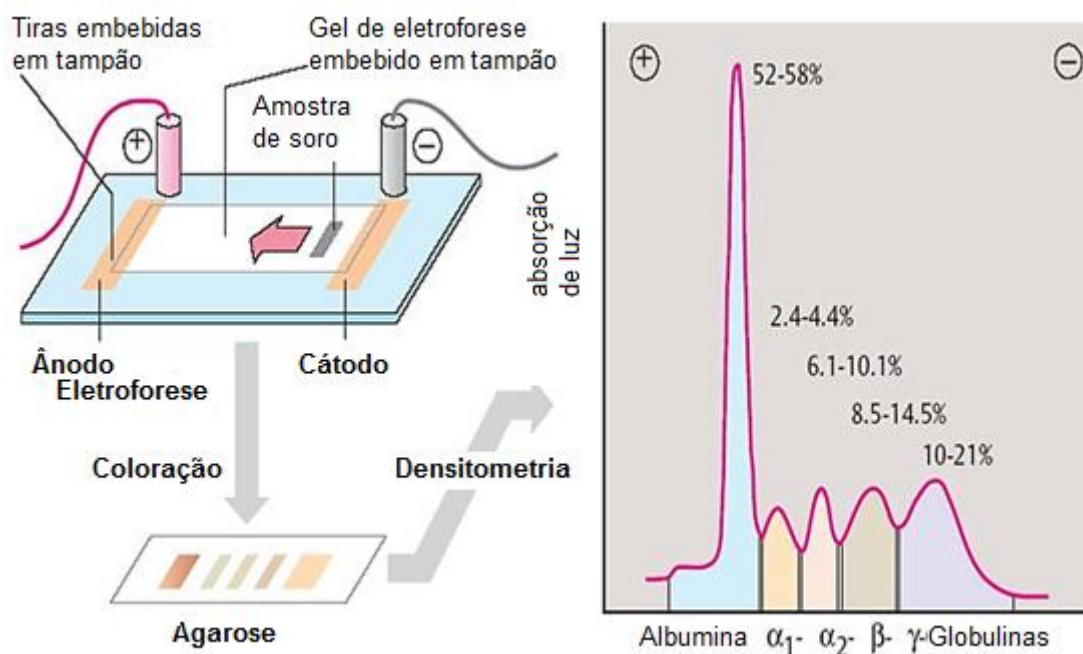


Figura 2 – Esquema da execução do proteinograma e respectivo resultado eletroforético.
 (Adaptado de http://images.slideplayer.com.br/1/47293/slides/slide_12.jpg, em 27/07/2016).

O *ImmunoCap250, Phadia* é outro equipamento usado para a determinação de IgE específica, IgE total, IgA específica e outras determinações, sendo principalmente usada, no SPC para a quantificação de IgE específica. Usa metodologia FEIA (ensaio imunofluoro-enzimático) em sandwich, que se baseia na ligação de antígenos a anticorpos específicos (Figura 3). Os alérgenos, disponíveis comercialmente, estão fixados numa fase sólida e irão reagir de forma específica com os anticorpos (IgE) presentes na amostra do doente, mesmo que estejam em baixa concentração, formando um complexo antígeno-anticorpo. O complexo anterior é depois detetado usando anticorpos secundários anti-IgE, marcados com uma enzima, formando um imunocomplexo. Os anticorpos anti-IgE não ligados são eliminados numa lavagem. A adição do substrato desta enzima faz com que seja emitida fluorescência, que é detetada e proporcional à concentração de IgE ligada ao alérgeno (8).

A tabela I resume as metodologias e equipamentos disponíveis neste setor.

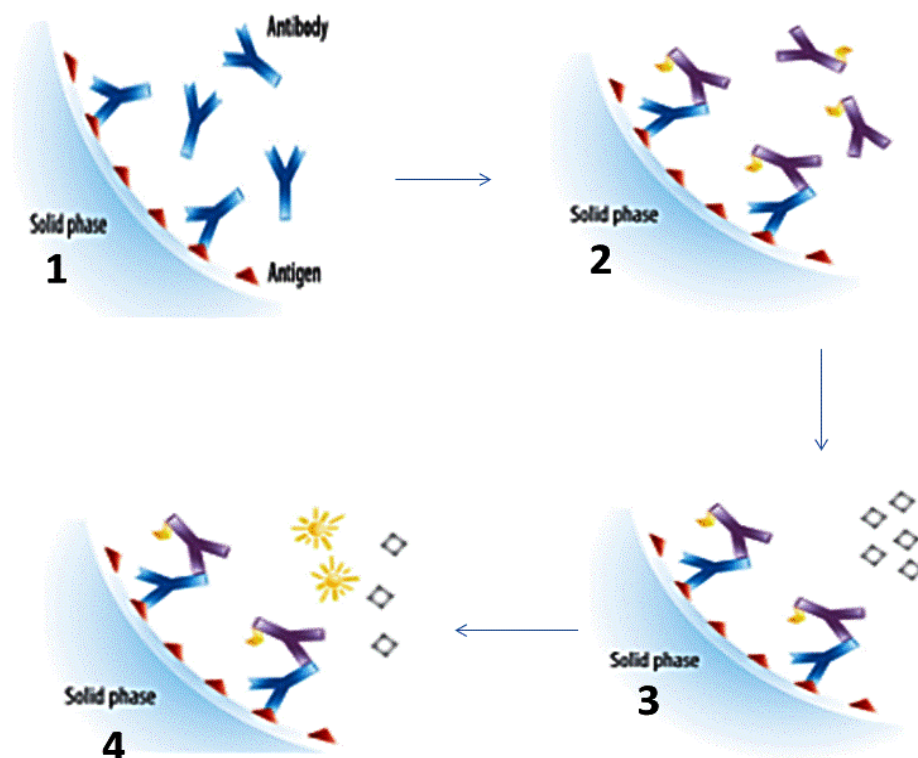


Figura 3 – Imagem ilustrativa da técnica de FEIA usada no equipamento *ImmunoCap250*, *ThermoFisher*. Os alérgenos reagem de forma específica com os anticorpos (IgE) presentes na amostra do doente (1), formando um complexo antígeno-anticorpo. O complexo formado é detectado usando anticorpos anti-IgE, marcados com uma enzima (2). A adição do substrato desta enzima (3), faz com que seja emitida fluorescência (4). (<http://www.phadia.com/en-GB/5/Autoimmunity-Tests/Test-Principle-ImmunoCAP-Specific-IgA/>, 23/07/2016).

Tabela I – Tabela resumo dos equipamentos usados no setor de imunologia, bem como a metodologia usada e as determinações que são realizadas em cada equipamento.

Equipamentos	Metodologia	Parâmetros Analíticos (amostras)
BN ProSpect, Siemens	Nefelometria	C ₃ e C ₄ , FR, ASO, ceruloplasmina, α_1 -antitripsina, transferrina (soro/plasma, diariamente), Apo A, Apo B, haptoglobina, pré-albumina, RBP, α_1 -glicoproteína ácida (AAG), α_2 -macroglobulina, receptor solúvel de transferrina, Lipo (a), properdina fator B, Apo E, cadeias leves κ e λ livres, C ₁ Q e C ₁ I, subclasses de IgG e de IgA, cistatina C, IgD (soro/plasma semanalmente).
BN II, Siemens	Nefelometria	IgG, IgM, IgA, IgE (soro/plasma), β_2 -microglobulina (soro/plasma e urina), albumina (soro e LCR), IgG (LCR) e cadeias leves λ e κ (soro e urina).
Hydrasys, Sebia	Eletroforese	Proteínas séricas e urinárias, Ig e cadeias leves (soro e urina).
ImmunoCap250, Phadia	FEIA	IgE específica, IgE total, IgA específica (soro).

3.2. Estudo eletroforético das proteínas séricas

3.2.1. As proteínas séricas e a sua análise por eletroforese de zona

A análise eletroforética das proteínas, o proteinograma, é amplamente usada para o estudo das proteínas séricas dando importantes informações acerca da sua síntese e da sua eliminação sendo usada para o diagnóstico e monitorização de inflamações agudas e crónicas, síndromes de perda de proteína e de gamopatias monoclonais (9).

O proteinograma dá informações que correspondem a uma gama de proteínas que migram numa mesma banda, assim, a informação relativa a uma proteína específica pode ser mascarada por um aumento paralelo de outras proteínas que partilhem a mesma zona de migração (10).

O procedimento para a determinação do proteinograma sérico é semi-automático, sendo apenas necessário que se processem passos intermédios, tais como a preparação prévia das amostras, a pipetagem das amostras para os aplicadores, a colocação do gel no suporte e a sua colocação, depois da migração, no compartimento de coloração.

O kit utilizado é o *Hydragel 30 Protein (E)* da Sebia. As proteínas são separadas por electroforese em gel de agarose por ação de um campo elétrico, de acordo com a sua densidade de carga a um pH alcalino (aproximadamente 9) e a massa molecular, em cinco frações principais: albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas (Figura 4) (9).

Os géis do kit estão prontos a usar, sendo apenas necessário absorver o excesso de tampão à sua superfície com um papel de filtro, tendo cuidado para não desidratar o gel em demasia. O gel é depois colocado no suporte, sendo importante adicionar umas gotas de água na pista de migração para garantir a correta adesão do gel. Como as proteínas têm carga negativa a pH 9, a sua migração é feita do polo negativo para o polo positivo e ocorre a voltagem constante (10 W) por 10 minutos até se atingirem 60 V, continuando por mais 15 minutos. No final da migração são removidos os aplicadores de amostras e o gel é colocado na cuba de coloração com negro de amido. Após a coloração das proteínas, é digitalizado e as concentrações de cada fracção são determinadas, por densitometria, sendo gerado um gráfico que mostra a intensidade relativa das bandas (Figura 2).

3.2.1.1. Pré-albumina

Esta banda raramente é identificada no proteinograma por ser muito difusa e é constituída pela proteína ligadora do retinol e pela transterritina que nos dá importantes informações acerca do estado nutricional e do estado da tiróide (11).

3.2.1.2. Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no soro e tem cerca de 66 kDa. É sintetizada maioritariamente pelas células hepáticas, sendo a sua principal função a manutenção da pressão osmótica no espaço intravasculares, o transporte no plasma de ácidos gordos livres, fosfolípidos, iões, aminoácidos, fármacos, hormonas e bilirrubina (6).

O seu principal interesse clínico está relacionado com as patologias hepáticas (tal como a cirrose) e as nefropatias (por exemplo a síndrome nefrótica), estando a sua concentração diminuída em ambos os casos devido à diminuição, respetivamente, da sua produção e do aumento da excreção. Poderá estar aumentada em situações de desidratação (11).

3.2.1.3. α 1-Globulinas

A banda das α_1 -globulinas é composta pelas proteínas α_1 -antitripsina, α_1 -glicoproteína ácida e α_1 -fetoproteína, sendo que podem existir ainda outras, embora em menor percentagem (6).

O conjunto destas proteínas costuma estar aumentado em processos inflamatórios agudos, sendo por isso consideradas proteínas de fase aguda positiva. O aumento ou diminuição isolada de cada uma destas proteínas é difícil de interpretar devido à presença conjunta destas proteínas.

3.2.1.4. α 2-Globulinas

Para esta fração contribuem a α_2 -macroglobulina (que é um inibidor enzimático geral), a haptoglobina (que liga a hemoglobina em processos de anemia hemolítica) e a ceruloplasmina

(que atua como ligadora dos íons cobre. São também proteínas de fase aguda positiva (6, 11), ou seja, as suas concentrações estão aumentadas nos processos inflamatórios agudos, tendo assim um papel protetor (12).

3.2.1.5. β -Globulinas

Esta banda é composta maioritariamente pela β_2 -microglobulina, a transferrina e as proteínas do complemento C_3 e C_4 (11).

A β_2 -microglobulina é uma proteína encontrada na superfície das células nucleadas e encontra-se aumentada em situações de falência renal, inflamação e neoplasmas associados a linfócitos B (6).

A transferrina é o principal transportador de ferro no plasma e revela-se muito útil na caracterização das anemias, já que em anemias por deficiência de ferro a concentração desta proteína se encontra aumentada, enquanto que nos casos de anemia por deficiência da incorporação de ferro nos glóbulos vermelhos, a sua concentração está normal ou diminuída (6). A transferrina está diminuída geralmente em situações de síndrome nefrótica ou de doença hepática (11).

As proteínas do complemento C_3 e C_4 são proteínas de fase aguda positivas e encontram-se aumentadas em situações de obstrução biliar (6), sendo que estão diminuídas nas situações de Lúpus Eritematoso Sistémico (11).

Nesta fração é muito comum haver a interferência da hemoglobina, no caso em que o soro se encontre hemolizado, ou de fibrinogénio se o plasma for utilizado para realizar o proteinograma (11).

3.2.1.6. γ -Globulinas

A banda das γ -globulinas é constituída maioritariamente pelas Igs, ou seja, pelos anticorpos, que são capazes de reconhecer antígenos e de iniciar mecanismos para a sua destruição (6).

Existem cinco classes de Igs circulantes no plasma, que são a IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. A IgG é a mais abundante em circulação, estando a sua produção aumentada após a imunização pois

é secretada durante a resposta secundária. A IgM funciona principalmente como recetor de antigénios na superfície dos linfócitos durante a imunização sendo portanto secretada durante a resposta primária. A IgA é a principal Ig encontrada nas mucosas e secreções, tais como a saliva, o leite e fluidos intestinais. A IgE é responsável pelos sinais e sintomas alérgicos, já que estimula a desgranulação dos basófilos e mastócitos. Finalmente a IgD, existe apenas na forma membranar, sem outra função conhecida (2,3).

3.2.2. Alterações típicas do perfil eletroforético

3.2.2.1. Perfil de Cirrose Hepática

A cirrose hepática é caracterizada por uma fibrose difusa, com regeneração nodular representando um estágio de cicatrização e regeneração de um dano hepático crónico (6).

Nesta situação, as anomalias geralmente encontradas nos parâmetros laboratoriais são a diminuição do número de plaquetas, o aumento do tempo de protrombina, a diminuição da razão albumina/globulinas para um valor <1 e um aumento do quociente das atividades aspartato aminotransferase (AST) /alanina aminotransferase (ALT) para um valor >1 (6).

A diminuição da razão albumina/globulinas deve-se à diminuição da síntese hepática das proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, mas também ao aumento das Igs provocado por uma diminuição da sua degradação e um aumento da sua produção (11) já que existe uma hiperatividade do sistema reticuloendotelial, especificamente das células plasmáticas.

3.2.2.2. Perfil da Síndrome Nefrótica

A síndrome nefrótica é caracterizada por uma alteração na permeabilidade glomerular, sendo o seu diagnóstico caracterizado por proteinúria ($>1,5$ g/dia) bem como hipoalbuminémia (12).

Assim, a proteinúria é uma consequência da alteração da permeabilidade glomerular e da consequente perda de proteínas na urina, provocando hipoalbuminémia (6,11). Verifica-se

ainda uma retenção de proteínas de elevada massa molecular, tais como a α_2 -macroglobulina, com aumento da respetiva fração no soro.

3.2.2.3. Perfil de Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo é uma doença caracterizada por uma proliferação maligna de células plasmáticas da linhagem B na medula óssea (12). É frequentemente associado a imunoglobulinas monoclonais, que podem ser identificadas no soro ou na urina, sendo as mais comuns a IgG κ ou IgG λ (13). Em geral, surgem associados a danos em tecidos e nos ossos reflectidos em hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osteolíticas (14) (Figura 6).

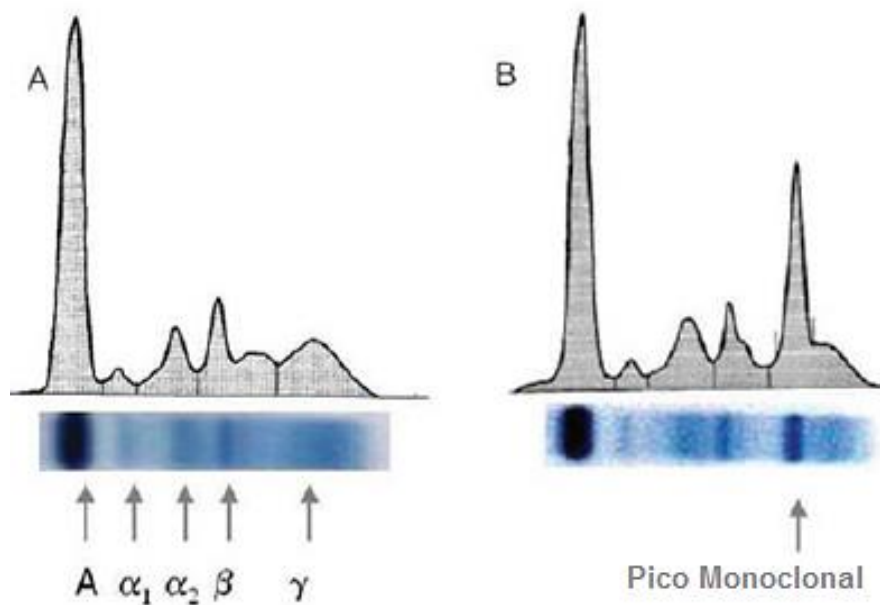


Figura 5 – Perfil electroforético das proteínas séricas numa situação normal (**A**) e no mieloma múltiplo (**B**), onde é visível o pico monoclonal característico desta patologia (15).

A eletroforese de proteínas no soro ou na urina e a imunofixação são as técnicas mais usadas em laboratório para a deteção e identificação das proteínas monoclonais (13,16).

3.2.3. Imunoglobulinas monoclonais: estudo por imunofixação

As Igs são constituídas por duas cadeias de pequeno tamanho (cadeias leves) e duas cadeias de maior tamanho (cadeias pesadas), ambas compostas por regiões constantes e regiões variáveis. É nestas últimas que se dá a ligação antígeno-anticorpo. Existem cinco tipos de cadeias pesadas, que definem a classe de Ig formada: as cadeias γ , da IgG, as cadeias μ , da IgM, as cadeias α , da IgA, as cadeias ϵ , da IgE e finalmente as cadeias δ são da IgD (Figura 5). Por outro lado, existem apenas dois tipos de cadeias leves, as κ e as λ , cada uma com cerca de 220 aminoácidos, sendo que cada anticorpo apenas possui um tipo destas cadeias e nunca os dois (14).

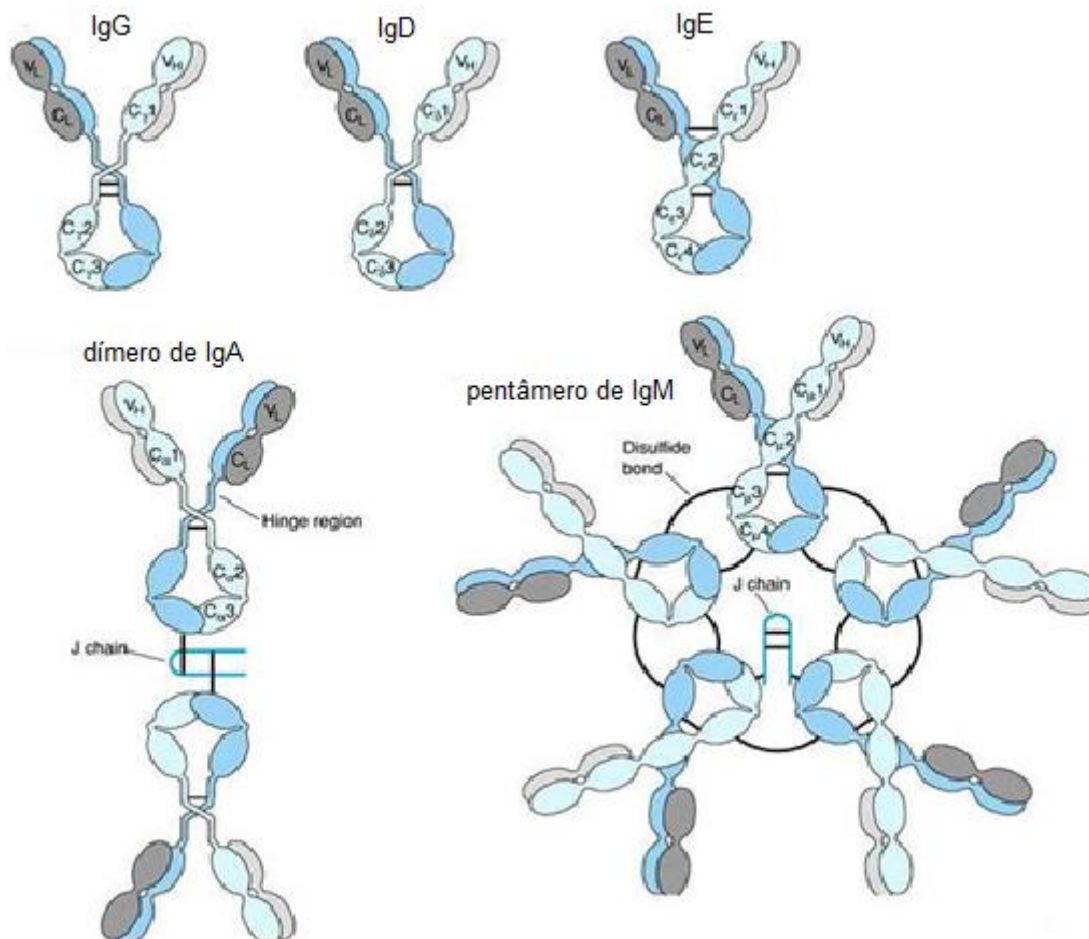


Figura 6 – As cinco classes das imunoglobulinas presentes no soro humano visualizando esquematicamente as cadeias pesadas e leves. (<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABeRoAF/anticorpos-suas-funcoes-efetoras>, em 25/07/2016).

Apesar da banda γ -globulinas ser formada por todas as classes de Ig, a maior percentagem desta representa as classes de IgA, IgM e IgG. O aumento desta banda pode ser policlonal, isto é, uma mistura de Ig encontra-se elevada, logo a respetiva curva no perfil eletroforético será simétrica e pode dever-se a uma resposta humoral a diversos microorganismos ou agentes estranhos ao organismo (11).

No entanto, um aumento monoclonal desta fracção, que se expressa sob a forma de uma banda estreita e elevada, tem um significado muito diferente, deve-se a uma proliferação maligna ou benigna de um clone de células plasmáticas que produz apenas um tipo de Ig em elevada concentração (6). Estes picos monoclonais podem dever-se a diferentes patologias, das quais se falará mais à frente neste relatório.

A presença de picos monoclonais ou biclonais na fracção das β -globulinas e γ -globulinas é um indício da presença de uma proteína monoclonal e, como tal, de uma gamapatia monoclonal. Assim, quando tal ocorre, é realizada uma imunofixação, com o fim de caracterizar o componente monoclonal, sendo usado neste setor o *kit Hydragel 4 IF*, da Sebia.

A imunofixação consiste essencialmente em quatro passos: no primeiro, faz-se uma eletroforese em gel de agarose para separar as proteínas; no segundo, as proteínas são precipitadas com antissoros específicos para cada Ig, que se difundem no gel; segue-se a lavagem do gel para eliminar todos os anticorpos que poderão não se ter ligado às proteínas, evitando assim erros de falsos positivos; finalmente o gel é corado com violeta ácido.

A amostra é colocada em seis posições, sendo que, uma delas serve como referência do perfil eletroforético das proteínas da amostra, sendo as restantes cinco posições usadas para identificar o componente monoclonal. Os antissoros usados são normalmente anti-cadeias pesadas γ (IgG), anti-cadeias pesadas α (IgA), anti-cadeias pesadas μ (IgM), anti-cadeias leves κ e anti-cadeias leves λ . Se o componente monoclonal não estiver associado a nenhuma destas proteínas, é feita uma nova imunofixação (dita “especial”) onde se vão usar antissoros anti-cadeias pesadas δ (IgD), anti-cadeias pesadas ε (IgE), anti-cadeias leves livres κ e anti-cadeias leves livres λ , que são mais raramente associadas a gamapatias monoclonais.

3.3. Estudo das proteínas urinárias

A urina de 24 horas é frequentemente usada para doseamentos de rotina, nomeadamente, de β_2 -microglobulina, de cadeias leves λ e κ e também para fazer a análise eletroforética de proteínas. É colhida rejeitando a primeira urina da manhã e a partir dessa hora colhe-se toda a urina produzida até à mesma hora do dia seguinte, para um recipiente fornecido pelo laboratório, ou na falta deste, para um recipiente limpo, guardando-o no frigorífico. Todos os doentes têm indicações da forma como a colheita deve ser feita.

A proteinúria é definida pela presença excessiva de proteínas na urina e pode ser encontrada em certos casos de doença renal, após exercício físico violento e na desidratação. A excreção normal de proteínas na urina é cerca de 150 mg em 24 horas, sendo que a maioria (50 a 60%) é albumina. Proteinúria acima de 300 mg por dia é considerada patológica (6). No SPC, a quantificação da quantidade total de proteína eliminada na urina das 24 horas e a quantificação da microalbuminúria são realizadas no Setor da Bioquímica.

Para a eletroforese de proteínas na urina usam-se kits *Hydragel 5 Proteinurie*, da Sebia, usando a amostra de urina de 24 horas sem ser centrifugada. A eletroforese é realizada com um tampão neutro, num gel de SDS-agarose que separa as proteínas urinárias de acordo com a sua massa molecular, podendo ser claramente distinguidas as proteínas de origem glomerular e as de origem tubular, sendo que as proteínas tubulares serão de menor massa molecular (<65-70 kDa) e as glomerulares de maior massa molecular (>65-70 kDa). Assim, o perfil electroforético das proteínas urinárias pode ajudar a identificar o local da lesão e a origem da proteinúria (17) (Figura 17). Após a electroforese, o gel é corado com violeta-ácido.

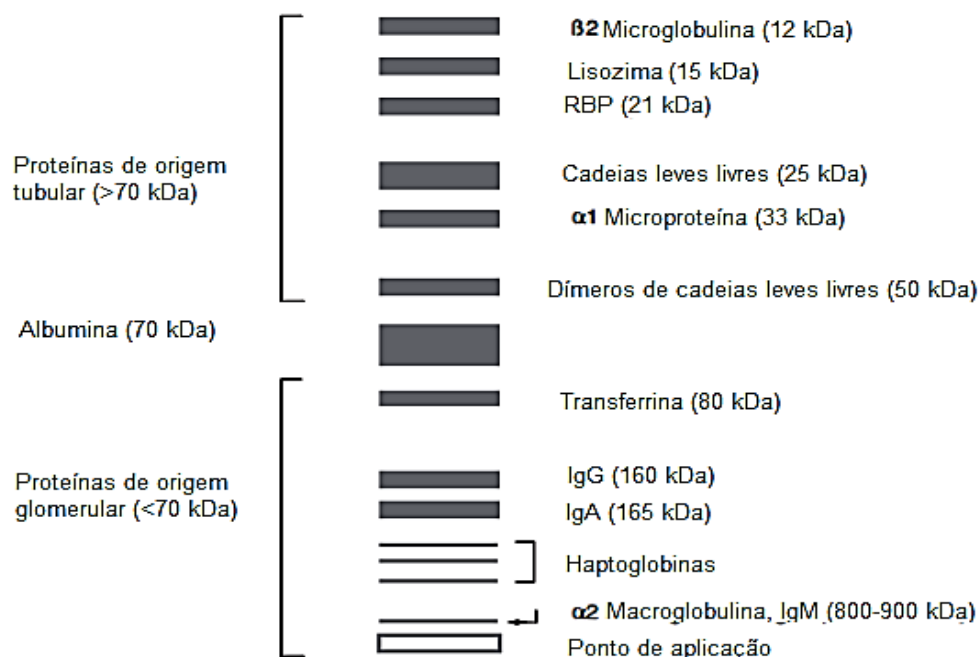


Figura 7 – Exemplo de um padrão de bandas de um proteinograma urinário com a representação das bandas das proteínas frequentemente encontradas. (Disponível em Sebia, *Hydragel 5 Proteinurie*, ref. 4115).

A lesão glomerular é mais comum em adultos e crianças, sendo a albumina, a principal proteína excretada (70%). Esta proteinúria pode estar associada a outras alterações, nomeadamente hematuria, hipertensão e síndrome nefrótica, caracterizada por proteinúria >3 g por dia, hipoalbuminémia <3 g/dL e hipoproteinémia <6 g/dL. São consideradas como proteínas marcadoras de distúrbio glomerular, a albumina, a transferrina e a IgG e a IgA, ou seja, proteínas de elevada massa molecular (17).

Por outro lado, a lesão tubular é pouco comum e normalmente moderada e transitória. Pode estar associada a outros danos, nomeadamente piúria e acidose metabólica. A α_1 -macroglobulina, a β_2 – microglobulina, a proteína ligadora de retinol e as cadeias leves livres κ e λ policlonais são consideradas marcadoras de lesão tubular (17).

3.4. Determinação da IgE específica

As alergias são reações exacerbadas que ocorrem após a exposição a um alérgeno que é uma molécula habitualmente inócua, mas que em certos indivíduos interage com o sistema imunitário levando à sua ativação e libertação de mediadores celulares (12,18).

Os principais mediadores responsáveis pelas alergias são a histamina, as prostaglandinas e os leucotrienos, que têm ações vasoativas (12) e que são libertados devido à desgranulação de mastócitos e basófilos (3).

Existem duas formas de alergia, a hipersensibilidade imediata que se desencadeia em minutos, após uma resposta anormal mediada por linfócitos B e a hipersensibilidade tardia, que se desenvolve 24 a 72 horas após exposição ao alergénio e é desencadeada por uma resposta anormal mediada por linfócitos T (3). As reações a alergénios desenvolvem portanto uma resposta de hipersensibilidade ao mesmo, sendo a IgE a principal interveniente (12).

A doença originada pela reação alérgica é sistémica, já que o contacto do alergénio com a pele e as mucosas ocorre em simultâneo em vários órgãos podendo daí resultar eczema, asma ou rinosinusite. Além disso, a corrente sanguínea transporta os mediadores celulares e células activadas, permitindo o aparecimento de sintomas devido à re-exposição ao alergénio (12).

A maioria dos alergénios já identificados são proteínas solúveis em água, com um peso molecular entre 5 – 50 kDa e glicadas, embora a glicação não afete o seu carácter alérgico (18). Os principais alergénios são os ácaros (que podem encontrar-se no pó doméstico, dispensas, armários ou celeiros), pólenes (que podem ser de árvores, ervas ou arbustos), fungos ou ainda epitélio ou secreções (fezes ou urina) de animais domésticos (cão, gato, roedores, cavalo, aves ou outros) (12). Existem ainda diversos alergénios alimentares, que são responsáveis por um aumento de sensibilização em adultos e crianças (19), que podem englobar as proteínas de origem animal, tal como ovos, marisco e leite, proteínas de origem vegetal, como por exemplo de farinhas, frutos secos, frescos e leguminosas (20) (Figura 8).

Tal como já foi referido, há uma enorme diversidade de alergénios que podem causar alergia e por isso torna-se fundamental saber quais os envolvidos nas reações alérgicas exacerbadas de cada indivíduo. Assim, faz-se a determinação da concentração de IgE que se liga a um determinado alergénio. Para a determinação desta IgE específica usam-se proteínas e glicoproteínas dos diferentes alergénios e que foram obtidas de centenas de fontes, tendo sido extraídas, purificadas, clonadas, sequenciadas e cristalizadas, estando depois disponíveis para as reações *in vitro*. São conhecidos centenas de alergénios, sendo possível determinar a existência de anticorpos IgE específicos para estas proteínas (18).

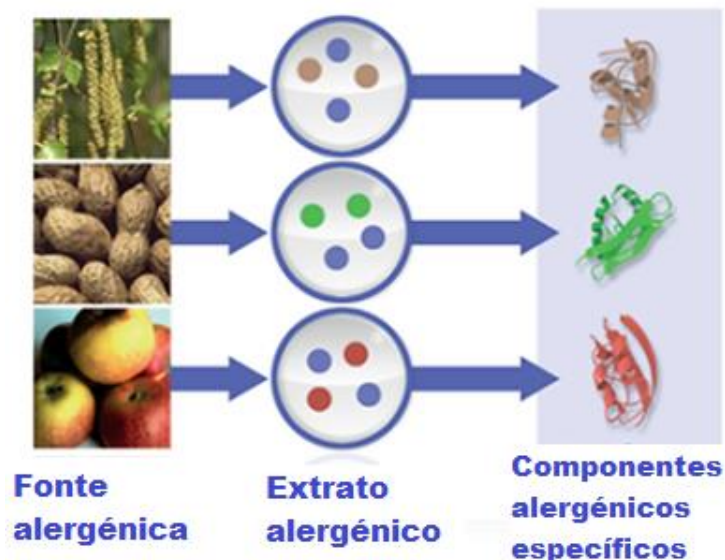


Figura 8 – Componentes alérgicos de alguns alérgenos. (Adaptado de <http://www.phadia.com/pt-PT/2/Quem-deve-fazer-analises/O-que-e-a-Alergologia-Molecular/>, em 12/07/2016).

A determinação da IgE específica é baseada na detecção e quantificação de anticorpos IgE específicos contra extratos naturais de alérgenos, que podem conter componentes alérgicos genuínos, mas também com reatividade cruzada (19). Geralmente, o pedido recebido pelo laboratório é de rastreio, usando um *kit* que contém um conjunto de alérgenos responsáveis pelas reações alérgicas mais comuns de determinada população, que é designado por *PhadiaTop*[®], da Phadia. Caso exista reatividade positiva neste conjunto os seus alérgenos são estudados isoladamente, de modo a saber especificamente qual o antigénio para o qual existem anticorpos IgE. O teste *PhadiaTop*[®] tem uma especificidade de 90% e sensibilidade de 97% (Thermo Scientific). Assim, fazem-se diferentes tipos de determinações de IgE, o despiste, usando o *PhadiaTop*[®] e a quantificação de IgE total, e a determinação de IgE específica para a fonte alérgica, importante para a sua identificação.

3.5. Pesquisa e caracterização de crioglobulinas

As crioglobulinas são Ig circulantes que precipitam de forma reversível a uma temperatura inferior a 37°C. As crioglobulinémias podem ser de três tipos, tipo I com Ig monoclonais, normalmente de classe M ou G, estando presentes em 90% dos casos de tumores malignos de células B e que corresponde a 25 a 30% dos casos de crioglobulinémias. O tipo II também designado de crioglobulinémia mista engloba um componente monoclonal (normalmente IgM) e anticorpos relativos ao componente policlonal (IgG), estando associados a 25% das crioglobulinémias e na sua maioria são idiopáticas. Finalmente, as crioglobulinémias de tipo

III, também mistas são formadas por Ig policlonais, frações do complemento e fibronectina, correspondendo a 40% das crioglobulinémias (12).

A pesquisa de crioglobulinas é muito usada para acompanhar e ajudar no diagnóstico de diversas doenças, tais como doenças linfoproliferativas e doenças inflamatórias crônicas autoimunes, infecciosas ou virais (21), entre as quais, Síndrome de Raynaud (Figura 9), Síndrome de Sicca, hepatite C crônica e artrite (9).

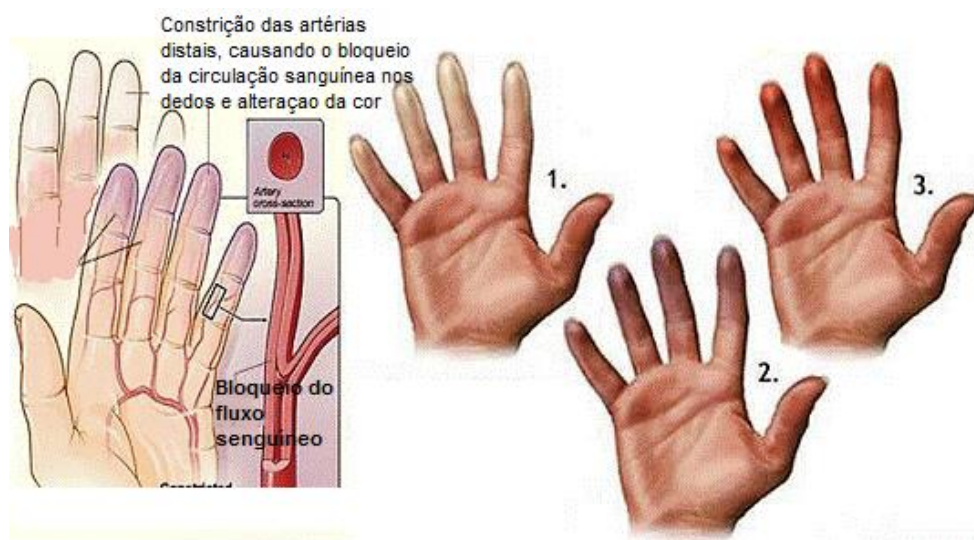


Figura 9 – Manifestação clínica do Síndrome de Raynaud.

(Adaptado de <https://questoesdefisiocomentadas.files.wordpress.com/2014/10/fenomeno-de-raynaud-sindrome-de-raynaud-e-doenca-de-raynaud.jpg> e <https://www.huidarts.com/wp-content/uploads/2015/06/Raynaud-animatie.jpg>, em 26/07/2016).

A colheita de amostras para a determinação de crioglobulinas, requer um aquecimento das seringas e tubos de colheita (são colhidos três tubos de soro) e a fase pré-analítica tem de ser realizada a 37°C, sendo as amostras mantidas num banho-maria e centrifugadas a quente a 3500 g durante 15 minutos. O soro dos 3 tubos é depois recolhido e misturado, sendo o seu volume anotado.

Esta fase a quente é muito importante já que as crioglobulinas precipitam a uma temperatura inferior a 37°C. Se antes da separação do soro for atingida uma temperatura inferior as crioglobulinas precipitam e são eliminadas juntamente com o coágulo.

Depois desta centrifugação, as amostras são colocadas no frigorífico por 7 dias, onde se vai dar a precipitação das crioglobulinas se a amostra for positiva. A partir desta altura, todo o restante procedimento é feito a frio, sendo as amostras centrifugadas a 5°C, a 3500 g por 7 minutos. O sobrenadante vai ser rejeitado e o crioprecipitado lavado 3 vezes com soro

fisiológico, também ele frio. Após esta última lavagem, adiciona-se soro fisiológico na mesma proporção do soro do paciente.

A determinação das crioglobulinas é feita por imunofixação após separação das Ig presentes no crioprecipitado por electroforese. A identificação e caracterização das Igs são feitas por imunofixação usando antissoros específicos anti-cadeias pesadas γ (IgG), μ (IgM), α (IgA) e anti-cadeias leves κ e λ , que se ligam às respetivas proteínas, podendo assim identificar uma potencial Ig monoclonal. Paralelamente, migra também uma alíquota de crioprecipitado sem antissoros, funcionando assim como um branco, para verificar se as proteínas precipitaram no ponto de aplicação das mostras e se a migração das Ig foi completa (9).

Se existirem bandas monoclonais, biclonais ou oligoclonais no gel de eletroforese, é feito o doseamento das crioglobulinas no equipamento BN II, através da medida da quantidade de imunocomplexos antígeno-anticorpo formado, por nefelometria.

3.6. Estudo de proteínas do complemento

O sistema do complemento é constituído por nove proteínas principais que se encontram no plasma na sua forma inactiva (12). Existem três vias de ativação deste sistema, a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas, que não será discutida neste relatório.

A via clássica é ativada pela ligação de anticorpos das classes G e M às membranas das células invasoras, enquanto que a via alternativa é iniciada por polissacáridos ou outras estruturas típicas dos microorganismos (3). Depois desta ativação há um recrutamento sequencial de proteínas, produzidas por macrófagos e hepatócitos que se vão associar em complexos proteicos (2).

A via clássica começa com a ligação de C_{1q} aos anticorpos, ativando o C_{1r} e promovendo a ativação da pró-enzima C_{1s} . Este ativado vai depois ativar a proteína C_4 e o componente C_2 . O complexo resultante designa-se C_3 convertase (C_{4b2b}) que vai promover a quebra de C_3 , a proteína central desta cascata. O C_{3b} vai depois ligar-se ao complexo anterior formando a C_5 convertase que cliva o C_5 . A via alternativa é independente de anticorpos e inicia-se com a quebra de C_3 , sendo que o C_{3b} vai ligar-se ao fator B, sendo depois quebrado pelo fator D, originando a C_3 convertase da via alternativa. A quebra de C_3 e a ligação do fragmento C_{3b} ao complexo anterior dá origem à C_5 convertase.

É neste ponto que a via clássica e a via alternativa convergem já que em ambas, a clivagem do C_5 inicia a fase final da cascata, formando a estrutura macromolecular de ataque membranar (MAC). Este complexo envolve ainda as proteínas C_6 e C_7 , que se ligam à membrana havendo em seguida a ligação de C_8 e C_9 . O complexo C_{5b6789} forma um poro na membrana do microorganismo permitindo a entrada de água e a sua lise (12) (Figura 10).

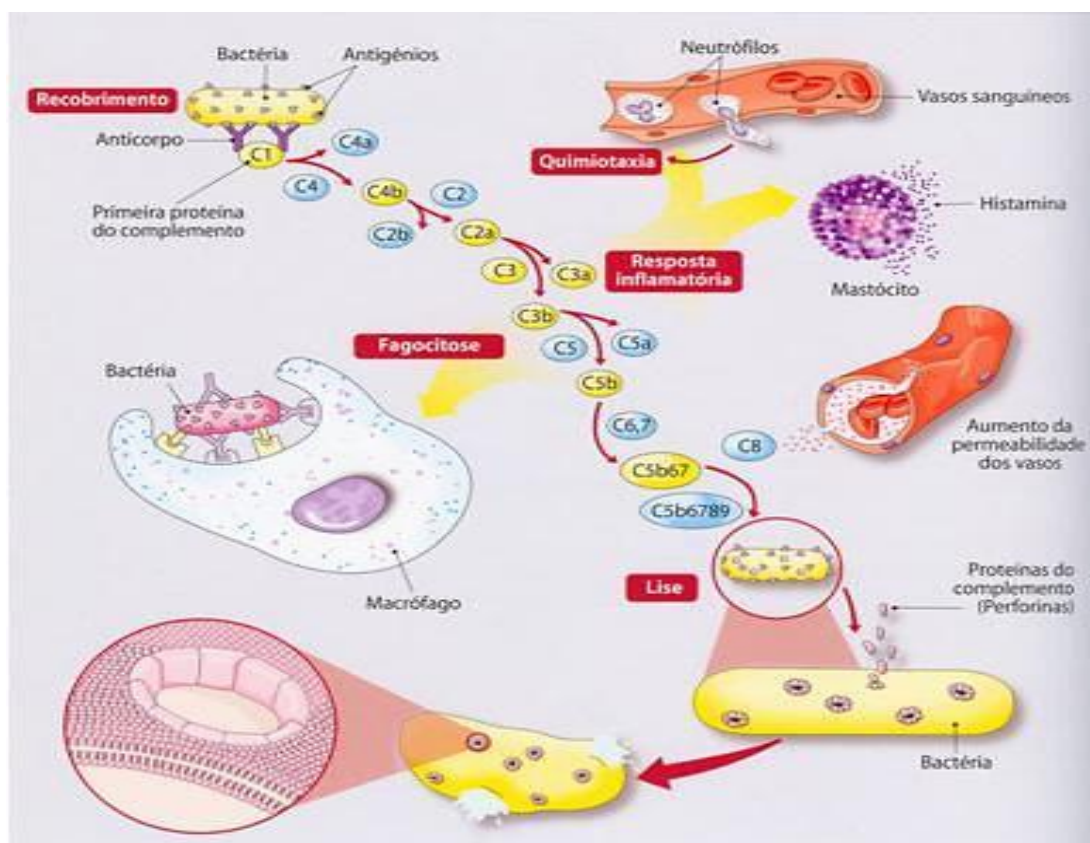


Figura 10 – Proteínas do sistema do complemento, bem como algumas das funções deste sistema, tais como, quimiotaxia, fagocitose, resposta inflamatória e lise dos microorganismos invasores. (<http://4.bp.blogspot.com/-URJbVJTWjKs/TZoaQeHthOI/AAAAAAAAAEc/MsFC2fjINAg/s1600/t>, 24/07/2016).

A análise funcional do sistema do complemento baseia-se na sua capacidade de causar a lise de glóbulos vermelhos realizando-se o ensaio do complemento total (CH_{50}) para o seu estudo. Neste teste, todos os componentes do complemento são ativadas e devido à sua labilidade, os ensaios devem ser realizados o mais rapidamente possível ou então os soros devem ser armazenados a $-25^{\circ}C$ até o ensaio ser realizado. Uma diminuição do CH_{50} pode resultar de deficiências congénitas do sistema do complemento ou de síntese insuficiente de fatores do complemento, por exemplo, devido a doenças hepáticas (4).

A quantificação de fatores do complemento individualmente também é realizada, sendo o C_3 e C_4 os mais frequentemente requeridos. A sua determinação é realizada por nefelometria

dos imunocomplexos formados após a adição de anticorpos específicos. Resultados baixos de C_3 são encontrados em 40 a 70% dos doentes com glomerulonefrite e com doença de depósitos densos e ainda com glomerulonefrite pós-infecciosa atípica. Verifica-se também uma redução significativa de C_3 em doentes com mutações no gene de C_3 (4).

As deficiências de C_4 são menos comuns e estão associadas a alterações no gene de C_4 . Estas alterações estão associadas a um risco elevado de desenvolver lúpus eritematoso sistémico, esclerodermia, nefropatia de IgA púrpura e nefropatia membranosa (4).

Properdina é o único regulador positivo da via alternativa do complemento. Níveis diminuídos de properdina são encontrados em doente com doença dos depósitos densos ou glomerulonefrite, sendo a redução maior nesta última (4).

4. O SETOR DE HEMATOLOGIA

Os componentes do sangue são os glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, plaquetas e o plasma (22). A partir da infância e na vida adulta, as células sanguíneas são formadas principalmente na medula óssea, sendo que a porção produtora de células sanguíneas vai diminuindo progressivamente até se centrar apenas no esqueleto central e nas extremidades proximais do fêmur e úmero, na vida adulta (23).

As células sanguíneas formam-se a partir de uma célula estaminal pluripotente que se vai diferenciar nas três linhas celulares principais da série mieloide (granulocítica e monocítica, eritroide e megacariocítica) e da série linfóide (12).

A diferenciação nos diferentes tipos de células (eritrócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas) depende dos fatores de crescimento diversos e de acordo com as necessidades de cada tipo de célula (12,23).

A função dos glóbulos vermelhos é transportar oxigênio e nutrientes aos diferentes órgãos, ao mesmo tempo que recolhe os metabolitos (24). Têm uma vida média de 120 dias em circulação (22).

4.1. Equipamentos e técnicas associadas

O laboratório de Hematologia é um dos mais automatizados de todo o SPC, em parte devido ao enorme fluxo de amostras diárias. As análises mais frequentemente requisitadas para este setor são o hemograma, a velocidade de sedimentação e as provas de coagulação.

Para o hemograma o sangue é colhido para um tubo contendo K_3EDTA como anticoagulante (25) sendo muito importante a homogeneização da amostra com o anticoagulante. Para o hemograma e VSE usam-se amostras de sangue total.

Nos testes de coagulação usam-se amostras de plasma sanguíneo obtido por centrifugação a 3000 r.p.m., a 22°C por 15 minutos do sangue colhido para tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante, numa proporção de 1 volume de citrato de sódio para 9 volumes de sangue (26). É muito importante respeitar a proporção anticoagulante/sangue, já que quantidades inferiores de sangue irão alterar os resultados dos tempos de coagulação. As amostras devem ser bem homogeneizadas no momento da colheita e amostras com

quantidade incorreta de sangue devem ser rejeitadas. Antes da centrifugação das amostras faz-se sempre uma verificação da existência de possíveis coágulos.

No Setor de Hematologia existem dois autoanalisadores disponíveis para a realização de hemogramas e por usarem tecnologia diferente são usados também em situações distintas. Em primeira linha usa-se o autoanalisador *UniCel DxH800*, da Beckman Coulter. O autoanalisador *Pentra DX120 + SPS*, da Horiba, apenas é usado quando se pretendem confirmar os resultados obtidos no *UniCel DxH800*, ou para a realização de esfregaços de sangue periférico e sua coloração.

Para a contagem das células sanguíneas, ambos os equipamentos usam o princípio de Coulter ou da impedância eléctrica (Figura 11). O princípio de Coulter executa a contagem celular com base em alterações na corrente eléctrica produzida pelas células sanguíneas (não condutoras), numa solução salina (27).

Neste método, uma amostra de sangue é diluída numa solução salina e as células são obrigadas a passar por um orifício uma a uma, originando um pulso eléctrico. É colocado um eléctrodo de cada lado do orifício passando continuamente corrente eléctrica entre eles. Ao passarem no orifício as células criam uma resistência no campo eléctrico, sendo esta proporcional ao tamanho da célula, assim quanto maior a resistência gerada, maior será a célula. O pulso eléctrico é depois amplificado e gerado um histograma (Figura 12).

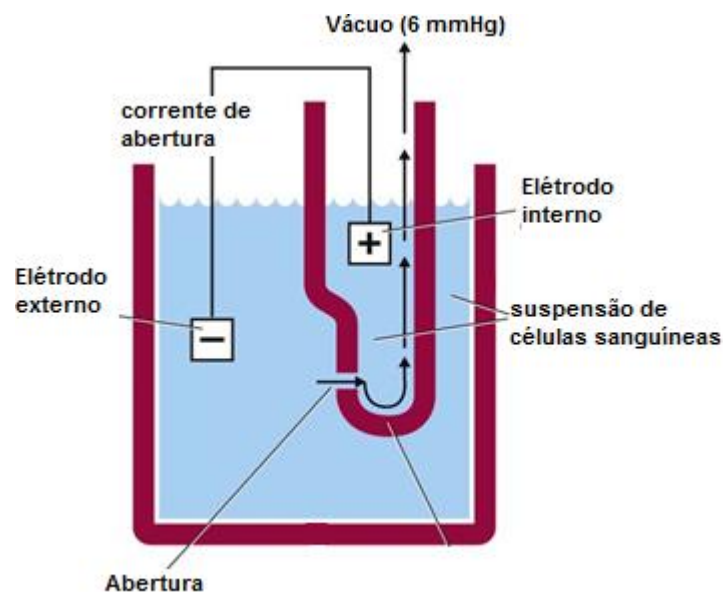


Figura 11 – Ilustração do princípio de Coulter, mostrando a colocação dos eléctrodos e da suspensão de células sanguíneas. (Adaptado de <http://clinicalgate.com/automated-cell-counting-instrumentation/> 25/07/2016).

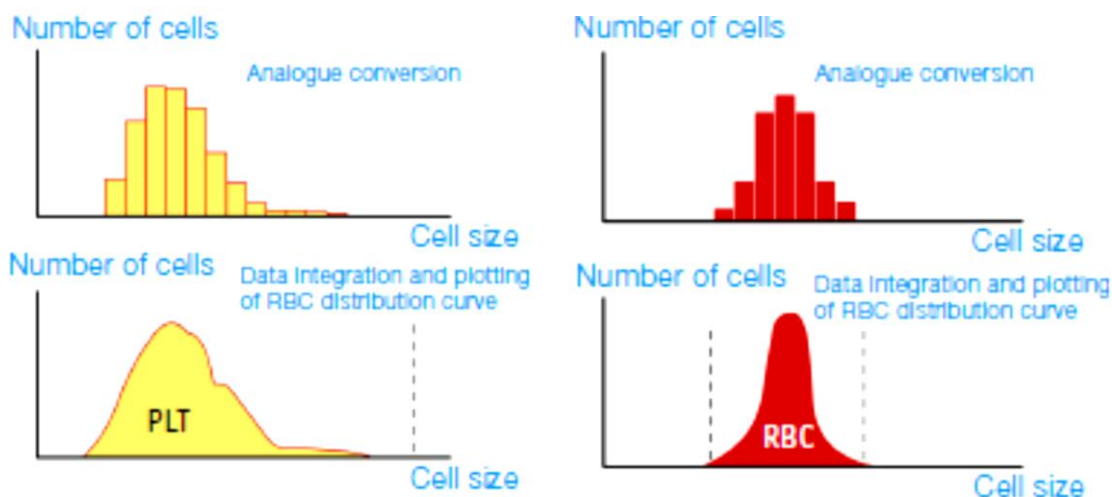


Figura 12 – Exemplo de um histograma obtido pelo princípio de Coulter (ou impedância elétrica) no autoanalisador *Pentra DX120 + SPS*. (Adaptado de *Horiba Medical*).

Os pulsos que representam células de 36 a 360 fL são caracterizados como RBC e pulsos que representam células de 2 a 20 fL como plaquetas (*Beckman Coulter Inc.*). A contagem dos glóbulos brancos é feita numa câmara distinta, após a lise dos glóbulos vermelhos.

A determinação da concentração de hemoglobina (Hb) é realizada por espectrofotometria, em ambos os equipamentos, mas por metodologias diferentes. No *UniCel DxH800* a concentração de Hb é determinada após a lise dos glóbulos vermelhos com um reagente livre de cianeto. A Hb libertada fica na forma de oxihemoglobina que vai reagir com um reagente antioxidante e estabilizador convertendo-a num hemocromogéneo estável, sendo depois medida a absorvância a 525 nm. Ao mesmo tempo é medida a absorvância, no mesmo comprimento de onda, de um branco de reagente. Os valores de absorvância são convertidos em g de hemoglobina/dL de sangue (*Beckman Coulter Inc.*).

Por outro lado, no *Pentra DX120 + SPS* a Hb é libertada das células por lise, reagindo com cianeto de potássio e formando cianometahemoglobina. A absorvância é medida a 550 nm, e depois convertida em g de hemoglobina/dL de sangue (*Horiba Medical*).

Para a contagem diferencial de leucócitos, as metodologias também são distintas. No *UniCel DxH800* esta contagem é feita com base na tecnologia VCS (volume, condutividade e dispersão de luz laser) sendo realizadas sete medições para cada célula, sendo determinando o volume, a condutividade e três medições de dispersão de luz (em diferentes ângulos) que dão informações acerca das granulações e superfície membranar, transparência celular e índice de complexidade (28). Os leucócitos totais são pois divididos em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. As percentagens são calculadas a partir do

gráfico de dispersão e os valores absolutos através da contagem total de glóbulos brancos (Figura 13) (Beckman Coulter Inc.).

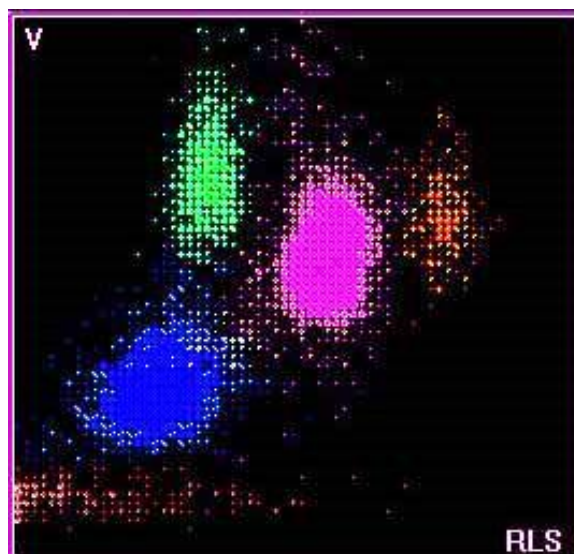


Figura 13 – Exemplo de um gráfico da contagem diferencial de leucócitos mostrando as diferentes populações. A azul estão representados os linfócitos, a branco os basófilos, a verde os monócitos, a rosa os neutrófilos e a laranja os eosinófilos. O gráfico é obtido a partir das características das diferentes células (volume, granulações e complexidade). (<http://hemosurf.ehb.be/Data/Lab-Images/leukoplot.jpg> 25/07/2016).

Já no autoanalisador *Pentra DX120 + SPS*, a contagem diferencial de leucócitos (Figura 14) é realizada em câmaras separadas. A contagem de basófilos segue o mesmo princípio da contagem de RBC com um reagente de lise específico (lisa todas as células, exceto os basófilos). É também calculado o número de leucócitos totais, que será o número de células nucleadas às quais se somam os basófilos. As restantes populações são determinadas combinando a medição de volume (por impedância elétrica), coloração citoquímica e medição de absorvância. Usa um reagente que causa a lise de todos os glóbulos vermelhos e que estabiliza os glóbulos brancos nas suas formas nativas, sendo depois separados com base nas suas características (*Horiba Medical*).

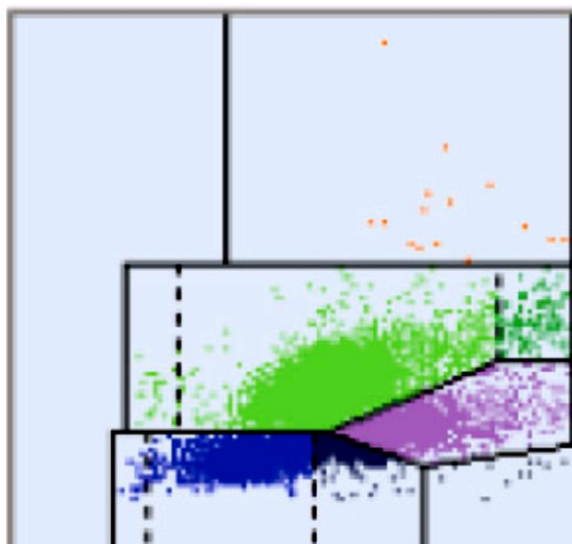


Figura 14 – Exemplo de um gráfico da contagem diferencial de leucócitos obtido no equipamento *Pentra DX/20 + SPS*. Estão representadas as diferentes populações: a azul os linfócitos, a verde os neutrófilos, a roxo os monócitos, a laranja os eosinófilos e a preto os basófilos (29).

Ambos os equipamentos possuem tecnologia que lhes permite detetar células anormais, nomeadamente eritroblastos, leucócitos imaturos e agregados plaquetares reportando-os sob a forma de alertas.

O autoanalisador *Pentra DX/20 + SPS* permite ainda fazer esfregaços de sangue periférico e coloração dos mesmos, usando a coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Esta coloração usa um corante básico (azul de metileno) e um corante ácido (eosina). O corante básico, por transportar cargas positivas, cora os componentes ácidos das células, tais como os núcleos (devidos às cargas negativas do DNA e RNA dos núcleos) e os grânulos dos basófilos, adquirindo estes uma cor azul. O corante ácido vai corar os componentes básicos, tais como glóbulos vermelhos e os grânulos de neutrófilos e eosinófilos, de cor rosa ou avermelhada.

Para a determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária, o SPC dispõe do equipamento *Test 1 BCL*, da *AliFax*. Este equipamento usa metodologia de cinética fotométrica capilar usando 175 µL de sangue total, colhido em tubo de K₃EDTA (com um volume morto de 1 mL), e colocando-o num capilar e centrifugando-o a 32 r.p.m. Um microfotómetro infravermelho capilar faz leituras de absorvância a 650 nm durante 20 segundos, enquanto se dá a sedimentação eritrocitária, a 37°C. A curva de sedimentação é analisada e os dados convertidos em valores de *Westergren*, por regressão linear (30).

Antes da análise, as amostras são agitadas para promover a desagregação de glóbulos vermelhos (*AliFax, S.P.A.*).

No setor de coagulação existem dois equipamentos idênticos *ACL TOP 700, Instrumentation Laboratory*. Este equipamento é capaz de realizar os testes básicos da coagulação, tais como o tempo de protrombina (PT) ou o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), bem como testes mais sofisticados como ensaios cromogénicos ou imunológicos. A deteção do coágulo, nos testes em que há a formação do coágulo, é feita por leitura de densidade ótica a 405 nm e 671 nm. A área das amostras está à temperatura ambiente e tem a vantagem de se poder colocar continuamente reagentes, sem a necessidade de parar o equipamento (26).

As amostras hemolisadas ou lipémicas devem ser evitadas já que podem interferir com a leitura da densidade ótica, mas na impossibilidade de colheita de nova amostra, é adicionada informaticamente uma nota informativa para o médico ter em consideração ao interpretar o resultado do parâmetro analítico.

Os testes mais comuns são o tempo de protrombina, o tempo de tromboplastina parcial ativado, a quantificação de fibrinogénio, a quantificação de fatores de coagulação (fator V, VIII, e fator de von Willebrand (vW)), a atividade anti-Trombina e a atividade de proteína C.

4.2. Hemograma

Diariamente, cerca de 10^{12} RBC são produzidos, num processo denominado de eritropoiese, que é regulado pela eritropoietina (23).

O estímulo para a eritropoietina é a pressão parcial de oxigénio nas células renais, já que quando a pressão diminui (como na anemia) a produção de eritropoietina aumenta, estimulando assim a eritropoiese (12).

Os glóbulos vermelhos contêm Hb (12) sendo esta a responsável pelo transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos (31). A Hb é sintetizada principalmente nos eritroblastos (12).

Num adulto a Hb predominante é a HbA (96 a 98%) que é constituída por quatro cadeias de globina (duas cadeias α e duas cadeias β), cada uma com o seu grupo heme (12). O grupo heme é formado por uma protoporfirina e um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) (Figura 15) (23).

O VCM é uma medida do tamanho de RBC, permitindo identificar macrocitose, microcitose ou normocitose. A HCM representa a quantidade de Hb presente em cada RBC enquanto a CHCM representa a concentração de Hb em cada RBC (32).

4.2.2. Anemias

As alterações mais frequentes no hemograma são as anemias cuja etiologia é definida com base na combinação do estudo de alterações de CHCM e HCM (32).

As anemias são distúrbios de glóbulos vermelhos e são mais frequentemente causados pela falta de ferro, essencial para a síntese de Hb. Este distúrbio ocorre quando há quantidade insuficiente de Hb (22).

As anemias podem classificar-se então como microcíticas e hipocrômicas, normocíticas e normocrômicas ou macrocíticas.

4.2.2.1. Anemias Microcíticas, Hipocrômicas

Nestas anemias os RBC apresentam um tamanho inferior ao normal (diminuição do VCM) bem como uma diminuição da CHCM e HCM (hipocromia) (Figura 16) (32).

As causas mais frequentes destas anemias são a deficiência de ferro, doenças crônicas ou talassémias. Ainda que com menos frequência também se podem dever a anemias sideroblásticas (34). Para a distinção do tipo de anemia é essencial estudar a cinética do ferro (ferro sérico, ferritina sérica, capacidade de fixação do ferro e transporte do ferro) bem como as reservas de ferro na medula óssea (12).

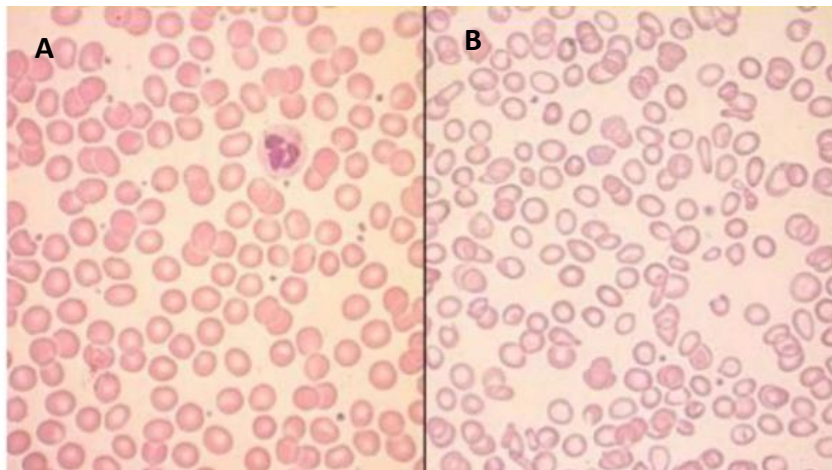


Figura 16 – Esfregaço de sangue periférico comparativo. O esfregaço **A** é de um indivíduo normal enquanto o esfregaço **B** pertence a um indivíduo com anemia microcítica hipocrômica. (Adaptado de <https://ficherodehematologia.files.wordpress.com/2015/11/curso-histologia-07-tejido-hematico-sangre-6-638.jpg>, em 26/07/2016).

4.2.2.2. Anemias Normocíticas, Normocrômicas

Quando estamos na presença destas anemias verifica-se uma diminuição da Hb e do Hct (volume de RBC por volume de plasma), mas sem alteração dos índices eritrocitários (32).

Devem-se sobretudo a doenças da medula óssea (por exemplo aplasia medular) ou acompanham doenças já existentes, nomeadamente doenças inflamatórias crónicas ou doenças hepáticas (12).

4.2.2.3. Anemias Macroscíticas

As anemias macroscíticas são caracterizadas por eritrócitos muito grandes (com aumento do VCM) e podem ser divididas em megaloblásticas ou não-megaloblásticas (23).

As anemias megaloblásticas são secundárias ao défice de vitamina B12 e/ou folato que são essenciais à síntese de DNA (32). Nestas situações existe um defeito na maturação do núcleo relativamente ao citoplasma das células (Figura 17) (34).

As causas das anemias macroscíticas não megaloblásticas são o alcoolismo, doenças hepáticas, hipotireoidismo e hemólise (34).

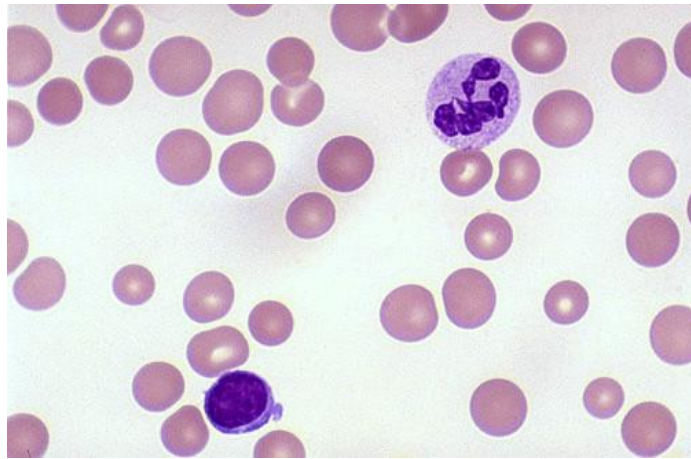


Figura 17 – Esfregaço de sangue periférico de uma anemia megaloblástica. É evidente o aumento do tamanho dos glóbulos vermelhos. (http://www.farmaciasaude.pt/site/images/stories/artigosimage/anemia_megaloblastica.jpg, 26/07/2016).

4.2.3. Alterações na contagem diferencial de leucócitos

As funções dos granulócitos e monócitos são a fagocitose, quimiotaxia e eliminação e digestão de células estranhas ao organismo, como as bactérias e os parasitas. Os linfócitos estão envolvidos na resposta imunológica através da produção de anticorpos (23).

Várias situações podem levar a um aumento ou diminuição das diferentes populações de leucócitos.

As alterações mais comuns são:

4.2.3.1. Neutrofilia

Consiste num aumento do número de neutrófilos e que se encontra em processos de infeções bacterianas, muitas vezes acompanhada de um aumento do número de formas menos maduras de neutrófilos, fenómeno conhecido como desvio à esquerda (32).

De facto, quando ocorre uma infeção bacteriana é necessário um grande número de neutrófilos para eliminar as bactérias presentes, pelo que os neutrófilos em circulação migram rapidamente para o local da infeção, sendo a medula óssea estimulada a aumentar a produção. Consequentemente há um aumento de neutrófilos em bastão, podendo existir também mielócitos e metamielócitos em circulação (35).

Também se verifica neutrofilia em quadros inflamatórios, hipóxia ou até mesmo devido a exercício físico intenso (32).

4.2.3.2. Neutropenia

A neutropenia é uma diminuição do número de neutrófilos, sendo as causas mais comuns a indução por fármacos (anti-inflamatórios não esteróides, citostáticos), infecções virais ou sépsis severas (32).

4.2.3.3. Monocitose

A monocitose não é muito comum e pode ser causada por infecções bacterianas crônicas, doenças do tecido conjuntivo (por exemplo lúpus eritematoso sistêmico), linfoma de Hodgkin, leucemias mieloblásticas agudas ou leucemias mielomonocíticas crônicas (23).

4.2.3.4. Linfocitose

A linfocitose é definida como um aumento do número de linfócitos e pode ser classificada como monoclonal ou policlonal. A primeira é consequência de uma doença linfoproliferativa em que o número de linfócitos está aumentado por defeito de uma dada população. A linfocitose policlonal geralmente está associada a infecções ou inflamações (36). Outras causas são as leucemias linfóides crônicas, leucemia linfoblástica aguda e alguns linfomas (23).

4.2.3.5. Linfopenia

É considerada uma linfopenia quando a contagem de linfócitos está inferior aos valores de referência. As causas mais comuns são as infecções virais, sendo a mais importante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (36).

Também se pode dever a uma insuficiência da medula óssea, a tratamentos com corticosteróides ou imunossupressores, bem como ao linfoma de Hodgkin (23).

4.3. Citologia

A observação do esfregaço de sangue periférico associada à contagem das células, fornecida pelos autoanalisadores providencia mais informação ao médico (37), nomeadamente acerca da morfologia eritrocitária e da presença de células anormais. No laboratório de hematologia, o ESP é realizado quando é pedido pelo médico, quando existem alterações no

hemograma, ou quando há informação clínica que o justifique (presença de células imaturas, blastos, dupla população eritrocitária, síndrome mielodisplásico, leucemias e linfomas com alterações na contagem de leucócitos).

O esfregaço sanguíneo é realizado de forma mecânica pelo equipamento *ABX Pentra DX120 + SPS, Horiba*, sendo depois corado pelo método de *May-Grünwald-Giemsa*. É depois observado ao microscópio ótico com uma ampliação de 500 ou 1000x (Figura 18).

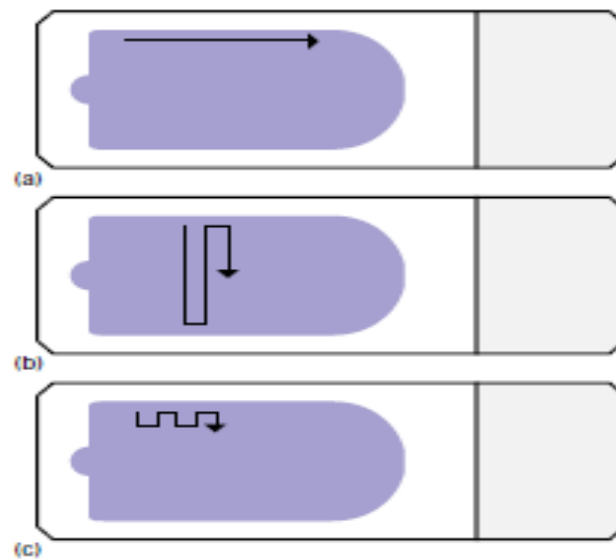
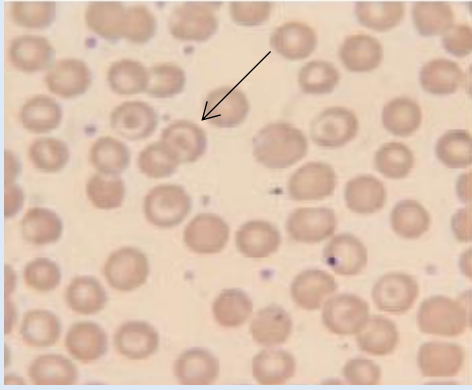




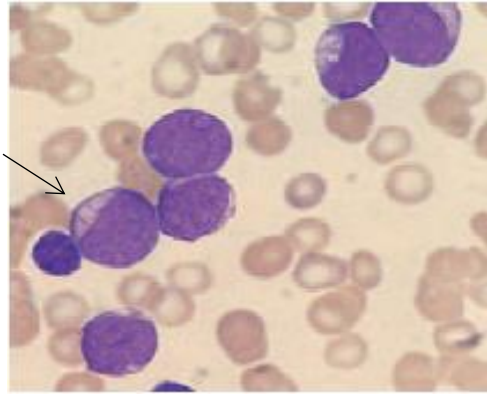
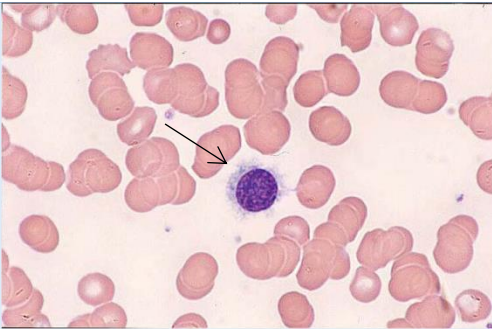
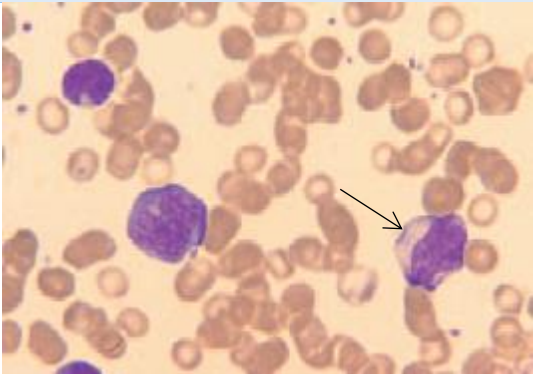



Figura 18 – Diagramas exemplificativos de como se poderá executar a contagem diferencial de leucócitos manual (38).

A tabela 3 resume as alterações morfológicas mais frequentemente encontradas nos esfregaços sanguíneos observados no S.P.C. bem como as respetivas causas.

Tabela 2 – Alterações mais encontradas durante o estágio no setor de citologia do laboratório de hematologia. As células de interesse estão assinaladas com a seta.
 (http://ayudaonlines.com/wp-content/uploads/2015/02/linfocitos-altos.jpg;
 http://l.bp.blogspot.com/_F1yc45YcUYQ/TDfYpQbSAsI/AAAAAAAAAFE/0gUCOdJjD-) (23, 32, 38).

Alteração	Imagem	Causas possíveis
Células em alvo		Deficiência de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatias, talassêmias e pós- esplenectomia.
Acantócitos		Hepatopatia, abetalipoproteinemia, insuficiência renal, anemia hemolítica microangiopática e acantocitose hereditária.
Dacriócitos		Mielofibrose, anemia megaloblástica e eritropoiese ineficaz.
Eliptócitos		Eliptocitose hereditária, deficiência de ferro e talassêmias.

<p>Linfocitose</p>		<p>Infecções agudas e crônicas, leucemias linfóides crônicas, leucemia linfoblástica aguda e alguns linfomas.</p>
<p>Blastos</p>		<p>Leucemias agudas e síndrome mielodisplásico.</p>
<p>Células cabeludas</p>		<p>Tricoleucemia (ou leucemia de células cabeludas).</p>
<p>Linfócitos atípicos</p>		<p>Leucemia pró-linfocítica.</p>
<p>Eritroblastos</p>		<p>Recém-nascidos, anemias megaloblásticas, deficiência de ferro e anemias sideroblásticas.</p>

4.4. Velocidade de sedimentação

Apesar de já ter sido considerado um teste auxiliar de diagnóstico de doenças inflamatórias e infecciosas, (39) a velocidade de sedimentação é um teste pouco específico (30) mas que continua a ser usado com muita frequência no diagnóstico e acompanhamento de doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico) (39) sendo que, atualmente já se encontram disponíveis testes complementares mais específicos destas patologias.

O processo de sedimentação eritrocitária compreende 3 fases:

- Agregação: formação do *rouleaux* e pequena sedimentação. Os eritrócitos apresentam cargas negativas à superfície logo as células repelem-se. Altas concentrações de proteínas plasmáticas, carregadas positivamente, neutralizam as cargas e facilitam a formação de *rouleaux*.
- Precipitação: período em que a sedimentação é mais rápida.
- Empacotamento: é a fase final da sedimentação e é a fase mais lenta (30).

O aumento da velocidade de sedimentação eritrocitária pode ser devido a anemias agudas ou crônicas, ao aumento de proteínas de fase aguda (por exemplo em doenças reumatológicas), à presença de proteínas plasmáticas anormais (por exemplo no mieloma múltiplo), ao aumento de Ig (em infeções) ou ainda devido a neoplasias malignas (39).

No entanto, indivíduos com valores de VSE normais não estão excluídos de doenças malignas, já que existem fatores que podem impedir o seu aumento, nomeadamente poliglobulia, diminuição de macroproteínas (fibrinogénio) ou RBC deformadas (anemia falciforme) (39).

4.5. Hemóstase

O sistema hemostático permite controlar a perda de sangue por interações entre os componentes da parede vascular (colagénio, fator vW e fibronectina), plaquetas circulantes e proteínas plasmáticas, em resposta a um dano vascular (12, 40).

A hemóstase pode ser dividida em primária e secundária. A hemóstase primária consiste na formação de um tampão plaquetar no local da lesão, em poucos segundos, pela interação das

plaquetas com o endotélio vascular (adesão), estabilizado pelo fator vW, e com outras plaquetas (agregação) (12,23).

A hemóstase secundária é também conhecida como cascata da coagulação onde intervêm proteínas culminando na produção de fibrina e estabilizando o tampão plaquetar (12).

A cascata de coagulação inicia-se pela ativação proteolítica sequencial de fatores plasmáticos (proteínas), em etapas que ocorrem em diferentes superfícies celulares (41). É usual referir-se a via extrínseca e outra intrínseca, e partilham a via comum (Figura 19) (42).

A via extrínseca é iniciada pelo fator tecidual libertado das células danificadas e inclui os fatores VII e X. A via intrínseca é iniciada pela exposição dos constituintes endoteliais e inclui os fatores VIII, IX, X, XI e XII. Ambas culminam na via comum com a produção de fibrina que contribui para a estabilização do coágulo (12).

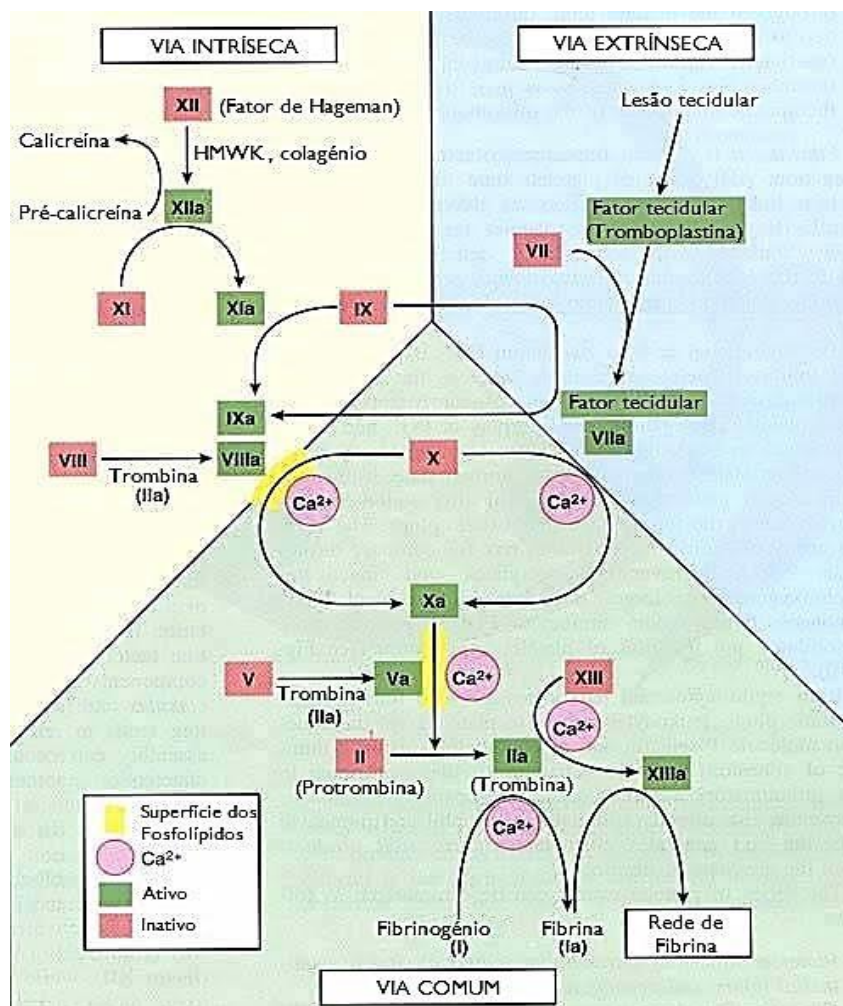


Figura 19 – Esquema da cascata de coagulação apresentando todos os intermediários desta activação proteolítica de proteínas. (http://vet.uga.edu/ivcm/courses/VPAT5200/01_circulation/hemostasis/hemostasis04.html, em 02/09/2016).

Alterações na hemostasia podem ser devidas a distúrbios vasculares, trombocitopenias ou a defeitos na coagulação do sangue (23), sendo portanto fundamental a realização de testes de coagulação para avaliar estes últimos.

Os defeitos da coagulação podem ser responsáveis tanto por hemorragia como por fenómenos trombóticos (23).

4.5.1. Testes de *screening* de coagulação

O tempo de protrombina é útil na monitorização de anticoagulantes orais como a varfarina (já que é um inibidor da vitamina K, essencial para a síntese de fatores II, VII, IX e X) (43).

Mede o tempo de ocorrência de formação do coágulo após a adição de tromboplastina tecidular e cálcio ao plasma pré aquecido a 37°C (26). Avalia as vias extrínseca e a comum (Fator V, VII, II e fibrinogénio), sendo que deverá ser expresso em INR (44).

A razão internacional normalizada, mais vulgarmente designado por INR permite a uniformização do resultado do tempo de protrombina, assim, o resultado expresso nesta razão, será o mesmo em qualquer laboratório do mundo. Este índice é calculado com base no índice de sensibilidade internacional (ISI), que é fornecido pelo fabricante dos reagentes.

O INR é assim calculado a partir do PT, sendo a razão entre o PT do paciente e o PT normal, corrigido para a sensibilidade do reagente usado (23). Encontra-se prolongado quando existem deficiências de um ou mais fatores da via extrínseca e comum bem como na presença de inibidores desses fatores (43).

O tempo de tromboplastina parcial ativada mede o tempo de ocorrência da coagulação após a adição de fosfolípidos, cálcio e caulino (activador) ao plasma, avaliando assim a via intrínseca e comum (fatores V, VIII, IX, X, XI, XII II e fibrinogénio) da cascata de coagulação (44). É usado para a deteção de deficiências ou presença de inibidores dos fatores da via intrínseca e comum, bem como para a monitorização do uso de anticoagulantes como a heparina e *screening* do anticoagulante lúpico (43).

4.5.2. Testes de coagulação específicos

4.5.2.1. Determinação da resistência à proteína C por mutação do fator V

O fator V é uma proteína plasmática, precursora do fator V ativado, essencial para a síntese de trombina (45). O fator V é inibido pela proteína C, resultando desta inibição uma diminuição da síntese de trombina. A resistência à proteína C constitui a principal alteração genética envolvida nas trombofilias (46), estando associada, na maioria dos casos, a mutações no gene do fator V.

Para a determinação da resistência à proteína C usam-se fosfolípidos, plasma deficiente em fator V, caulino e cálcio. Ao usar o plasma deficiente em fator V, a sensibilidade e especificidade à mutação do fator V aumenta. O plasma do doente é diluído com o plasma deficiente em fator V e depois incubado com os fosfolípidos, caulino e cálcio, o qual vai iniciar a formação do coágulo.

Com a deficiência de fator V a hemostasia não está completa, o que causará um prolongamento do tempo de sangramento. Esta deficiência pode ser hereditária ou adquirida (por medicamentos ou doenças autoimunes) (47). A deficiência de fator V traduz-se num prolongamento do PT e aPTT (44).

4.5.2.2. Determinação da atividade de fator VIII

O gene do fator VIII encontra-se localizado no cromossoma X e a síntese aberrante da proteína correspondente (fator VIII) resulta em diversos defeitos (48).

A determinação da atividade do fator VIII baseia-se no teste de aPTT. O plasma do doente é diluído e adicionado a plasma deficiente em fator VIII. A correção do tempo de coagulação prolongado do plasma deficiente em fator VIII, é proporcional à atividade do fator VIII no plasma do doente.

A presença de níveis elevados de fator VIII tem provavelmente uma causa genética e está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de trombose venosa (49).

Da deficiência de fator VIII resulta a Hemofilia A, que é uma doença hemorrágica genética recessiva, ligada ao cromossoma X. Esta deficiência traduz-se num prolongamento do aPTT (44).

4.5.2.3. Determinação da atividade do fator de von Willebrand

O fator de vW é uma glicoproteína existente nas plaquetas e nas células endoteliais e contém um número variável de subunidades. Tem como funções a adesão das plaquetas, a formação do tampão plaquetar e protecção da degradação plasmática do fator VIII (50).

A quantificação da atividade de fator vW é realizada por imunoturbidimetria amplificada com partículas de látex. Um anticorpo monoclonal específico anti-fvW está imobilizado nas partículas de látex e reage com o fator de vW do plasma do doente. Os agregados formados provocam uma diminuição da luz transmitida e, o grau de aglutinação é diretamente proporcional à atividade do fator de vW.

A doença de vW é uma doença hemorrágica resultante da deficiência de fator de vW, mas é de difícil diagnóstico, necessitando de testes adicionais, tais como, a quantificação do antigénio de fator vW, a atividade de fator de vW e a quantificação de fator VIII. A deficiência de fator de vW tem como evidências laboratoriais um prolongamento do aPTT, sendo que o PT está normal (44).

4.5.2.4. Quantificação de fibrinogénio pelo método de Clauss

O fibrinogénio é uma proteína solúvel que circula no sangue e que é um dos maiores alvos da trombina, sendo depois convertido em monómeros de fibrina, fundamentais para o suporte do coágulo (40).

A quantificação de fibrinogénio pelo método de Clauss utiliza um excesso de trombina para converter o fibrinogénio em fibrina. Quando a concentração de trombina é elevada, o tempo de coagulação do plasma é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio.

As alterações no fibrinogénio são devidas a mutações no seu gene (46) e que têm como consequências afibrinogénemia, hipofibrinogénemia e disbibrinogénemia (44).

A hipofibrinogénia e a afibrinogénia têm consequências hemorrágicas, enquanto a disfibrinogénia pode ter consequências trombóticas ou hemorrágicas, uma vez que está em causa a estrutura e função alterada do fibrinogénio e neste caso o PT e o aPTT encontram-se prolongados (44).

5. O SETOR DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

A Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar de suporte à avaliação, em particular, da função renal, hepática, pancreática, balanço eletrolítico, glicemia, perfil lipídico, barreira hematoencefálica, com recurso a amostras de soro, urina ou LCR (51).

Assim, o setor de Bioquímica Clínica do SPC engloba várias fases do processamento de amostras biológicas diversas, com vista a esclarecer os mecanismos biológicos afetados por uma determinada patologia. Embora as amostras mais frequentes sejam o soro, o plasma e a urina, neste setor são também processadas amostras de líquidos ascíticos, pleurais e cefalorraquidiano.

5.1. Determinação automatizada da maioria dos parâmetros bioquímicos

A maioria dos parâmetros químicos é determinada por reações colorimétricas cinéticas, ensaios espectralfotométricos, ensaios enzimáticos colorimétricos, enzimáticos com detecção ultravioleta (UV) e ensaios potenciométricos.

O equipamento usado é o Olympus AU5800 que permite a maioria das determinações de rotina no soro, nomeadamente, albumina, bicarbonato, bilirrubina directa e total, cálcio, colesterol, ácido úrico, creatinina, glicose, HDL, LDL, ferro, lactato, magnésio, proteínas totais, triglicédeos e ureia, enzimas (ALP, ACP, ALT, α -amilase, AST, colinesterases, CK, CK-MB, γ GT, LDH e lipase) e proteínas específicas (α_1 anti-tripsina, Apo A1, Apo B, β_2 -microglobulina, C_3 , C_4 , ceruloplasmina, PCR, ferritina, haptoglobina, mioglobina e transferrina). Alguns doseamentos na urina são realizados também neste equipamento, tal como as proteínas totais e a microalbuminúria.

Antes de colocar as amostras de soro no autoanalisador, deve verificar-se a existência de fragmentos de fibrina ou glóbulos vermelhos e proceder à sua remoção. É também adicionada uma nota informativa em amostras hemolisadas ou turvas, já que este aspeto pode ter influência na determinação de parâmetros químicos, tais como K^+ , LDH e bilirrubinas.

5.2. Determinação da hemoglobina glicada

A HbA_{1c} é o resultado de uma reação de glicação irreversível, não-enzimática, da hemoglobina A. A reação consiste na interação do grupo aldeído da glicose com um ou dois resíduos N-terminais de valina na cadeia β da hemoglobina A (6,52).

Este parâmetro é usado para controlo do teor de glicose no sangue ao longo de 120 dias em doentes com Diabetes Mellitus, já que a formação de HbA_{1c} é diretamente proporcional à concentração de glicose em circulação e é expresso em percentagem de Hb total (52). A hiperglicémia em doentes diabéticos causa frequentemente um aumento da HbA_{1c}, já que esta é a fração de Hb glicada predominante (53).

Os doentes com Diabetes Mellitus controlada apresentam valores de HbA_{1c} <7% (51).

Existem diversos fatores que podem influenciar os resultados da hemoglobina glicada, tais como amostras hemolisadas, transmissão materno-fetal, hemodiálise, persistência hereditária de Hb fetal, recém-nascidos e gravidez (podem dar valores falsamente elevados) ou anemias, perdas crónicas de sangue, falência renal crónica e talassémias (que podem dar valores falsamente diminuídos) (53).

A hemoglobina glicada é determinada pelo sistema *Variant™ II Turbo*, da *Bio-Rad*. Esta determinação é feita em sangue total (colhido com EDTA) pela técnica de cromatografia líquida (de troca iónica) de elevada resolução (HPLC). Esta faz uso de bombas de alta pressão, que aceleram o movimento das moléculas pela coluna, bem como de materiais cromatográficos de elevada qualidade que podem suportar a força do fluxo pressurizado, aumentando assim a resolução (7).

As amostras devem ser verificadas antes de colocadas no equipamento, para excluir a presença de coágulos que podem causar entupimentos na agulha, ou uma quantidade de sangue insuficiente para o ensaio.

5.3. Análise sumária de urina

O tratamento das amostras de urina é feito numa sala à parte. As amostras são entregues por uma auxiliar, juntamente com as requisições que são conferidas e integradas no sistema informático. Nesta área processam-se amostras com pedidos de análise sumária de urina, análise sumária de urina e sedimento urinário e análises de urina de 24 horas.

As amostras de urina devem ser colhidas no máximo 1 hora antes de serem processadas, para contentores sem conservantes, detergentes ou desinfetantes. (As urinas de 24 horas são colhidas para contentores preferencialmente graduados e fornecidos pelo laboratório, para onde é recolhida toda a urina produzida em 24 horas). Nas urinas de 24 horas, o volume é anotado e uma alíquota é separada para a análise química.

Nesta sala existem dois analisadores *AutionMax*TM AX-4030, da *Menarini Diagnostics*, que asseguram a análise sumária das urinas, um dos quais associado a um equipamento de análise do sedimento *SediMax*, também da *Menarini Diagnostics*, onde são colocadas as amostras de acordo com a requisição.

O *AutionMax* necessita de um volume mínimo de 2 mL de amostra, dos quais usa apenas 0,9 mL. Usa tiras-reagente para pesquisar (análise semi-quantitativa) diversos parâmetros na urina, nomeadamente glicose, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, pH, sangue, corpos cetónicos, nitritos, leucócitos, creatinina usando a técnica de refletância com comprimento de onda duplo (numa reação de 60 segundos). A densidade da urina é também medida com base na luz refratada pela amostra, assim como o grau de turvação, através da luz refletida pela amostra, a cor, medindo a luz transmitida pela amostra quando irradiada com um feixe de diferentes comprimentos de onda.

No *SediMax*, um volume de 200 µL de urina é medido e centrifugado a 2000 rpm por 10 segundos, numa centrífuga incorporada. O sedimento é recuperado e colocado numa lâmina para ser observado ao microscópio, também incorporado, numa ampliação de 400 x, sendo tiradas 15 fotografias, correspondentes a 10 campos.

O sedimento é muitas vezes analisado semi-automaticamente, ou seja existem parâmetros de validação, previamente estabelecidos que validam os resultados automaticamente. No entanto, quando são identificados elementos menos comuns, o utilizador tem de validar manualmente os resultados, fazendo ajustes, se necessário.

O equipamento *SediMax* identifica e faz a contagem de diversos elementos, tais como células (eritrócitos, leucócitos, células epiteliais escamosas, não-escamosas e dos túbulos renais), cilindros (hialinos, granulados, cerosos, de células ou de gordura), cristais (comuns ou patológicos), organismos (bactérias, leveduras ou parasitas) e contaminantes (espermatozoides, fibras e pólen) (54).

Por vezes, o utilizador é alertado para determinadas amostras, marcadas como “crowded”, que podem não ter uma contagem precisa devido ao elevado número de elementos

identificados pelo equipamento. Estas amostras têm de ser verificadas pelo técnico antes de serem validadas.

Depois de processadas, as amostras são armazenadas no frigorífico por 48 horas.

6. O SETOR DE MICROBIOLOGIA

O laboratório de microbiologia é um importante componente do SPC, participando no diagnóstico e no controlo de doenças infecciosas (55).

Neste setor são recebidas amostras de vários polos do CHUC, sendo eles identificados com diferentes letras, correspondentes a cada polo. Esta organização tem como objetivo uma melhor identificação de cada amostra, evitando números repetidos, bem como a organização e tratamento adequado de cada produto com base no contexto clínico e no tipo de população em questão (grávidas, crianças, doentes transplantados, queimados, entre outros).

Assim sendo, a letra M corresponde ao polo dos HUC, a letra C ao polo HG, a letra J ao polo HP e a letra O às maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos.

É fundamental a correta identificação da amostra, do produto biológico e também a informação ou contexto clínico, já que ajuda os técnicos e os médicos patologistas a orientar o estudo e o seguimento da amostra. As amostras devem ser colhidas para contentores estéreis e transportadas, cumprindo as condições de transporte e segurança.

6.1. Os diversos produtos biológicos e o seu processamento

Neste setor são recebidas amostras de vários produtos tais como urina, sangue, fezes, LCR, exsudados de feridas, vaginais e vaginais-rectais, biópsias, expetorações e outras secreções da árvore respiratória, líquidos pleurais, peritoniais, sinoviais e outros produtos, tais como pontas de cateter ou próteses.

Depois de receber as amostras, estas têm de ser tratadas de modo a recuperar os microorganismos nelas presentes e passíveis de causar infeção, nas melhores condições de crescimento (nutrientes, temperatura e atmosfera). Para isso, usam-se meios de cultura indicados para cada grupo de microorganismos, que poderá causar determinada infeção em determinado produto.

É importante manter as condições de assépsia no tratamento dos produtos, de modo a evitar contaminações e comprometer a flora possivelmente presente.

As Tabelas 4 e 5 resumem o tratamento de cada amostra bem como o seguimento de recuperação de cada microrganismo até ao diagnóstico final.

Tabela 3 – Produtos normalmente estéreis. Procedimentos de colheita e cultura e microrganismos patogênicos mais frequentes.

Produto	Colheita	Meios de cultura	Microrganismos patogênicos
LCR	Colheita de 4 tubos após assépsia da pele. Centrifugar as amostras a 2500 r.p.m. durante 10 minutos.	Coloração de Gram, Gelose de sangue (GS), meio líquido de <i>brain-heart</i> (BH) e Gelose de chocolate com <i>polyvitex</i> (PVX).	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Sangue	Colheita para frasco de hemocultura contendo nutrientes. As colheitas devem ser de 2 ou 3 amostras, colhidas aleatoriamente no espaço de 24 horas, na ausência de pico febril. Preservar a assépsia da pele. Para a pesquisa de hemoparasitas colher sangue em tubo de EDTA.	Incubação a 37°C até 5 dias. Se não houver crescimento, é considerada negativa. Se for positiva, faz-se uma coloração de Gram do frasco de hemocultura e a cultura em GS. Para pesquisa de hemoparasitas, faz-se um esfregaço sanguíneo e gota espessa.	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>S. aureus</i> , Estafilococos coagulase negativos, <i>S. pneumoniae</i> .
Placenta	Colheita de uma amostra representativa para um contentor estéril.	Coloração de Gram, CNA, Caldo de <i>cooked-meat</i> (CM) e GS.	<i>Listeria monocytogenes</i> .
Biópsias e fragmentos de tecidos	Colheita de uma amostra representativa da lesão para um contentor estéril.	Coloração de Gram, CM e GS.	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

Tabela 4 – Produtos com flora normal associada. Procedimentos de colheita e cultura tal como microrganismos patogénicos mais frequentes.

Produto	Colheita	Meios de cultura	Microrganismos patogénicos
Urina	Jacto médio, após higiene da zona genital com água e sabão. Colocado num tubo estéril e com ácido bórico como preservante.	GS e Cled. Atmosfera normal a 37°C, 18/24 horas.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Fezes	Colheita de fezes diarreicas em contentor estéril. Para pesquisa de parasitas ou sangue oculto devem ser colhidas três amostras em dias não consecutivos.	Meio de Hecktoen, meio XLD, meio de Yersinia, meio de Campy e Caldo de bacilos (CB). Nas fezes de crianças cultiva-se ainda em meio de SMAC.	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>E.coli</i> enterohemorrágica <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>S. aureus</i> .
Exsudato vaginal	Colheita com zaragatoa em meio de transporte de Cary-Blair da zona vaginal.	Coloração de Gram, CNA, GS e meio de Neisseria.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Clamidia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> .
Expectoração Lavados e Aspirados Brônquicos	Colheita para um contentor estéril. A expectoração deve ser obtida após tosse profunda ou induzida com solução salina. A boca deve ser lavada com água e deve ser evitada a contaminação com flora da orofaringe. Rejeitar amostras que sejam de saliva. Se a amostra tiver muitas células epiteliais (> 25) sem predomínio bacteriano e poucos neutrófilos (< 10) deve ser rejeitada.	Coloração de Gram, GS e meio de <i>Haemophilus</i> (Hae) Para pesquisa de microbactérias faz-se coloração de Ziehl-Neelsen, meio Líquido (MGIT) e Löwenstein-Jensen.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella spp.</i> <i>S.aureus</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Micobacterium spp.</i>
Exsudato da Orofaringe	Colheita em zaragatoa em meio de transporte de Cary-Blair, evitando o contacto da zaragatoa com a saliva.	Coloração de Gram, GS e PVX.	Estreptococos do grupo A, <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> .

Aspirados ou Exsudatos de Feridas	Colheita do aspirado com seringa estéril para contentor estéril ou portagermen ou colheita com zaragatoa em meio de transporte Cary-Blair de toda a área da ferida, principalmente zonas profundas e após assépsia da superfície da ferida.	Coloração de Gram, GS.	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Pontas de Cateter	Remoção do cateter e colocar a ponta num contentor esterilizado.	Rolamento da ponta de cateter em GS e meio líquido de BH.	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

A escolha dos meios de cultura é de extrema importância já que estes têm de fornecer energia, carbono, iões, o pH ideal ao crescimento e antibióticos de modo a fomentar o crescimento dos microrganismos de interesse, em detrimento dos que fazem parte da flora normal (para os produtos que a possuem) (56).

No Setor de Microbiologia, do SPC do CHUC, são usados meios de cultura preparados comercialmente, da *BioMérieux Diagnostics*. Estes estão armazenados a 4°C e só são retirados no início do dia de trabalho e na quantidade necessária, evitando assim contaminações e alterações de temperatura consecutivas que os podem danificar.

6.2. Identificação de Microrganismos

A observação da morfologia das colónias em cultura permite uma identificação presuntiva das bactérias presentes em determinada amostra, o que ajuda na decisão de continuação do estudo daquele produto biológico, no entanto é fundamental a identificação de cada espécie presente bem como a sua suscetibilidade aos antimicrobianos.

A identificação é realizada no equipamento *Vitek®MS*, *BioMérieux Diagnostics* de forma automatizada e em pouco tempo. Este equipamento usa a técnica de espectrometria de massa *MALDI-TOF* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*), que permite detetar moléculas intactas dos microrganismos, permitindo a sua identificação.

A amostra a analisar é colocada numa matriz, juntamente com uma solução ácida (mistura saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinamico em acetonitrilo e ácido trifluoroacético) (57). A

matriz é depois irradiada com um laser e as proteínas ganham carga elétrica, ou seja, são ionizadas, sem que ocorra a sua fragmentação.

As proteínas são separadas de acordo com a sua razão massa/carga elétrica num perfil de espectro de massa. Este espectro é depois comparado com espectros de uma base de dados de referência, identificando assim o microorganismo em questão (57).

7. CONCLUSÃO

Com este estágio percebi que na área de análises clínicas não pode haver uma verdadeira divisão de setores, ou laboratórios, já que o conhecimento está todo integrado numa rede altamente complexa, que exige muito conhecimento e dedicação constante.

Consegui também estruturar, com bases mais sólidas, todo o conhecimento e experiência adquirida durante o curso, sendo uma mais-valia, na minha vida profissional futura. Sem dúvida que foi um privilégio partilhar este tempo com profissionais qualificados sempre disponíveis para clarificar as dúvidas que iam surgindo.

A oportunidade de trabalhar num laboratório desta dimensão foi fundamental para desenvolver capacidades de organização, responsabilidade e pesquisa, no sentido de dar resposta a todas as tarefas que me foram propostas, nos diversos setores.

Considero esta experiência enriquecedora, com a certeza que contribuiu para fazer de mim uma melhor profissional de saúde, no futuro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) **O setor da prestação de serviços de análises clínicas**, ERS, Porto, Novembro 2015.
- (2) ABBAS, A.; LITCHMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª Ed. Elsevier Editora, 2012.
- (3) STUART, F. **Human Physiology**. 12ª Ed. McGraw-Hill, 2014.
- (4) ANGIOI, A.; FERVENZA, F.; SETHI, S.; ZHANG, Y.; SMITH, R.; MURRAY, D.; PRAET, J.; PANI, A.; VRIESE, A. – **Diagnosis of complement alternative pathway disorders**. *Kidney International* 89 (2016) 278-288.
- (5) AROSA, F.; CARDOSO, E.; PACHECO, F. **Fundamentos de Imunologia**. 2ª Ed. Lidel Editora, 2012.
- (6) BRUTIS, C.; ASHWOOD, E.; BRUNS, D. **TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6ª Ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008.
- (7) NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª Ed. W.H. Freeman and Company, 2002.
- (8) **ImmunoCap Testes laboratoriais: ImmunoCap Specific IgE** – Thermo scientific, 2012. (<http://www.phadia.com/pt-PT/5/Products/Ensaios/10/06/2016>).
- (9) THOMAS, L. – **Proteins in clinical and laboratory medicine: use and assesment of clinical laboratory results**. 1ª Ed. Frankfurt: TH Books, 2008.
- (10) **Electroforese de proteínas e imunofixação**, Instituto de Patologia Clinica Hermes Pardini. 2003 (http://www.hermespardini.com.br/pardini/imagens/dep_142.pdf 20/03/2016)
- (11) GALLEGO, A. **El Proteinograma en la práctica clínica**. *Medicina Integral* 38 (2001) 127-132.
- (12) PINTO, Anabela Mota. **Fisipatologia Fundamentos e aplicações**. 1ªEd. Lisboa: Lidel, 2007.
- (13) TRACY, E.; ANDREWS, D.; CONSTANTIN, M.; ZHU, Y. – **Differences identified between serum and urine immunofixation electrophoresis**. *Clinica Chimica Acta* 439 (2015) 68-70.
- (14) BRADWELL, A. – **Serum free light chain analysis plus hevyLite**. 7ª Ed. The Binding Site Group Ltd. 2015.
- (15) BOTTINI, P. **-Laboratory tests for evaluating the M-component**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29(2007) 23-26.
- (16) BENDER, L.; COTTEN, S.; FEDORIW, Y.; WILIS, M.; MCCUDDEN, C. – **Evaluation of digital images for identification and characterization of monoclonal immunoglobulins by immunofixation**, *Clinical Biochemistry* 46 (2013) 255-258.
- (17) LE CARRER, D.; BOUCRAUT, J. – **Urine protein electrophoresis and immunofixation: illustrated interpretations**. 1ª Ed. Issy-le-Moulineaux: Sebia Laboratories, 1999.
- (18) WOODFOLK, J.; COMMINS, S.; SCHUYLER, A.; ERWIN, E.; PLATTS-MILLS T. – **Alergens, sources, particles and molecules: why do we make IgE responses?** *Allergy International* 64 (2015) 295-303.

- (19) VAN GASSE, A.; MANGODT, E.; FABER, M.; SABATO, V.; BRIDTS, C.; EBO, D. – **Molecular allergy diagnosis: status anno 2015**. *Clinica Chimica Acta* 444 (2015) 54-61.
- (20) BOM, A.; CARRAPATOSO, I.; LOUREIRO, C.; PINTO, A. **Alergia Alimentar**. 1ª Ed. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2013.
- (21) SZYMANOWICZ, A.; NEYRON M-J.; DENIS, I. – **Protocole pratique pour la detection, la caracterisation et l'interpretation des cryoglobulines**, *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée* 21(2006) 319-326.
- (22) ELSALAMONY, H. – **Healthy and unhealthy red blood cell detection in human blood smears using neural networks**. *Micron* 83 (2016) 32-41.
- (23) HOFFBRAND, A.; MOSS, P. **Essential Haematology**. 6ª Ed. UK: John Wiley and Sons Limited, 2011.
- (24) LEE, H.; CHEN Y. – **Cell morphology based classification for red cells in blood smear images**. *Pattern Recognition Letters* 49 (2014) 155-161.
- (25) BUTTARELLO, M. – **Quality specifications in haematology: the automated blood cell count**. *Clinica Chimica Acta* 346 (2004) 45-54.
- (26) APPERT-FLORY, A.; FISCHER, F.; JAMBOU, D.; TOULON, P. – **Evaluation and performance characteristics of the automated coagulation analyzer ACL TOP**. *Thrombosis Research* 120 (2007) 733-743.
- (27) KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. **Laboratory Hematology Practice**. 1ª Ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012.
- (28) JEAN, A.; BOUTET, C.; LENORMAND, B.; CALLAT, M.; BUCHONNET, G.; BARBAY, V.; BASUYAU, J.; VASSE, M. – **A new haematology analyzer DxH 800: an evaluation of the analytical performances and leucocyte flags, comparison with the LH 755**. *International Journal of Laboratory Hematology* 33 (2011) 138-145.
- (29) NERIN, P. – **HORIBA Medical in Europe: Evolution of Technologies for White Blood Cell Differential at HORIBA Medical, Review**. *Horiba Technical Reports* 39 (2012) 12-33.
- (30) SOARES, A.; SANTOS, E. – **Velocidade de hemossedimentação: comparação entre o método Microtest X (microssedimentação) e o método de referência Westergren**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31 (2009) 47-50.
- (31) **Hemoglobin and Functions of Iron** – UCSF Medical Center, University of California San Francisco, 2016 (https://www.ucsfhealth.org/education/hemoglobin_and_functions_of_iron/ em 26/07/2016).
- (32) TORRENS, M. – **Interpretación Clínica del Hemograma**. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26 (2015) 713-725.
- (33) ROSENFELD, R. – **Complete Blood Count**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 48 (2012).
- (34) SOSA, C. **Anemia. Clasificación morfológica**. *Archives of Internal Medicine* 32 (2010) S3-S5.
- (35) HONDA, T.; UEHARA, T.; MATSUMOTO, G.; ARAI, S.; SUGANO, M. – **Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection**. *Clinica Chimica Acta* 457 (2016) 46-53.

- (36) KAUSHANSKY K; et al. **Williams Hematology**. 9ªEd. United States: Mac Graw Hill, 2016.
- (37) DENICOLA, D. – **Advances in Hematology Analyzers**. Elsevier 26 (2011) 52-61.
- (38) BAIN, B. **Blood Cells: A Pratical Guide**. 4ª Ed.: Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006.
- (39) SANTOS, V.; CUNHA, S.; CUNHA, D. – **Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações**. Revista da Associação Médica Brasileira 46 (2000) 232-236.
- (40) CHAPIN, J.; HAJJAR, K. – **Fibrinolysis and the control of blood coagulation**. Blood Reviews 29 (2015) 17-24.
- (41) BERGER, M.; et al. – **Hemostasia: uma breve revisão**. Caderno Pedagógico 11 (2014) 140-148.
- (42) FRANCO, R. – **Fisiologia da coagulação, anti-coagulação e fibrinólise**. Medicina, 39 (2001) 229-237.
- (43) RIZZATTI, E.; FRANCO, R. – **Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos**. Medicina 34 (2001) 238-247.
- (44) REZENDE, S. – **Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas**. Revista de Medicina de Minas Gerais 20 (2010) 534-553.
- (45) CARVALHO, E.; et al. – **Rastreamento familiar do fator V de Leiden: A importância da detecção de portadores heterozigóticos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 27 (2005) 83-86.
- (46) SILVA, A.; et al. – **Distúrbios pró-trombóticos/Trombofilias**. Medicina Interna 17 (2010) 49-64.
- (47) BARWELL, J. – **Deficiência do fator V. 2012** (http://pt.healthline.com/health/deficiencia-do-fator-v/#Diagnóstico5_27/07/2016).
- (48) LENTING P.; MOURIK J.; MERTENS K. – **The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function**. The Journal of The American Society of Hematology 92 (1998) 3983-3996.
- (49) MOTA, F.; GONÇALVES L.; MANSILHA A. – **Rastreio de trombofilia hereditária no contexto de trombose venosa profunda**. Angiologia e Cirurgia Vasculare 7 (2011) 126-137.
- (50) JOÃO, C. – **Doença de von Willebrand**. Medicina Interna 8 (2001) 28-36.
- (51) XAVIER, R.; DORA, J.; SOUZA, C.; BARROS, E. **Laboratório na prática clínica: consulta prática**. 2.ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2011.
- (52) LAHOUSEN, T.; ROLLER, R.; LIPP, R.; SCHNELD, W. – **Silent haemoglobin variants and determination of HbA_{1c} with the HPLC Bio-Rad Variant II**. Journal of Clinical Pathology, 55 (2002) 699-703.
- (53) CHERNECKY, C.; BERGER, B. **Laboratory tests and diagnostic procedures**. 5ª Ed.: Saunders Elsevier, St. Louis, 2008.
- (54) FOGAZZI, G. **The urinary sediment an integrated view**, 3ª Ed.: Saunders Elsevier, Milano, 2010.

- (55) MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. **Microbiologia médica**. 6^a Ed.: Elsevier Editora, Lda, Rio de Janeiro, 2010.