



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

### **ANEMIA ADQUIRIDA EM HOSPITAL**

Trabalho submetido por  
**Catarina da Silva Salvador Grilo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

**março de 2022**





# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

### **ANEMIA ADQUIRIDA EM HOSPITAL**

Trabalho submetido por  
**Catarina da Silva Salvador Grilo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho orientado por  
**Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho**

e coorientado por  
**Mestre Teresa Maria da Silva do Nascimento**

**março de 2022**

## **Agradecimentos**

Quero agradecer à Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho, orientadora e coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, e à Mestre Teresa Nascimento da Silva do Nascimento, coorientadora, pela orientação desta dissertação e por todo o conhecimento transmitido.

O meu especial agradecimento aos meus pais e aos meus irmãos Rodrigo e Filipa por todo o apoio inalcançável, motivação e por acreditarem em mim. Sem eles a realização deste Mestrado não teria sido a mesma coisa.

Aos meus amigos agradeço todos os momentos vividos e por fazerem parte da minha vida.

## Resumo

A anemia adquirida em hospital (AAH) é uma consequência derivada da hospitalização que persiste ainda nos dias de hoje. Nos doentes com maior número de comorbidades, não anémicos à admissão hospitalar, os níveis de hemoglobina podem diminuir devido a intervenções médicas e/ou terapêuticas abaixo do limite de diagnóstico de anemia. O risco de aquisição de anemia durante a hospitalização é tanto maior quanto mais prolongado for o período de internamento e depende da concentração de hemoglobina na admissão e do número de comorbidades.

É fundamental perceber a etiologia da AAH, que é multifatorial, a fim de identificar os doentes de risco e implementar medidas que previnam a anemia nosocomial e transfusões sanguíneas nos doentes mais suscetíveis.

Palavras-chave: Anemia adquirida em hospital, hospitalização, período de internamento, intervenções médicas

## Abstract

Hospital-acquired anaemia (HAA) is a consequence of hospitalization that persists to this day. In patients with a greater number of comorbidities, who are not anaemic on admission to the hospital, haemoglobin levels may decrease due to medical and/or therapeutic interventions below the diagnostic threshold for anaemia. The risk of acquiring anaemia during hospitalization is greater the longer the hospital stay and depends on the haemoglobin concentration on admission and the number of comorbidities.

It is essential to understand the aetiology of AAH, which is multifactorial, to identify patients at risk and implement measures to prevent nosocomial anaemia and blood transfusions in the most susceptible patients.

Keywords: Hospital-acquired anaemia, hospitalization, length of stay, medical interventions

Índice

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Índice de figuras .....	5
Índice de tabelas .....	6
Lista de abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	9
1.1. Eritropoiese.....	10
1.2. Anemia.....	11
1.2.1 Classificação morfológica.....	12
2. Epidemiologia.....	14
3. Etiologia .....	16
3.1. Perdas de sangue para diagnóstico.....	17
3.2. Outras perdas de sangue iatrogénicas .....	20
3.3. Hemodiluição.....	21
3.4. Eritropoiese ineficaz .....	22
3.5. Deficiência em ferro .....	23
3.6. Hemólise induzida por fármacos .....	25
4. Fatores de risco.....	26
5. Preditores de AAH .....	27
6. Manifestações clínicas.....	30
7. Prevenção e resolução da anemia nosocomial.....	32
8. Terapêutica .....	36
9. Otimização do sangue em Portugal .....	38
10. Conclusão .....	40

11. Referências bibliográficas ..... 41

Índice de figuras

Figura 1: Eritropoiese. Diferenciação e maturação das células da linhagem eritroide desde as <i>stem cells</i> hematopoiéticas até aos eritrócitos. ....	11
Figura 2: Cálculo dos índices eritrocitários. (A) Volume corpuscular médio (fL); (B) Hemoglobina corpuscular média (pg); (C) Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL). ....	12
Figura 3: Causas de anemia microcítica. Défice em ferro (anemia ferropénica ou anemia de doenças crónicas), defeitos na síntese de protoporfirina (anemia sideroblástica) ou de globina (talassemia). ....	12
Figura 4: Comparação da eritropoiese normal com eritropoiese megaloblástica devido à carência em vitamina B12 ou folatos que compromete a síntese de DNA e, por conseguinte, a divisão celular dos precursores eritrocitários. ....	13
Figura 5: Associação entre as características dos hospitais e o risco de AAH. ....	15
Figura 6: Comparação da hemodiluição e da anemia na concentração de Hb e no valor do hematócrito. ....	21
Figura 7: Mecanismo da anemia de doença crónica. Nos indivíduos saudáveis, o ferro é absorvido no trato gastrointestinal e é transportado na corrente sanguínea pela transferrina para os GV imaturos. Nos doentes com doença crónica, o estado inflamatório provoca a diminuição da absorção de ferro que resulta na redução da saturação de transferrina e dificulta a libertação de ferro armazenado. O fornecimento de ferro aos GV imaturos é reduzido. Estas alterações são mediadas pela hepcidina que se liga e inibe a ferroportina (proteína responsável pela exportação de ferro). DMT1 é uma proteína transportadora de metal divalente 1 que permite a entrada de ferro do lúmen intestinal para os enterócitos e não sofre alterações. ....	24

## Índice de tabelas

Tabela 1: Valores limite de Hb que definem anemia. ....	11
Tabela 2: Etiologia e causa da anemia adquirida em hospital (iatrogénicas e estado de saúde do doente). ....	17
Tabela 3: Causas, fatores de risco e prevenção/tratamento da AAH.....	35
Tabela 4: Pilares e intervenções do <i>Patient Blood Management</i> . ....	39

Lista de abreviaturas

**AAH** Anemia adquirida em hospital

**BUN** *Blood urea nitrogen*

**CCI** *Charlson comorbidity index*

**CHCM** Concentração de hemoglobina corpuscular média

**CMV** Citomegalovírus

**COVID-19** *Coronavirus disease 2019*

**DNA** *Desoxyribonucleic acid*

**EPO** Eritropoietina

**GV** Glóbulos vermelhos

**Hb** Hemoglobina

**HCM** Hemoglobina corpuscular média

**HSC** *Hematopoietic stem cell*

**Ht** Hematócrito

**IL-1** Interleucina 1

**INFARMED** Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PBM** *Patient Blood Management*

**PCR** Proteína C reativa

**PEBN** Peso extremamente diminuído no nascimento

**PMBN** Peso muito baixo no nascimento

**POCT** *Point-of-care testing*

**RBC** *Red blood cell*

**RDW** *Red cell distribution width*

**rSO<sub>2</sub>** Saturação regional de oxigénio cerebral

**SMD** Síndrome mielodisplásica

**SpO<sub>2</sub>** Saturação periférica de oxigénio

**TACO** *Transfusion-associated circulatory overload*

**TFG** Taxa de filtração glomerular

**TNF** *Tumour Necrosis Factor*

**TRALI** *Transfusion-related acute lung injury*

**TRIM** *Transfusion-related immunomodulation*

**UCI** Unidades de cuidados intensivos

**UCIN** Unidades de cuidados intensivos neonatais

**VCM** Volume corpuscular médio

## 1. Introdução

A anemia adquirida em hospital (AAH) é a redução dos níveis de hemoglobina abaixo do limite do diagnóstico de anemia durante a hospitalização, nos pacientes que não se encontravam anêmicos na admissão hospitalar (Koch et al., 2013; Mann, Williams, Marisa, & Huy, 2017; Shander & Corwin, 2020). De acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), define-se anemia nas mulheres com concentração de hemoglobina inferior a 120 g/L e nos homens com valor inferior a 130 g/L (WHO, 2011). A severidade da AAH classifica-se como leve quando a Hb é superior a 110 g/L, mas abaixo do limiar de diagnóstico, e como moderada a severa quando a Hb é inferior ou igual a 110 g/L (Salisbury et al., 2010).

A AAH constitui um desafio para os cuidados médicos da atualidade, devido às causas serem complexas e multifatoriais (Martin & Scantling, 2015). O desenvolvimento de anemia provocada pelo internamento ocorre devido a uma combinação de intervenções médicas e o estado de saúde do doente (Salisbury et al., 2010). A perda de sangue consequente de colheitas sanguíneas frequentes de volume considerável para testes de diagnóstico durante curtos períodos de tempo é o principal preditor de anemia nosocomial em todas as faixas etárias (Thavendiranathan, Bagai, Ebidia, Detsky, & Choudhry, 2005; Valentine & Bateman, 2012). Na maioria dos doentes hospitalizados, a anemia é frequente e está associada a pior prognóstico e maior taxa de mortalidade (Shander, 2004).

Devido à falta de consenso das causas da anemia adquirida em hospital, as variáveis de confusão, tais como, malignidade, doença inflamatória, cirurgia e trauma, dificultam a identificação dos fatores de risco (Aronson et al., 2007). Não existem diretrizes que guiem a prática clínica de como avaliar as causas da anemia nos doentes hospitalizados. Há necessidade de criar medidas que permitam diminuir o risco de AAH, desde identificar os doentes de risco, diminuir o volume de sangue colhido para diagnóstico laboratorial através da utilização de tubos de colheita de tamanho pediátrico e da diminuição da frequência de colheitas efetuadas e avaliar e tratar as causas reversíveis da anemia (Bressman, Jhang, Mcclaskey, & Ginzburg, 2021).

## 1.1. Eritropoiese

A eritropoiese é um processo complexo de várias etapas de diferenciação e maturação desde a célula-tronco hematopoiética (HSC) multipotente até ao eritrócito maduro (Fig. 1). Uma pessoa saudável tem capacidade de produzir 2 milhões de eritrócitos, a cada segundo. As HSCs diferenciam-se numa célula indiferenciada mieloide, que por sua vez, quando estimulada pela eritropoietina (EPO), diferencia-se em células formadoras de colónias eritrocitárias e proeritroblasto, que são as primeiras células progenitoras da linhagem eritroide (Zivot A, Lipton JM, Narla A, & Blanc L, 2018).

A EPO é uma glicoproteína produzida no rim, responsável pela regulação da eritropoiese ao modular a sobrevivência e proliferação das unidades formadoras de colónias eritroides na medula óssea. A libertação da EPO é estimulada pela diminuição da tensão de oxigénio nos tecidos (Fink, 2004).

A diferenciação da linhagem eritroide tem lugar nas ilhas eritroblásticas, constituídas por um macrófago central com cerca de 30 células eritroides à sua volta, com diferentes níveis de maturação. O macrófago tem o papel de fornecer interações celulares importantes na diferenciação e proliferação celular, transferir ferro para os progenitores eritroides a fim de sintetizar heme e de fagocitar o núcleo expulso dos eritrócitos na diferenciação final.

Ao longo fase de maturação, a concentração de hemoglobina eritroide aumenta gradualmente, o tamanho celular decresce progressivamente e o núcleo condensa até ser expulso do eritrócito imaturo (enucleação). Este processo gradual começa nos precursores nucleados de proeritroblastos que se diferenciam progressivamente em eritroblastos basófilos, policromatófilicos e ortocromáticos, sendo estes últimos o resultado final deste processo de maturação.

A síntese de eritrócitos termina com a maturação dos reticulócitos em eritrócitos, que desenvolvem forma bicôncava e estão prontos para circularem na corrente sanguínea (Zivot A et al., 2018).

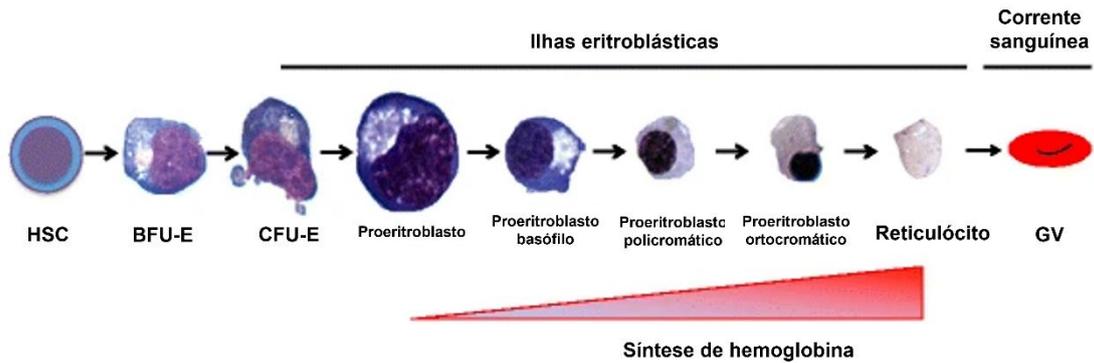


Figura 1: Eritropoiese. Diferenciação e maturação das células da linhagem eritroide desde as *stem cells* hematopoéticas até aos eritrócitos (adaptado de Zivot A et al., 2018).

## 1.2. Anemia

A anemia consiste na diminuição da concentração de hemoglobina e, habitualmente, do hematócrito e do número de GV. A hemoglobina é a proteína presente nos GV responsável por carregar o oxigénio recebido nos pulmões aos restantes órgãos do organismo. Nas situações de anemia, onde a quantidade de Hb é menor, a capacidade de fornecimento de oxigénio é limitada (Bain, 2015).

Segundo os critérios da OMS, os valores limite de hemoglobina são <130 g/L para os homens e <120 g/L nas mulheres (WHO, 2011). No entanto, na literatura não há concordância com estes valores, por não terem em consideração a faixa etária, condições físicas, etnia e a altitude de residência (Ahmed, 2014). Beutler e Waalen (2006) definem os valores limite de diagnóstico da Hb consoante género, idade e etnia (Tabela 1).

Tabela 1: Valores limite de Hb que definem anemia (adaptado de Beutler e Waalen, 2006).

Etnia	Idade (anos)	Homem (g/L)	Mulher (g/L)
Caucasiana	20-59	137	122
	≥50	132	122
Africana	20-59	129	115
	≥60	127	115

### 1.2.1 Classificação morfológica

No estudo das anemias, o diagnóstico diferencial com base nos índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM) permite a classificação em 3 grandes grupos – anemia microcítica, anemia normocítica e anemia macrocítica.

Os índices eritrocitários de Wintrobe são calculados a partir da contagem de GV, concentração de Hb e hematócrito (Ht) (Fig. 2) (Nagao & Hirokawa, 2017).

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
$VCM = \frac{Ht}{GV} \times 10$	$HCM = \frac{Hb}{GV} \times 10$	$CHCM = \frac{Hb}{Ht} \times 10$

Figura 2: Cálculo dos índices eritrocitários. (A) Volume corpuscular médio (fL); (B) Hemoglobina corpuscular média (pg); (C) Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL).

A anemia microcítica e hipocrômica é caracterizada pela produção de GV com tamanho menor do que é normal ( $VCM < 80$  fL) e menor intensidade da cor vermelha, devido à diminuição da produção de Hb (Chaudhry & Kasarla, 2021; DeLoughery, 2014). Nas anemias microcíticas, a produção ineficaz de globina (talassemia), a distribuição de ferro restrita ao grupo heme da Hb (anemia de inflamação), a subprodução de grupo heme por deficiência em ferro (anemia ferropénica) e defeitos na síntese do grupo heme (anemia sideroblástica) são as causas da redução da síntese de Hb (Fig. 3) (DeLoughery, 2014).

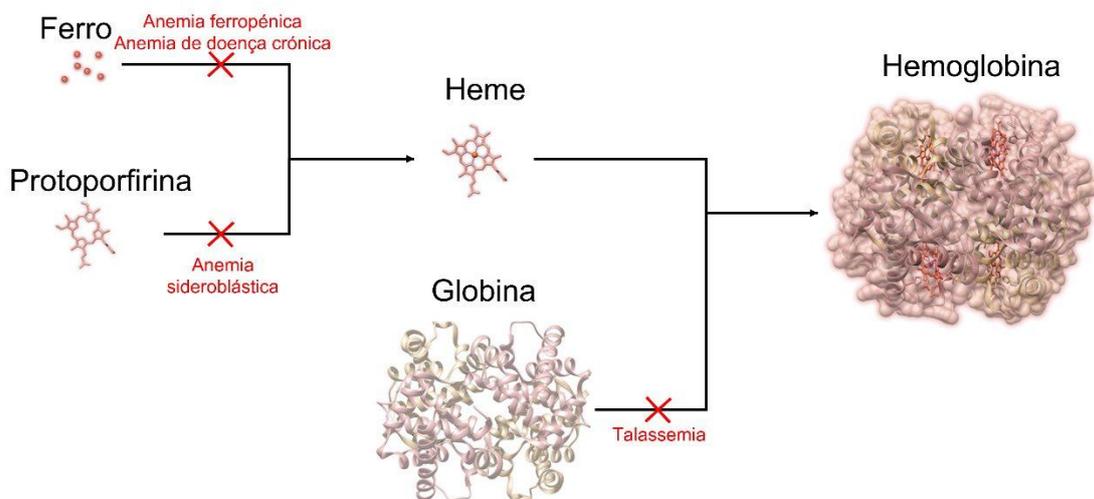


Figura 3: Causas de anemia microcítica. Défice em ferro (anemia ferropénica ou anemia de doenças crónicas), defeitos na síntese de protoporfirina (anemia sideroblástica) ou de globina (talassemia) (adaptado de DeLoughery, 2014).

A anemia normocítica e normocrômica ocorre devido a perdas de sangue, supressão da produção de GV ou hemólise. Nas perdas sanguíneas, a morfologia dos GV não apresenta alterações, exceto surgimento de policromasia nas primeiras 12 a 24 horas. Nos doentes com eritropoiese reduzida, a morfologia dos GV pode ser normal devido à baixa concentração de EPO, como é o caso dos doentes com complicações renais. No entanto, nas causas intrínsecas de eritropoiese ineficaz (por exemplo, mielodisplasia) e hemólise, a morfologia dos GV pode alterar-se e auxiliar no diagnóstico (Ford, 2013).

A anemia macrocítica (VCM > 100 fL) pode ser classificada como megaloblástica e não megaloblástica. A anemia megaloblástica deve-se à deficiência em vitamina B12 ou folato. A carência em vitamina B12 ou folatos provoca anormalidades na síntese de DNA, que inibe a divisão celular dos precursores eritrocitários (Fig.4). A anemia não megaloblástica é provocada por disfunção hepática, alcoolismo, síndrome mielodisplásica (SMD) ou hipotireoidismo (Nagao & Hirokawa, 2017). Na anemia megaloblástica, os GV apresentam normalmente VCM > 115 fL, com macrocitose oval acentuada. O volume dos GV na anemia não megaloblástica não é tão acentuada, tipicamente designado macrocitose redonda (Ford, 2013).

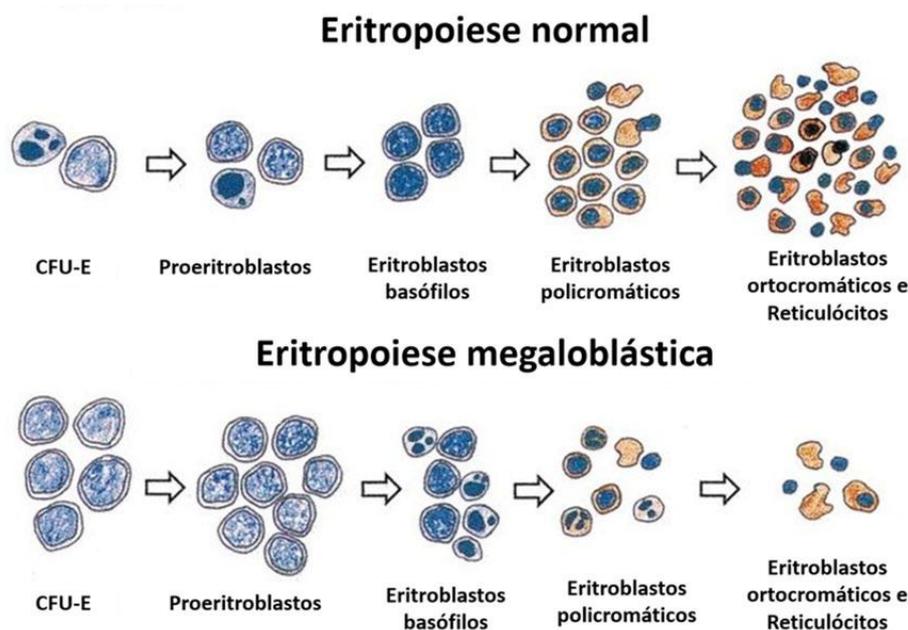


Figura 4: Comparação da eritropoiese normal com eritropoiese megaloblástica devido à carência em vitamina B12 ou folatos que compromete a síntese de DNA e, por conseguinte, a divisão celular dos precursores eritrocitários (adaptado de Koury et al., 1997).

## 2. Epidemiologia

A anemia nosocomial tem sido reportada na literatura por apresentar elevada frequência entre os doentes hospitalizados. A incidência da anemia varia entre 25% a 74%, de acordo com a população em estudo (Kurniali et al., 2014). As características da população dependem das comorbidades e fatores demográficos (idade e gênero) (Hayden, Albert, Watkins, & Swenson, 2012).

No estudo de Koch et al. (2013), aproximadamente 74% dos doentes não anêmicos, no momento de admissão, desenvolve anemia durante a hospitalização. A severidade da AAH neste grupo de pacientes manifestou-se como leve em 29%, moderado em 41% e severo em 30%. A prevalência de AAH é superior nos doentes com maior número de comorbidades, nos submetidos a intervenções cirúrgicas, sexo feminino e com idade superior em comparação aos doentes sem anemia. Os doentes do sexo masculino e os que estão hospitalizados em medicina interna desenvolvem anemia mais precocemente, em comparação aos pacientes do sexo feminino e os que são submetidos a cirurgia, respetivamente (Koch et al., 2013).

Nos pacientes internados por enfarte do miocárdio não anêmicos na admissão, 57,5% desenvolve anemia. De todos os doentes hospitalizados, a AAH leve ocorre em 37,4% ao fim de 26 horas (12,6-50 h;  $P < 0,001$ ) após admissão, 15,5% desenvolveu AAH moderada nas primeiras 20,2 horas (10,0-40,5 h;  $P < 0,001$ ) e a AAH severa ocorre em 4,6% após 17,1 horas internados (7,7-37,9 h;  $P < 0,001$ ) (Salisbury, Amin, et al., 2011).

A anemia está maioritariamente representada nas unidades de cuidados intensivos (UCI), onde estão os doentes mais vulneráveis (Corwin et al., 2004; Vincent et al., 2002).

A incidência de AAH é muito variável consoante o tipo de hospital e a sua localização. Num estudo efetuado nos Estados Unidos da América, verificou-se que o risco de desenvolver anemia nosocomial em hospitais de ensino é menor do que em hospitais não educacionais e é variável consoante o tamanho do hospital e a localização (Fig. 5) (Salisbury, Reid, Amin, Spertus, & Kosiborod, 2014).

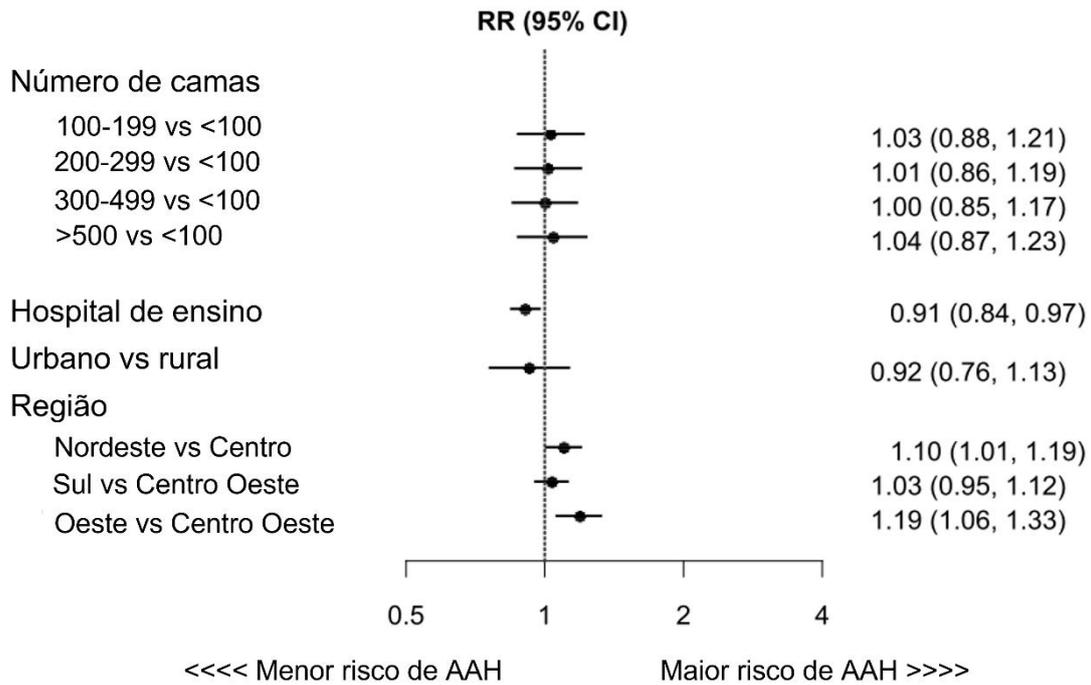


Figura 5: Associação entre as características dos hospitais e o risco de AAH (adaptado de Salisbury et al., 2014).

Em Portugal, não existem estudos epidemiológicos que avaliem a AAH. A anemia é altamente prevalente na população portuguesa e uma grande parte dos casos não está diagnosticada (Marques et al., 2016). O estudo da qualidade dos cuidados primários e hospitalares não inclui a avaliação da anemia e baseia-se numa análise ao nível regional. Não se verifica uma comparação dos riscos iatrogénicos entre hospitais de ensino e não educacionais (Alves et al., 2008; Duarte et al., 2021).

### 3. Etiologia

A anemia pode ocorrer devido à perda de sangue, eritropoiese ineficaz e diminuição do tempo de semivida dos eritrócitos. A origem da AAH resulta de várias causas, cuja contribuição para este tipo de anemia é difícil de determinar. A maioria dos internados que desenvolvem anemia durante o internamento aparenta não evidenciar perdas sanguíneas não detetadas, o que faz com que a perda de sangue por flebotomia seja a principal causa a desencadear AAH (Salisbury et al., 2010). No entanto, não existe um consenso entre diferentes estudos na etiologia da anemia nosocomial, o que faz com que seja tão complexa a sua compreensão (Bressman et al., 2021).

Outras causas de AAH incluem hemorragias excessivas, hemodiluição por administração de fluido intravenoso e compromisso da eritropoiese (Napolitano, 2004; Shander, 2004).

Nos estudos que excluem os doentes com anemia à admissão, não há interferência das causas de anemia crónica (sangramento gastrointestinal, insuficiência renal crónica, doença autoimune, entre outras) no estudo da etiologia da AAH (Meroño et al., 2012).

A tabela 2 sintetiza a etiologia e as causas de AAH nos doentes internados e criticamente doentes.

Tabela 2: Etiologia e causa da anemia adquirida em hospital (iatrogénicas e estado de saúde do doente) (adaptado de McEvoy & Shander, 2013).

Etiologia da anemia	Causas
Perda de sangue iatrogénica	Flebotomia
	Trauma
	Cirurgia
	Outros procedimentos médicos e terapêuticos
Eritropoiese ineficaz (caraterísticas dos doentes)	Deficiência em ferro
	Deficiência em folatos
	Deficiência em vitamina B12
	Deficiências nutricionais
Hemólise iatrogénica	Doença crónica
	Deficiência em eritropoietina
	Doenças renais
	Infeções
“Falsa” anemia	Desordens endócrinas
	Fármacos
	Hemodiluição

### 3.1. Perdas de sangue para diagnóstico

A flebotomia é a causa que mais contribui para o decréscimo da concentração da hemoglobina. A associação entre perda de sangue para diagnóstico e desenvolvimento de anemia consequente de hospitalização surgiu pela primeira vez na década 70. Por dia, a cada doente em UCI eram colhidos  $54 \pm 17$  mL de sangue com efeito no decréscimo do hematócrito (Eyster & Bernene, 1973).

Os doentes cujo óbito ocorreu tiveram mais sangue perdido por flebotomia do que aqueles que sobreviveram até ao fim do internamento. Os doentes internados em UCI também são sujeitos a maior volume de sangue colhido para análises laboratoriais, maior frequência de flebotomias diária (exceto UCI cardiovascular) e número médio de unidades de eritrócitos transfundidos superior do que nas restantes unidades de saúde.

Além disso, os doentes admitidos em UCI para transplante hepático, transplante renal e hematologia têm maior volume de sangue colhido. Em todas as unidades hospitalares, o volume de flebotomia é maior no dia de admissão e vai diminuindo ao longo dos dias de internamento e estabilizando até ao sexto dia. No sétimo dia, aos doentes em UCI cardiovascular foi retirado o maior volume de sangue,  $28,5 \pm 15,4$  mL, e o volume menor foi aos pacientes do serviço de enfermagem cirúrgica com  $8,6 \pm 8,1$  mL colhidos. Até ao dia 28 de internamento, as perdas de sangue por flebotomia diárias foram  $17,4 \pm 11,9$  mL em UCI cardiovascular,  $15,5 \pm 12,2$  mL em UCI geral e nas restantes unidades a média estimada foi inferior a 15 mL por dia. Após os 28 dias, há uma queda acentuada na perda de sangue para diagnóstico em todas as unidades de saúde (Quinn et al., 2019).

Nos doentes que desenvolvem anemia moderada a severa, o volume médio de sangue colhido para testes laboratoriais (173,8 mL) é superior do que nos doentes não anémicos até ao final do internamento (83,5 mL;  $p < 0,001$ ) (Salisbury, Reid, et al., 2011).

Por cada 1 mL de sangue colhido, a hemoglobina diminui em média  $0,07 \pm 0,011$  g/L e o hematócrito decresce  $0,019 \pm 0,003\%$ . Em média, são colhidos 75 mL de sangue por dia e o tempo de internamento é cerca de 6 dias. Para esta média, são perdidos 3,15 g/L de hemoglobina. Alterações entre 6,6 e 10 g/L de hemoglobina começam a ter significado clínico. Os pacientes que apresentam maiores níveis de hemoglobina/hematócrito apresentam maiores alterações nestes parâmetros durante a hospitalização. Nestes casos os pacientes perdem mais glóbulos vermelhos por mL de sangue colhido, com diminuição mais acentuada de hemoglobina e hematócrito. Em alternativa, se no momento de admissão hospitalar, os pacientes estiverem em estado de desidratação, ocorre também um decréscimo abrupto de hemoglobina e hematócrito após reidratação, além da flebotomia (Thavendirathan et al., 2005).

Um modelo matemático simulou que, para colheitas de 53 mL de sangue por dia em adultos com peso normal, com concentração de hemoglobina inicial dentro da média dos valores de referência e eritropoiese ativa, os doentes ficam anémicos entre 40 e 70 dias de internamento. Mas se o doente estiver abaixo de peso, com níveis de hemoglobina no limite inferior normal e eritropoiese reduzida, com flebotomias frequentes, o modelo estima que ocorra uma redução de 70 g/L de Hb ou menos aos 9-14 dias (Lyon, Chin, Slotsve, & Lyon, 2013). As características destes doentes coincidem com os doentes admitidos nas unidades de cuidado intensivo e de tratamento coronário, que são

submetidos a exames laboratoriais com maior frequência (Sanchez-giron & Alvarez-mora, 2008).

O número de extrações diárias depende da patologia do doente. Nas unidades de Cirurgia Cardíaca e Unidade Coronária, são efetuadas mais colheitas sanguíneas por doente durante as primeiras horas após admissão, por conseguinte perdem mais sangue pela frequência aumentada de análises laboratoriais. Os doentes internados por traumatismo neurológico e patologias cardiovasculares têm maior alteração da concentração de Hb (Maqueda-Palau & Pérez-Juan, 2018). No estudo de Vincent et al. (2002), considera-se que a perda de sangue por flebotomia não é um fator causal independente da AAH, uma vez que esta é multifatorial. Pode estabelecer-se uma correlação positiva entre a disfunção dos órgãos e a frequência de colheitas e o volume de sangue colhido.

Apesar do reconhecimento da anemia provocada por perdas de sangue para diagnóstico nos doentes em UCI, no contexto atual de pandemia pelo coronavírus SARS-CoV-2, a gestão da frequência de testes laboratoriais e o volume de sangue colhido foi descuidada nos doentes com doença COVID-19 aguda. Ao longo do internamento em UCI, o nível de Hb médio diminuiu progressivamente e a necessidade de transfusões sanguíneas aumentou. O desenvolvimento de anemia nos doentes não anémicos à admissão ocorreu em média ao terceiro dia. O volume médio de sangue colhido para testes de diagnóstico diariamente corresponde a 21,7 mL (18,7-26,7 mL). Nos doentes que receberam transfusão sanguínea tiveram maior volume de sangue colhido por dia (2,7 mL) do que os pacientes que não foram transfundidos (Beverina, Borotto, Novelli, Radrizzani, & Brando, 2021).

Além da AAH, a flebotomia também contribui para o aumento da frequência de transfusões sanguíneas, que por si só aumentam o risco de mortalidade (Bodley et al., 2021). No estudo de Chant, Wilson, Friedrich e Friedrich (2006), foi demonstrado que em pacientes internados por mais de 21 dias o número de unidades de GV transfundidos é significativamente correlacionado com o volume diário de flebotomia, independentemente de outros fatores de confusão.

### 3.2. Outras perdas de sangue iatrogénicas

Existem outros mais procedimentos médicos que são potenciais indutores de anemia nosocomial. A plasmaférese é um tratamento para vários tipos de complicações, mas pode ser também uma fonte de perdas de sangue cumulativas, por não ser possível devolver na totalidade o sangue do paciente após este procedimento (Schwartz et al., 2016). Os doentes que são sujeitos à plasmaférese durante o internamento hospitalar, necessitam também de realizar exames laboratoriais e, em média, perdem 200 mL por estadia em internamento no total por lhes ser executado as duas técnicas (Mann et al., 2017).

Os pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos mantêm por mais dias os níveis de hemoglobina reduzidos do que pacientes clínicos. O tipo de cirurgia faz variar as tendências no desenvolvimento da anemia, assim como os cuidados que se tem para evitar as perdas sanguíneas (Bremer, Schiele, Sagkob, Palmaers, & Tschakowsky, 2004).

Os ventiladores mecânicos podem provocar stress fisiológico nos doentes submetidos por mais de 48 horas, que contribui para perdas de sangue por sangramento gastrointestinal superior induzido por stress (Rawal, Kumar, Yadav, & Singh, 2016). Os doentes submetidos à ventilação mecânica são sujeitos a flebotomias frequentes para monitorização da evolução do estado médico. Quando os pacientes estão ventilados mecanicamente por mais de 24 horas, perdem em média 50 mL apenas para gasometria (Shaffer, 2007).

Os procedimentos à cabeceira do doente, tais como colocação de cateteres venosos centrais, cateteres arteriais e tubos torácicos, tratamento de feridas, acesso de fístula para diálise, ocorrem com frequência crescente nas UCI, com potencial associação a perdas sanguíneas profundas e por vezes desnecessárias (Barie, 2004). Nos doentes internados com cateter arterial e/ou central, os exames ao sangue aumentaram 33% e a perda de sangue é 44% superior em comparação aos pacientes com apenas acesso periférico (Low, Harrington, & Stoltzfus, 1995).

Nos doentes internados com enfarte do miocárdio, o tratamento com medicamentos trombolíticos, antitrombóticos e antiplaquetários e procedimentos de revascularização coronária contribuem para perdas de sangue iatrogénicas, aumentando o risco de anemia (Mahendiran et al., 2020; Rao et al., 2007).

### 3.3. Hemodiluição

A hemodiluição é a diluição da massa eritrocitária, habitualmente resultado de ressuscitação volêmica, e não se considera como fonte de perda de GV. A diminuição da concentração de hemoglobina não corresponde a uma verdadeira anemia, devido à diminuição do hematócrito consequente do aumento do volume plasmático (Fig. 6) (Van et al., 2011).

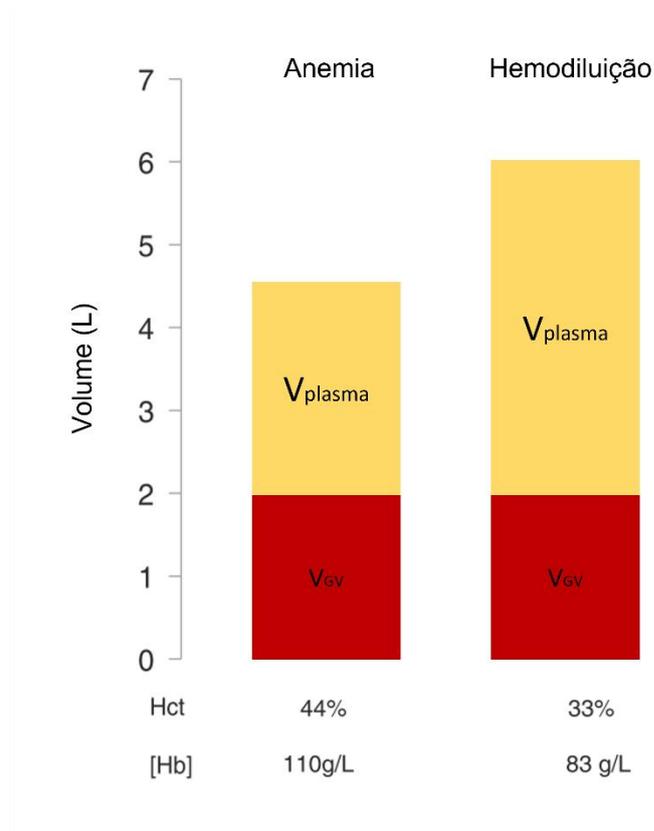


Figura 6: Comparação da hemodiluição e da anemia na concentração de Hb e no valor do hematócrito (adaptado de Astin & Puthuchear, 2014).

Nos doentes com maior risco de enfarte agudo do miocárdio (classe II-IV, segundo os critérios de Killip), a anemia é mais prevalente, o que sugere que a hemodiluição contribui para a anemia. A retenção de fluídos, medicamentos e fluídos intravenosos são responsáveis pelo surgimento de hemodiluição como consequência de enfarte do miocárdio (Aronson et al., 2007).

Os doentes sujeitos a hemodiluição normovolémica aguda perdem sangue devido à hemodiluição e durante procedimento operatório. Nestes pacientes é esperado anemia durante a cirurgia (Murray, 2004).

Nos pacientes que recebem colóides como terapia no perioperatório, a hemodiluição iatrogénica provoca diminuição da concentração de Hb, que compromete a distribuição de oxigénio aos órgãos (Lai et al., 2015).

A hemodiluição iatrogénica contribui para a diminuição da concentração de Hb abaixo do limite estabelecido para requisitar transfusões sanguíneas aos doentes sem sangramento significativo (Perel, 2017).

### 3.4. Eritropoiese ineficaz

A eritropoiese consiste na produção de eritrócitos na medula óssea por estímulo da hormona eritropoietina, que é uma citocina glicoproteína produzida rim. Indivíduos saudáveis produzem diariamente 15 mL de GV e em situação de necessidade têm a capacidade de gerar 200 mL (Hillman & Henderson, 1969). Em contrapartida, os pacientes em estado crítico não terão a mesma capacidade de resposta numa situação de perda de sangue contínua, como flebotomias diárias.

Mesmo os doentes em UCI que não desenvolveram anemia, o nível de Hb também reduziu. A maioria dos internados em UCI está em carência nutricional e toma fármacos que podem suprimir a medula óssea. Uma minoria desenvolve infeção e os antibióticos podem inibir a eritropoietina (El-soussi, Asfour, & Raffat, 2016).

Nos doentes com enfarte do miocárdio, verificou-se que a insuficiência renal aguda e a doença renal crónica estão fortemente correlacionadas com o desenvolvimento de anemia nosocomial (Choi et al., 2013). Na doença renal, a síntese da eritropoietina está reduzida devido à ineficácia da função renal (Mercadal et al., 2012).

Os doentes com doenças crónicas têm estados inflamatórios aumentados, o que faz com que a eritropoiese esteja inibida pelo excesso de citoquinas. As citoquinas associadas à inflamação e à infeção (IL-1, TNF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) inibem a transcrição de eritropoietina nas células renais justaglomerulares e comprometem a resposta à

eritropoietina na medula óssea, por interferência na proliferação dos progenitores eritroides (DeBellis, 2007).

Alguns fármacos têm efeito supressor na liberação de eritropoietina, que contribui para o desenvolvimento de anemia nos doentes nas UCI. Os fármacos mais utilizados são inibidores do enzima conversor da angiotensina e bloqueadores dos recetores da angiotensina, bloqueadores dos canais de cálcio, teofilina e bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos (Hayden et al., 2012).

### 3.5. Deficiência em ferro

Nos doentes em estado crítico, o estado inflamatório contribui para o aumento de hepcidina, que por sua vez leva a que os macrófagos sequestram o ferro. A concentração de ferro circulante diminui, provocando eritropoiese com restrição em ferro (Ganz, 2006). A adsorção de ferro da dieta é dificultada pelo efeito inibitório da hepcidina sobre a ferroportina ao nível das células intestinais (Fig. 7) (Nemeth et al., 2004).

O perfil do estudo do ferro nos doentes internados em UCI caracteriza-se por baixa concentração de ferro sérico, baixo nível e baixa saturação de transferrina e concentração de ferritina sérica aumentada, devido ao estado inflamatório e reação de fase aguda. Como há menor concentração de ferro em circulação, a eritropoiese é ineficaz por haver menos ferro para integrar a Hb (Fink, 2004).

Os doentes admitidos em hospital com deficiência em ferro, mas ainda sem anemia, podem desenvolver anemia mais rapidamente. O volume de sangue perdido por flebotomia ou outras intervenções médicas estimulam a eritropoiese, mas que será ineficiência devido à falta de ferro (Ahmed, 2014).

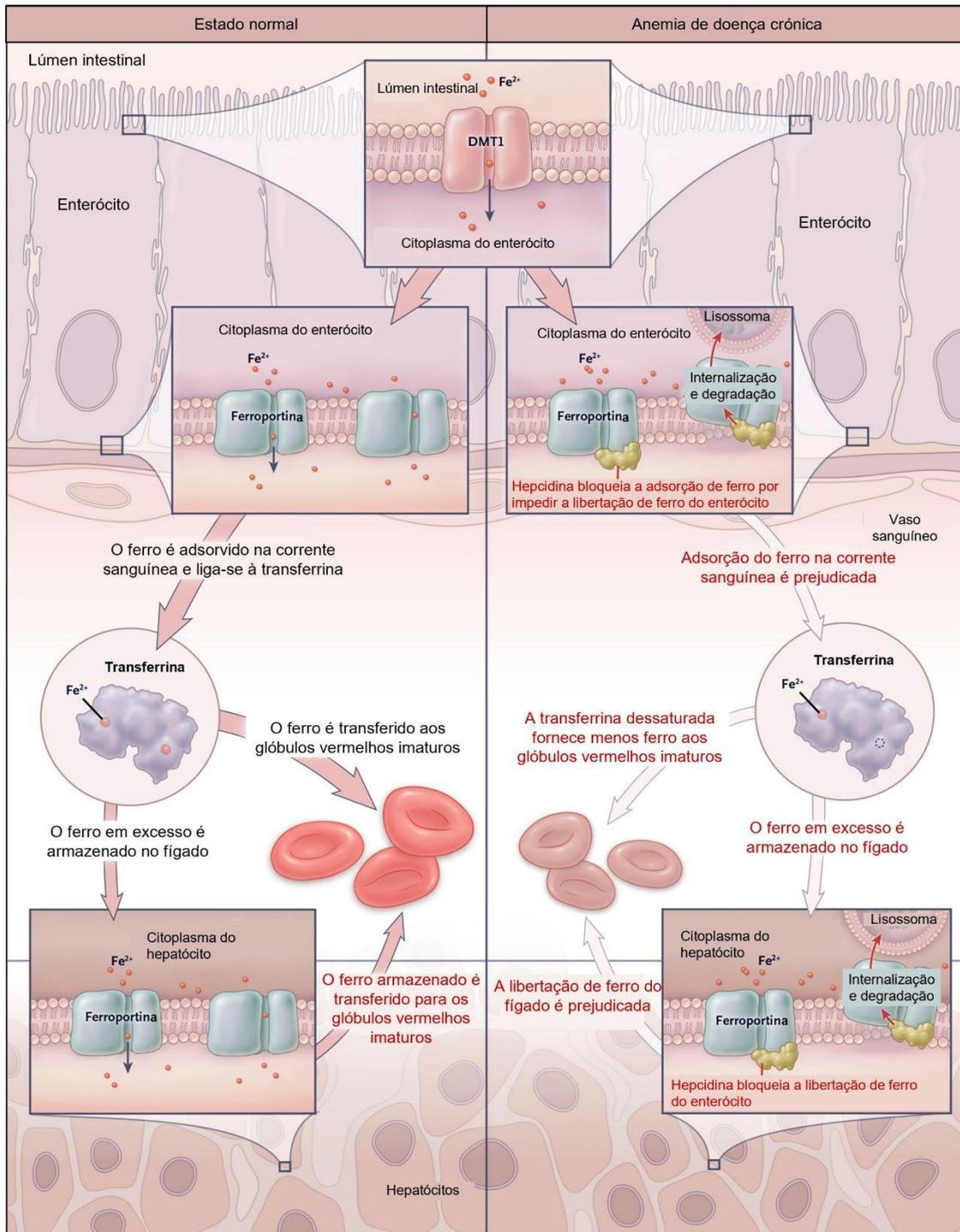


Figura 7: Mecanismo da anemia de doença crônica. Nos indivíduos saudáveis, o ferro é absorvido no trato gastrointestinal e é transportado na corrente sanguínea pela transferrina para os GV imaturos. Nos doentes com doença crônica, o estado inflamatório provoca a diminuição da absorção de ferro que resulta na redução da saturação de transferrina e dificulta a liberação de ferro armazenado. O fornecimento de ferro aos GV imaturos é reduzido. Estas alterações são mediadas pela hepcidina que se liga e inibe a ferroportina (proteína responsável pela exportação de ferro). DMT1 é uma proteína transportadora de metal divalente 1 que permite a entrada de ferro do lúmen intestinal para os enterócitos e não sofre alterações (adaptado de DeLoughery, 2014).

### 3.6. Hemólise induzida por fármacos

A anemia hemolítica induzida por fármacos é um fenómeno raro e grave consequente da destruição dos eritrócitos pelos macrófagos que são ativados pelo fármaco administrado ao doente (McEvoy & Shander, 2013).

Os fármacos mais comuns responsáveis por provocar anemia hemolítica são  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporinas e derivados de penicilina, tal como, piperacilina), anti-inflamatórios não esteroides (diclofenaco e ibuprofeno), antineoplásicos (fludarabina), entre outros medicamentos como metildopa e alcaloides quinólicos (McEvoy & Shander, 2013).

Nesta situação de AAH, a única forma de tratamento é descontinuar o fármaco que induz os macrófagos na destruição dos eritrócitos (Garratty, 2012).

#### 4. Fatores de risco

Os principais fatores que desencadearam anemia moderada e grave são o tempo de internamento e procedimentos de diagnóstico ou terapêutica mais invasivos (Makam, Nguyen, Clark, & Halm, 2017). Os doentes não anêmicos tiveram menor tempo de internamento e a readmissão hospitalar foi menos frequente, em comparação com os doentes com AAH, que tiveram maior taxa de mortalidade (Randi et al., 2020).

O volume de sangue médio cumulativo perdido para diagnóstico laboratorial é 545 mL durante todo o tempo de internamento (Koch et al., 2015). Por cada 50 mL de sangue colhido por flebotomia, o risco de AAH moderada a severa aumenta 18% (Salisbury, Reid, et al., 2011).

## 5. Preditores de AAH

Os doentes mais suscetíveis a desenvolver AAH moderada e severa são do sexo feminino, em internamento eletivo (não de urgência), com creatinina sérica na admissão, razão de BUN para creatinina superior a 20 para 1, tempo de internamento hospitalar e foram submetidos a grande procedimento de diagnóstico ou terapêutico (Makam et al., 2017). Os doentes críticos são os mais vulneráveis a desenvolver anemia nosocomial, por necessitarem mais testagem laboratorial e por isso maior quantidade de sangue colhido (Chornenki et al., 2019).

Os preditores de alteração da concentração de hemoglobina e do hematócrito são o volume total de sangue colhido, tempo de internamento, quantidade de hemoglobina na admissão (pacientes com maior concentração inicial têm maior variação), idade (mais jovens também com maior alteração da hemoglobina), depleção do volume intravascular na admissão e valor de CCI menor. Destes parâmetros, o volume de flebotomia é o mais significativo, sendo que por 1 mL de sangue colhido, a Hb diminui  $0,070 \pm 0,011$  g/L e o hematócrito desce  $0,019 \pm 0,003$  %. O nível de Hb e hematócrito na admissão, depleção do volume intravascular e a idade são parâmetros também com significância na variação da Hb e hematócrito (Thavendiranathan et al., 2005).

Outro preditor de anemia são os doentes com doença renal crónica nas fases III-IV, onde reduzidos níveis de TFG estão associados a baixa concentração de hemoglobina (Aronson et al., 2007). Nos pacientes com AAH e doença renal, a taxa de mortalidade é superior em comparação aos doentes com AAH e sem doença renal. O agravamento da AAH nos doentes com doença renal deve-se à atividade ineficaz da eritropoietina (Choi et al., 2013).

Os doentes admitidos com valor de PCR aumentado têm maior risco de desenvolver anemia nosocomial, por influência do estado inflamatório. No estudo de Meroño et al. (2012), o nível de PCR no momento de admissão hospitalar no grupo de doentes com anemia nosocomial corresponde a  $5,7 \pm 0,8$  mg/dL ( $P < 0,001$ ), enquanto os pacientes que mantiveram os níveis de Hb ao longo da hospitalização apresentaram valores inferiores de PCR à admissão ( $2,4 \pm 0,2$ ;  $P < 0,001$ ).

Mesmo os doentes internados não anémicos, o nível de Hb decresce durante a permanência em UCI, devido à exposição dos fatores que contribuem para a AAH. A

queda de Hb não é tão acentuada para desenvolver anemia, pois a Hb na admissão era maior em relação aos pacientes admitidos e que desenvolveram anemia. A Hb à admissão é um fator de proteção contra a aquisição de anemia nosocomial (El-soussi et al., 2016).

Nos doentes que são internados por queimaduras corporais, os fatores de risco para desenvolver AAH moderada a severa na 4.<sup>a</sup> semana de hospitalização são o volume de sangue colhido para diagnóstico nos 28 dias de internamento, volume total de sangue colhido antes da hospitalização de 28 dias, área e espessura total de superfície corporal queimada. Os doentes com maior área de superfície corporal queimada estão mais suscetíveis a desenvolver AAH, porque na fase final de queimaduras graves há grande quantidade de líquidos exsudados da corrente sanguínea. O sangue fica hemoconcentrado e há maiores perdas de eritrócitos e Hb por mL de sangue colhido para análises clínicas. Relativamente à necessidade de corrigir a AAH através de transfusões sanguíneas, depende do volume total de flebotomia ao fim de 90 dias de internamento, área e espessura total de superfície corporal queimada, estado de lesões por inalação, traqueostomia, número de operações e tempo nos UCI. Destes parâmetros, apenas a área total de superfície corporal queimada, número de operações, duração em UCI e período de internamento são considerados fatores de risco independentes do volume elevado de transfusão sanguínea (Yao et al., 2020).

Nas maternidades, os recém-nascidos prematuros são mais suscetíveis a adquirir anemia, devido ao volume de sangue no nascimento dependente do clameamento precoce do cordão umbilical, à taxa de eritropoiese e à quantidade de sangue perdido durante a colheita de sangue (Papa et al., 2011). O sangue perdido para diagnóstico afeta principalmente os bebés prematuros de peso muito baixo no nascimento (PMBN, <2,500 g) e de peso extremamente diminuído no nascimento (PEBN, <1,500 g) (Cibulskis, Maheshwari, Rao, & Mathur, 2021). Nas primeiras 6 semanas de vida, os bebés prematuros nas UCI perdem 15 a 30% do volume de sangue circulante devido às colheitas sanguíneas para diagnóstico (Carroll & Widness, 2012). Ao longo da hospitalização, 40% dos bebés PMBN e 90% dos bebés PEBN recebe pelo menos uma transfusão sanguínea (Cibulskis et al., 2021).

No estudo de Valentine e Bateman (2012), numa UCI pediátrica, o volume de sangue descartado consequente de flebotomia é significativamente maior nos cateteres venosos centrais do que nos periféricos ( $143\% \pm 39\%$ ;  $p < 0,001$ ).

Antes de colher sangue por um cateter venoso central, uma porção do sangue é descartada antes da colheita para diagnóstico a fim de evitar a contaminação com fluídos intravenosos. Coene, Roos e Scharnhorst (2015) repararam que há grande variação de volume de sangue descartado, entre 0,8 mL e 13,8 mL, dependendo do enfermeiro que efetua a técnica, quando o volume suficiente para garantir resultados laboratoriais fidedignos é de 5 mL.

## 6. Manifestações clínicas

Quando a anemia nosocomial começa a desenvolver-se, as pequenas variações de hemoglobina podem passar despercebidas pelos clínicos. Nesta fase a anemia pode ser assintomática ou então os sintomas podem ser camuflados pela doença que levou à hospitalização. Na maioria dos doentes, os sintomas de fadiga, mal-estar, falta de ar, tonturas só são detetados quando há um acentuado decréscimo de Hb, sendo necessário recorrer a transfusão sanguínea (Chandrashekar, 2018). A anemia é principalmente debilitante em pacientes idosos com doença crónica, resultando em pior prognóstico (Rawal et al., 2016). Os doentes que desenvolvem anemia têm maior risco de desenvolver complicações cirúrgicas, infeções, enfarte agudo do miocárdio, lesão renal, progressão e recorrência de cancro, acidente vascular cerebral e mortalidade, bem como aumento do tempo de internamento e risco aumentado de readmissão em UCI (Shander & Corwin, 2020). A anemia diminui a capacidade de fornecimento de oxigénio aos órgãos, que implica uma compensação no débito cardíaco (Wang & Klein, 2010).

A AAH está associada a um risco de mortalidade e utilização de recursos superiores em comparação aos doentes não anémicos durante todo o período de internamento. Até mesmo a AAH leve está associada ao aumento da utilização de recursos, no entanto não contribui para o aumento da mortalidade hospitalar (Koch et al., 2013). Entre os doentes intubados, o risco de reintubação ou o insucesso do desmame do ventilador mecânico é superior nos doentes com concentrações diminuídas de Hb (Rawal et al., 2016).

No estudo de Salisbury, Amin, et al. (2011), os doentes internados por enfarte do miocárdio que adquiriram AAH leve não apresentam a risco de mortalidade aumentada, uma vez que as alterações provocadas pela anemia, como supressão do fornecimento de oxigénio ao miocárdio e aumento da ativação neuro-hormonal, são menos prováveis ocorrer derivado de anemia leve. A AAH severa é a única que está independentemente associada a maior probabilidade de readmissão ou morte nos 30 dias após alta hospitalar, quando comparado a doentes sem anemia (Makam et al., 2017).

Nos pacientes em estado crítico, a anemia pode afetar a função plaquetária e a interação entre plaquetas e parede vascular. A menor disponibilidade de plaquetas em agregar em lesões endoteliais resulta na perda de mais sangue, comprometendo a capacidade de tolerar a anemia. (DeBellis, 2007).

Nos bebês prematuros, a saturação regional de oxigênio cerebral (rSO<sub>2</sub>) diminui com a gravidade da anemia desenvolvida. Quando rSO<sub>2</sub> cerebral atinge valores abaixo de 50% e a tensão arterial diminuí, o risco de efeitos adversos no desenvolvimento neurológico agrava nos bebês prematuros (Cibulskis et al., 2021). Em adultos saudáveis a redução dos níveis de Hb para 5 g/dL aumenta ligeiramente o tempo de reação e prejudica a memória imediata e tardia reversivelmente (Weiskopf et al., 2000). Esta situação pode ser uma hipótese que justifique a relação entre anemia e delírio nas UCI (Hayden et al., 2012).

## 7. Prevenção e resolução da anemia nosocomial

Como a AAH é multifatorial, programas preventivos também devem ser multimodais a identificar os fatores de risco da AAH (Tabela 3) (Salisbury et al., 2014).

É importante realizar análises clínicas de forma criteriosa, tendo em conta o hemograma dos pacientes, de modo a diminuir o risco de desenvolver anemia por frequentes flebotomias. As perdas de sangue para diagnóstico laboratorial podem ser mitigadas com a utilização de tubos de colheita de tamanho pediátrico, aproveitamento das amostras de soro devidamente armazenadas no caso de acréscimo de exames laboratoriais, diminuição da frequência de flebotomias, reporte de volume cumulativos de colheitas de sangue aos médicos e educação dos profissionais de saúde sobre os riscos da AAH através da instrução de melhorias práticas de prescrições de exames (Tabela 3) (Dale & Ruby, 2003; Sanchez-giron & Alvarez-mora, 2008; Tinmouth, McIntyre, & Fowler, 2008). A eliminação de ordens automatizadas de análises resulta na diminuição da frequência de testes diários em 15-20% (Tabela 3) (Sadowski, Lane, Wood, Robinson, & Kim, 2017).

Atualmente os laboratórios estão equipados com analisadores modernos que precisam apenas de 100 µL a 200 µL de amostra para processar as análises requisitadas. Nos tubos de tamanho pediátrico o volume desperdiçado após análise laboratorial é 74% do volume colhido, enquanto que a percentagem de volume inutilizado nos tubos *standard* é 91%, o que demonstra que os tubos de tamanho menor não comprometem a eficácia dos exames laboratoriais (Sanchez-giron & Alvarez-mora, 2008). No entanto, as amostras com fibrina e os erros laboratoriais aumentaram significativamente (fibrina 0,3%;  $p < 0,001$ ; erros totais 0,4%,  $p = 0,03$ ) (Myles, Wielligh, Kyriacou, Ventrice, & To, 2018). Em testes laboratoriais específicos, como coagulação especial, medicina da transfusão e testes de laboratórios de referência, a utilização de tubos de colheita pediátricos não permite a colheita de sangue com volume suficiente para realização de todos os exames. Os testes que implicam o processamento em vários equipamentos exigem várias alíquotas e maior volume de sangue colhido pode ser necessário (Wu et al., 2021). Adam et al. (2018) verificou que no estudo da coagulação de rotina os tubos de citrato de sódio com tamanho pediátrico (1,8 mL) são igualmente eficazes como os tubos de citrato de sódio de tamanho *standard* (3mL). Ainda assim, verifica-se que o aumento do volume de sangue colhido e maior número de testes realizados não corresponde ao

aumento da qualidade dos cuidados de saúde e na melhoria dos resultados dos pacientes (Branco et al., 2012). No final, a adoção de tubos de tamanho pediátrico contribui para a diminuição da perda de sangue e, conseqüentemente, frequência de anemia devido à flebotomia e necessidade de transfusão sanguínea nos doentes em estado crítico (Dolman et al., 2015). Além de se salvaguardar a recuperação dos doentes, prevenir a AAH tem efeitos positivos diretos nos custos hospitalares pela diminuição de exames laboratoriais desnecessários e a mudança para tubos de colheita de tamanho menor não acrescenta valor às despesas em saúde (Salisbury, Reid, et al., 2011).

Nas UCIN, o volume de sangue colhido para testes laboratoriais é 19% superior à quantidade solicitada pelo laboratório hospitalar. A utilização de tubos evidentemente marcados é uma forma de colmatar os excessos de sangue colhido (Lin et al., 2000). A utilização de cateteres arteriais umbilicais em recém-nascidos para análise de gasometria e química em dispositivos de POCT permite a redução de volume cumulativos de transfusão de GV. Estes dispositivos proporcionam a devolução da maior parte do sangue e a redução de testes analíticos em laboratório (Widness et al., 2005).

A avaliação da gasometria arterial pode ser substituída por métodos não invasivos POCT para medição de CO<sub>2</sub> e SpO<sub>2</sub> (saturação periférica de oxigênio). Assim não há necessidade de colocar cateteres arteriais, contribuindo para a redução do volume de sangue perdido por consequência de intervenções iatrogênicas (Astles, 2009). Alternativamente, a colheita de sangue com seringas de 1 mL permite a redução de 60% do volume colhido em comparação com seringas de 3 mL. Se o volume de extração entre 0,3 mL e 0,5 mL fosse adotado pela equipa de enfermagem, a perda de sangue para hemogasometria seria menor, sem afetar a eficácia laboratorial (Jensen & Markewitz, 2016).

Apesar dos mecanismos de conservação de sangue serem uma solução para reduzir o volume perdido para flebotomia, não é solução viável porque podem originar infeções bacterianas por facilitar a colonização de bactérias, que também é outra complicação nosocomial que piora o prognóstico e aumenta o risco de mortalidade (Oto et al., 2012; Page, Retter, & Wyncoll, 2013).

Nas cirurgias onde é expectável ocorrer grandes perdas sanguíneas, deve-se recorrer ao uso de fármacos antifibrinolíticos e dispositivos de recuperação intraoperatória de sangue para reduzir as perdas sanguíneas (Tabela 3) (Koch et al., 2013).

Principalmente nos doentes que desenvolvem febre pós-operatória precoce, há que ter especial precaução na realização de hemoculturas. A febre nas primeiras 48 horas após a cirurgia é um acontecimento normal e geralmente não tem origem infecciosa, desde que tenha havido esterilidade e não tenha ocorrido aspiração durante a anestesia (O'Grady et al., 2008).

As deficiências em ferro não identificadas podem ser um objetivo a corrigir de modo a prevenir e controlar AAH. Como o *screening* do perfil do ferro não é um exame de rotina, o hemograma é a solução para identificar os doentes que provavelmente desenvolveriam anemia nosocomial durante o internamento, através de RDW aumentado e VCM diminuído. A identificação destes pacientes pode auxiliar na seleção dos doentes que mais beneficiariam da testagem da deficiência em ferro e, se necessário, da suplementação com ferro (Salisbury et al., 2012).

As diretrizes não orientam corretamente a avaliação das causas da anemia nos doentes hospitalizados, onde a maioria dos doentes internados apresenta anemia devido a doença crónica (Bressman et al., 2021).

A identificação das causas da anemia é importante para gestão apropriada da anemia, pelo apoio de testes laboratoriais básicos que incluem ferro sérico, ferritina, saturação da transferrina, vitamina B12, folato, contagem de reticulócitos, hemoglobina dos reticulócitos, hemograma, haptoglobina e painéis metabólico completo, de coagulação e de coagulação intravascular disseminada (DeBellis, 2007).

Após alta hospitalar, o acompanhamento ambulatorio dos pacientes com AAH é importante para resolver a anemia e melhorar o prognóstico ao diminuir o risco de mortalidade e de readmissão hospitalar (Salisbury, Kosiborod, et al., 2011).

O trabalho dos profissionais de saúde é fundamental para prevenir as complicações da AAH, através da identificação dos doentes com maior risco de desenvolver anemia, da avaliação dos fatores de risco, aplicação de estratégias para diminuir as perdas de sangue iatrogénicas, monitorização da concentração de oxigénio e dos parâmetros hematológicos e avaliação nutricional dos pacientes (El-soussi et al., 2016).

Tabela 3: Causas, fatores de risco e prevenção/tratamento da AAH (adaptado de Martin & Scantling, 2015).

<b>Causa</b>	<b>Fator de risco</b>	<b>Prevenção/Tratamento</b>
Perdas sanguíneas cirúrgicas	Tipo e urgência da cirurgia Coagulopatias	Agentes hemostáticos
Procedimentos à cabeceira	Doentes criticamente doentes Coagulopatias	Técnicas meticulosas
Flebotomia	Doentes criticamente doentes Outros doentes	Educação dos profissionais de saúde
Hemodiluição	Ressuscitação massiva	Educação dos profissionais de saúde
Induzido por fármacos	Antibióticos e quimioterapia	Cuidado reforçado
Coagulopatias	Choque, sepsis, cronicidade, iatrogenia	Identificação e correção precoce
Supressão da medula óssea	Sepsis, induzido por fármacos	Tratamento de problemas adjacentes

Modelos de inteligência artificial, que utilizam métodos de *deep learning*, permitem prever os riscos de AAH com 24-96 horas de antecedência, através do processamento dos dados clínicos não estruturados (Goodwin & Demner-Fushman, 2020).

## 8. Terapêutica

Os doentes que desenvolvem anemia por perdas de sangue oriundas de procedimentos médicos podem ser suplementados com ferro, pois perdas sanguíneas levam à diminuição das reservas do ferro, a ferritina, provocando anemia ferropénica. Este problema pode ser resolvido com a terapia oral de ferro e adicionalmente vitamina C para facilitar a absorção do ferro. Ao fim de 7 a 10 dias, deve avaliar-se os níveis de reticulócitos para avaliar a resposta à terapêutica. Se não houver recuperação após suplementação oral, tem de se avançar para administração via parentérica (Ahmed, 2014). Em Portugal, estão disponíveis duas formulações de ferro IV aprovadas pela Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde (INFARMED), nomeadamente, sacarose de ferro (<14 anos) e carboximaltose férrica (≥14 anos) que não requerem teste prévio e permite a administração de grandes quantidade de ferro numa única dose (Lopes et al., 2020). No entanto, nos doentes com infeções bacterianas, a diminuição dos níveis de ferro sérico é um mecanismo de defesa do organismo à sepsis e, por isso, o tratamento da anemia com ferro (e transfusões) é contraproducente, por contribuir para o aumento da proliferação das bactérias que sequestram o ferro do organismo (Randi et al., 2020; Rawal et al., 2016).

A utilização de eritropoietina humana recombinante é uma mais-valia para recuperar os níveis de hemoglobina e garantir a sobrevivência dos indivíduos que sofreram sangramento gastrointestinal, trauma, cirurgia geral, cardíaca, ortopédica ou queimaduras (Ball & Winstead, 2008). No entanto, os fármacos que estimulam a eritropoiese apenas reduzem o risco de transfusão e não de adquirir anemia, fazendo com que a prevenção de perdas de sangue iatrogénicas seja a melhor forma de prevenir a anemia nosocomial (Whitehead et al., 2019).

Nos bebés prematuros PEBN, a combinação de EPO, ferro, vitamina B12 e folatos como terapêutica nas primeiras semanas após nascimento contribui para a mitigar as transfusões como tratamento de anemia. Quando as transfusões são o último recurso para tratar os bebés prematuros, as unidades de RBC devem ser desleucocitadas, para diminuir o risco de transmissão de CMV, e ser irradiadas nos prematuros com peso abaixo de 1200 g, sendo que na verdade a maioria das maternidades aplica a todas as crianças, a fim de evitar doenças associadas à transfusão por rejeição dos componentes transfundidos (Cibulskis et al., 2021).

O tratamento por transfusões sanguíneas deve ser evitado ao máximo, uma vez que constituem um risco de morbidade e custos acrescidos (Murphy et al., 2007). O risco de mortalidade é menor quanto menos unidades foram administradas aos doentes (Akbas, 2019). As transfusões de RBCs estão associadas a complicações infecciosas e inflamatórias e a erros transfusionais que podem provocar reações alérgicas, febre, reação hemolítica aguda devido a incompatibilidade, lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI), sobrecarga circulatória associada à transfusão (TACO) e imunomodulação relacionada à transfusão (TRIM) (McEvoy & Shander, 2013). A restrição de transfusões em situações de hemoglobina abaixo de 70 a 80 g/L permite diminuir a percentagem de doentes expostos à transfusão (Carson et al., 2016).

## 9. Otimização do sangue em Portugal

A implementação de programas de otimização do sangue dos pacientes ou *Patient Blood Management* (PBM) em Portugal tem o objetivo de melhorar os resultados em saúde dos doentes, uma vez que a prevalência de anemia é muito elevada (19,9%). Estas medidas contribuem para a diminuição da anemia e deficiência em ferro, das transfusões sanguíneas, da taxa de mortalidade, das complicações, do período de internamento e da taxa de reinternamento. Além disso, o consumo de recursos e os custos em Saúde são minimizados devido às medidas de conservação do sangue, apesar de se verificar um aumento do número de consultas médicas e maior consumo de medicamentos.

A limitação das reservas de sangue em Portugal acentua a urgência da implementação de métodos para conservar o sangue dos doentes de risco, corrigindo os principais fatores causais para a utilização de transfusões. Os três pilares do PBM consistem na otimização da hematopoiese (Pilar 1), minimização das perdas de sangue (Pilar 2) e gestão da anemia (Pilar 3). O programa deve ser adaptado aos requisitos de cada doente e apoiado por todos os profissionais de saúde, nas diversas áreas médicas e cirúrgicas (Tabela 4).

Entre as estratégias atribuídas ao Pilar 1, a administração de ferro tem maior preferência entre os peritos do que a utilização de estimuladores da síntese de eritrócitos ou de ácido fólico e/ou vitamina B12. Tendo em conta as medidas do Pilar 2, a aderência às distintas estratégias é consideravelmente semelhante, com maior relevância a administração de concentrado de fibrinogénio. A restrição da utilização de concentrado eritrocitário é a medida do Pilar 3 com maior adesão em comparação à restrição da transfusão de plaquetas e plasma. Em modo geral, todos os três pilares são considerados unanimemente importantes entre os profissionais de saúde (Anemia Working Group Portugal, 2017).

Tabela 4: Pilares e intervenções do *Patient Blood Management* (adpatado de AWGP, 2017).

<b>Pilar 1</b>	<b>Pilar 2</b>	<b>Pilar 3</b>
Otimização da eritropoiese	Gestão e tratamento de hemorragias ou do risco de hemorragia	Estratégias restritivas de transfusão
Administração de estimuladores da eritropoiese	Administração de agentes fibrinolíticos	Restrição da transfusão de concentrado eritrocitário
Administração de ferro	Administração de cristalóides/colóides	Restrição da transfusão de plaquetas
Administração de vitamina B12 e/ou ácido fólico	Administração de concentrado de fibrinogénio Administração de concentrado de complexo protrombínico	Restrição da transfusão de plasma

O incentivo e o investimento do programa de PBM em Portugal são promissores em termos de saúde pública para o Serviço Nacional de Saúde, com maior eficácia da utilização de recursos de saúde e do desempenho da prática clínica (Anemia Working Group Portugal, 2017).

## 10. Conclusão

A anemia adquirida em hospital é um problema que continua a existir nos serviços hospitalares atuais e é de máxima importância evitar o seu surgimento, pois piora o prognóstico de recuperação da doença dos doentes que os levou ao internamento e aumenta a mortalidade e permanência hospitalar. A etiologia da AAH é muito complexa, conciliando as comorbilidades dos doentes e perdas de sangue por procedimentos médicos. A diminuição do volume e da frequência de colheitas de sangue para diagnóstico são as principais medidas preventivas da AAH. A concentração de hemoglobina à admissão é um fator protetor de anemia nosocomial. Nos doentes admitidos com níveis elevados de hemoglobina, o risco de desenvolver anemia é inferior em comparação aos pacientes com concentração próxima do limiar inferior de não-anemia. A correção da anemia por transfusão acarreta os seus próprios riscos, por isso a AAH deve ser tratada de modo a evitar a exposição aos riscos extra por transfusão.

Mesmo que não se possa associar a perda de sangue para diagnóstico inteiramente ao desenvolvimento de anemia nos doentes hospitalizados, é concordante entre vários estudos a importância da prevenção de perdas de sangue consequentes dos procedimentos médicos e terapêuticos.

## 11. Referências bibliográficas

- Adam, E. H., Zacharowski, K., Hintereder, G., Zierfuß, F., Raimann, F., & Meybohm, P. (2018). Validation of a new small-volume sodium citrate collection tube for coagulation testing in critically ill patients with coagulopathy. *Clinical Laboratory*, 64(6), 1083–1089. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.171008>
- Ahmed, A. H. (2014). Prevention and management of hospital-acquired anemia. *Hospital Medicine Clinics*, 3(1), e71–e84. <https://doi.org/10.1016/j.ehmc.2013.10.002>
- Akbas, T. (2019). Long length of stay in the ICU associates with a high erythrocyte transfusion rate in critically ill patients. *Journal of International Medical Research*, 47(7), 1948–1957. <https://doi.org/10.1177/0300060519832458>
- Alves, H., Costa, M. F., Couto, N., Mendonça, B., Moura, A. C., Oliveira, A. M., ... Freitas, J. A. S. (2008). *Evaluating Portuguese primary healthcare through Prevention Quality Indicators (PQIs)*.
- Anemia Working Group Portugal. (2017). *Implementação de Patient Blood Management (PBM) em Portugal: avaliação do impacto*. Lisboa.
- Aronson, D., Suleiman, M., Agmon, Y., Suleiman, A., Blich, M., Kapeliovich, M., ... Hammerman, H. (2007). Changes in haemoglobin levels during hospital course and long-term outcome after acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, 28(11), 1289–1296. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm013>
- Astin, R., & Puthuchery, Z. (2014). Anaemia secondary to critical illness: an unexplained phenomenon. *Extreme Physiology & Medicine*, 3(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/2046-7648-3-4>
- Astles, T. (2009). Iatrogenic anaemia in the critically ill: A survey of the frequency of blood testing in a teaching hospital intensive care unit. *Journal of the Intensive Care Society*, 10(4), 279–281. <https://doi.org/10.1177/175114370901000413>
- Bain, B. J. (2015). *Blood Cells A Practical Guide* (5th ed.; John Wiley & Sons, Ed.).
- Ball, A. M., & Winstead, P. S. (2008). Recombinant human erythropoietin therapy in critically ill Jehovah's witnesses. *Pharmacotherapy*, 28(11), 1383–1390.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1592/phco.28.11.1383>

- Barie, P. S. (2004). Phlebotomy in the intensive care unit: Strategies for blood conservation. *Critical Care*, 8(Suppl 2), 34–36. <https://doi.org/10.1186/cc2454>
- Beutler, E., & Waalen, J. (2006). The definition of anemia: What is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood*, 107(5), 1747–1750. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-3046>
- Beverina, I., Borotto, E., Novelli, C., Radrizzani, D., & Brando, B. (2021). Iatrogenic anaemia and transfusion thresholds in ICU patients with COVID-19 disease at a tertiary care hospital. *Transfusion and Apheresis Science*, 60(2), 103068. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103068>
- Bodley, T., Chan, M., Levi, O., Clarfield, L., Yip, D., Smith, O., ... Hicks, L. K. (2021). Patient harm associated with serial phlebotomy and blood waste in the intensive care unit: A retrospective cohort study. *PLoS ONE*, 16(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243782>
- Branco, B. C., Inaba, K., Doughty, R., Brooks, J., Barmparas, G., Shulman, I., ... Demetriades, D. (2012). The increasing burden of phlebotomy in the development of anaemia and need for blood transfusion amongst trauma patients. *Injury*, 43(1), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.003>
- Bremer, F., Schiele, A., Sagkob, J., Palmaers, T., & Tschaikowsky, K. (2004). Perioperative monitoring of circulating and central blood volume in cardiac surgery by pulse dye densitometry. *Intensive Care Medicine*, 30(11), 2053–2059. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2445-8>
- Bressman, E., Jhang, J., Mcclaskey, J., & Ginzburg, Y. Z. (2021). Tackling the unknowns in understanding and management of hospital acquired anemia. *Blood Reviews*, 49(March), 100830. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100830>
- Carroll, P. D., & Widness, J. A. (2012). Nonpharmacological, blood conservation techniques for preventing neonatal anemia—effective and promising strategies for reducing transfusion. *Seminars in Perinatology*, 36(4), 232–243. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2012.04.003>
- Carson, J. L., Stanworth, S. J., Roubinian, N., Fergusson, D. A., Triulzi, D., Doree, C.,

- & Hebert, P. C. (2016). Transfusion thresholds and other strategies for guiding allogeneic red blood cell transfusion. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002042.pub4>
- Chandrashekar, S. (2018). Hospital-acquired anemia: A hazard of hospitalization. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 3(2), 83–87. [https://doi.org/10.4103/GJTM.GJTM\\_44\\_18](https://doi.org/10.4103/GJTM.GJTM_44_18) How
- Chant, C., Wilson, G., Friedrich, J. O., & Friedrich, J. O. (2006). Anemia, transfusion, and phlebotomy practices in critically ill patients with prolonged ICU length of stay: a cohort study. *Critical Care*, 10(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/cc5054>
- Chaudhry, H. S., & Kasarla, M. R. (2021). Microcytic hypochromic anemia. Retrieved September 20, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470252/?report=classic>
- Choi, J. S., Kim, Y. A., Kang, Y. U., Kim, C. S., Bae, E. H., Ma, S. K., ... Kim, S. W. (2013). Clinical impact of hospital-acquired anemia in association with acute kidney injury and chronic kidney disease in patients with acute myocardial infarction. *PLoS ONE*, 8(9), e75583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075583>
- Chornenki, N. L. J., James, T. E., Barty, R., Liu, Y., Rochweg, B., Heddle, N. M., & Siegal, D. M. (2019). Blood loss from laboratory testing, anemia, and red blood cell transfusion in the intensive care unit: a retrospective study. *Transfusion*, 60(2), 256–261. <https://doi.org/10.1111/trf.15649>
- Cibulskis, C. C., Maheshwari, A., Rao, R., & Mathur, A. M. (2021). Anemia of prematurity: how low is too low? *Journal of Perinatology*, 41, 1244–1257. <https://doi.org/10.1038/s41372-021-00992-0>
- Coene, K. L. M., Roos, A. N., & Scharnhorst, V. (2015). Iatrogenic anemia/Twenty-five million liters of blood into the sewer: Comment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(6), 1160–1161. <https://doi.org/10.1111/jth.12831>
- Corwin, H. L., Gettinger, A., Pearl, R. G., Fink, M. P., Levy, M. M., Abraham, E., ... Shapiro, M. J. (2004). The CRIT study: anemia and blood transfusion in the critically ill—Current clinical practice in the United States\*. *Critical Care Medicine*, 32(1), 39–52. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000104112.34142.79>

- Dale, J. C., & Ruby, S. G. (2003). Specimen collection volumes for laboratory tests A college of american pathologists study of 140 laboratories. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *127*(2), 162–168. <https://doi.org/10.5858/2003-127-162-SCVFL>
- DeBellis, R. J. (2007). Anemia in critical care patients: Incidence, etiology, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *64*(3), S14–S21. <https://doi.org/10.2146/ajhp060602>
- DeLoughery, T. G. (2014). Microcytic anemia. *New England Journal of Medicine*, *371*(14), 1324–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215361>
- Dolman, H. S., Evans, K., Zimmerman, L. H., Lavery, T., Baylor, A. E., Wilson, R. F., & Tyburski, J. G. (2015). Impact of minimizing diagnostic blood loss in the critically ill. *Surgery (United States)*, *158*(4), 1083–1088. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.05.018>
- Duarte, L., Teodoro, A. C., Lobo, M., Viana, J., Pinheiro, V., & Freitas, A. (2021). An open source GIS application for spatial assessment of health care quality indicators. *ISPRS International Journal of Geo-Information*, *10*(4), 264. <https://doi.org/10.3390/ijgi10040264>
- El-soussi, A. H., Asfour, H. I., & Raffat, F. A. (2016). Factors contributing to nosocomial anemia in the critically ill patients. *IOSR Journal of Nursing and Health Science*, *5*(1), 31–44. <https://doi.org/10.9790/1959-05133144>
- Eyster, E., & Bernene, J. (1973). Nosocomial Anemia. *Journal of the American Medical Association*, *223*(1), 73–74. <https://doi.org/10.1001/jama.1973.03220010059017>
- Fink, M. P. (2004). Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia. *Critical Care*, *8*(SUPPL. 2), 9–10. <https://doi.org/10.1186/cc2410>
- Ford, J. (2013). Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*, *35*(3), 351–357. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12082>
- Ganz, T. (2006). Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 29–507. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.29>
- Garratty, G. (2012). Immune hemolytic anemia caused by drugs. *Expert Opinion on*

- Drug Safety*, 11(4), 635–642. <https://doi.org/10.1517/14740338.2012.678832>
- Goodwin, T. R., & Demner-Fushman, D. (2020). A customizable deep learning model for nosocomial risk prediction from critical care notes with indirect supervision. *Journal of the American Medical Informatics Association*, 27(4), 567–576. <https://doi.org/10.1093/jamia/ocaa004>
- Hayden, S. J., Albert, T. J., Watkins, T. R., & Swenson, E. R. (2012). Anemia in critical illness: Insights into etiology, consequences, and management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(10), 1049–1057. <https://doi.org/10.1164/rccm.201110-1915CI>
- Hillman, R. S., & Henderson, P. A. (1969). Control of Marrow Production by the Level of Iron Supply. *The Journal of Clinical Investigation*, 48(3), 454–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1172/JCI106002>
- Jensen, P. R., & Markewitz, B. A. (2016). Safe reduction of blood volume in the blood gas laboratory. *Laboratory Medicine*, 47(4), 326–329. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmw039>
- Koch, C. G., Li, L., Sun, Z., Hixson, E. D., Tang, A., Phillips, S. C., ... Henderson, J. M. (2013). Hospital-acquired anemia: Prevalence, outcomes, and healthcare implications. *Journal of Hospital Medicine*, 8(9), 506–512. <https://doi.org/10.1002/jhm.2061>
- Koch, C. G., Reineks, E. Z., Tang, A. S., Hixson, E. D., Phillips, S., Sabik, J. F., ... Blackstone, E. H. (2015). Contemporary bloodletting in cardiac surgical care. *The Annals of Thoracic Surgery*, 99(3), 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.09.062>
- Koury, M. J., Horne, D. W., Brown, Z. A., Pietenpol, J. A., Blount, B. C., Ames, B. N., ... Koury, S. T. (1997). Apoptosis of late-stage erythroblasts in megaloblastic anemia: Association with DNA damage and macrocyte production. *Blood*, 89(12), 4617–4623. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.12.4617>
- Kurniali, P. C., Curry, S., Brennan, K. W., Velletri, K., Shaik, M., Schwartz, K. A., & McCormack, E. (2014). A Retrospective Study Investigating the Incidence and Predisposing Factors of Hospital-Acquired Anemia. *Anemia*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/634582>

- Lai, C. W., Starkie, T., Creanor, S., Struthers, R. A., Portch, D., Erasmus, P. D., ... Minto, G. (2015). Randomized controlled trial of stroke volume optimization during elective major abdominal surgery in patients stratified by aerobic fitness. *British Journal of Anaesthesia*, *115*(4), 578–589. <https://doi.org/10.1093/bja/aev299>
- Lin, J. C., Strauss, R. G., Kulhavy, J. C., Johnson, K. J., Zimmerman, M. B., Cress, G. A., ... Widness, J. A. (2000). Phlebotomy overdraw in the neonatal intensive care nursery. *Pediatrics*, *106*(2), e19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1542/peds.106.2.e19>
- Lopes, A. I., Azevedo, S., Cabral, J., Ferreira, M. G., Sande-Lemos, P., Ferreira, R., ... Antunes, H. (2020). Portuguese consensus on diagnosis, treatment, and management of anemia in pediatric inflammatory bowel disease. *GE Portuguese Journal of Gastroenterology*, *27*(4), 244–254. <https://doi.org/10.1159/000505071>
- Low, L. L., Harrington, G. R., & Stoltzfus, D. P. (1995). The effect of arterial lines on blood-drawing practices and costs in intensive care units. *Chest*, *108*(1), 216–219. <https://doi.org/10.1378/chest.108.1.216>
- Lyon, A. W., Chin, A. C., Slotsve, G. A., & Lyon, M. E. (2013). Simulation of repetitive diagnostic blood loss and onset of iatrogenic anemia in critical care patients with a mathematical model. *Computers in Biology and Medicine*, *43*(2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2012.11.008>
- Mahendiran, T., Nanchen, D., Gencer, B., Meier, D., Klingenberg, R., Räber, L., ... Fournier, S. (2020). Prognosis of patients with chronic and hospital-acquired anaemia after acute coronary syndromes. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *13*, 618–628. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12265-019-09934-w>
- Makam, A. N., Nguyen, O. K., Clark, C., & Halm, E. A. (2017). Incidence, predictors, and outcomes of hospital-acquired anemia. *Journal of Hospital Medicine*, *12*(5), 317–322. <https://doi.org/10.12788/jhm.2712>
- Mann, S. A., Williams, L. A., Marisa, I. I. I., & Huy, B. M. (2017). Hospital-acquired anemia due to diagnostic and therapy-related blood loss in inpatients with myasthenia gravis receiving therapeutic plasma exchange \*. *Journal of Clinical*

- Apheresis*, 33(1), 14–20. <https://doi.org/10.1002/jca.21554>
- Maqueda-Palau, M., & Pérez-Juan, E. (2018). Blood volume extracted from the critical patient in the first 24 hours after admission. *Enfermería Intensiva (English Ed.)*, 29(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.enfie.2017.09.001>
- Marques, F., Fonseca, C., Nunes, A. R., Belo, A., Brilhante, D., & Cortez, J. (2016). Contextualizando a elevada prevalência de anemia na população portuguesa: perceção, caracterização e preditores: um sub-estudo do EMPIRE. *Medicina Interna*, 23(4), 26–38.
- Martin, N. D., & Scantling, D. (2015). Hospital-acquired anemia: A contemporary review of etiologies and prevention strategies. *Journal of Infusion Nursing*, 38(5), 330–338. <https://doi.org/10.1097/NAN.0000000000000121>
- McEvoy, M. T., & Shander, A. (2013). Anemia, bleeding and blood transfusion in the intensive care unit: causes, risks, costs, and new strategies. *American Journal of Critical Care*, 22(6), eS1–eS14.
- Mercadal, L., Metzger, M., Casadevall, N., Haymann, J. P., Karras, A., Boffa, J. J., ... Froissart, M. (2012). Timing and determinants of erythropoietin deficiency in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(1), 35–42. <https://doi.org/10.2215/CJN.04690511>
- Meroño, O., Cladellas, M., Recasens, L., Garcia-Garcia, C., Ribas, N., Bazan, V., ... Bruguera, J. (2012). In-hospital acquired anemia in acute coronary syndrome. Predictors, in-hospital prognosis and one-year mortality. *Revista Española de Cardiología*, 65(8), 742–748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rec.2012.03.008>
- Murphy, G. J., Cth, F., Reeves, B. C., Rogers, C. A., Rizvi, S. I. A., Culliford, L., & Angelini, G. D. (2007). Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in patients having cardiac surgery. *Circulation*, 116(22), 2544–2552. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.698977>
- Murray, D. (2004). Acute normovolemic hemodilution. *European Spine Journal*, 13, 72–75. <https://doi.org/10.1007/s00586-004-0755-8>
- Myles, N., Wielligh, J. von, Kyriacou, M., Ventrice, T., & To, L. B. (2018). A cohort

- study assessing the impact of small volume blood tubes on diagnostic test quality and iatrogenic blood loss in a cohort of adult haematology patients. *Internal Medicine Journal*, 48(7), 817–821. <https://doi.org/10.1111/imj.13743>
- Nagao, T., & Hirokawa, M. (2017). Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *Journal of General and Family Medicine*, 18(5), 200–204. <https://doi.org/10.1002/jgf2.31>
- Napolitano, L. M. (2004). Scope of the problem: epidemiology of anemia and use of blood transfusions in critical care. *Critical Care*, 8(Suppl 2), 1–8. <https://doi.org/10.1186/cc2832>
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., ... Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704), 2090–2093. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
- O'Grady, N. P., Barie, P. S., Bartlett, J. G., Bleck, T., Carroll, K., Kalil, A. C., ... Masur, H. (2008). Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 Update from the American College of Critical Care Medicine and the Infectious Diseases Society of America. *Critical Care Medicine*, 36(4), 1330–1349. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318169eda9>
- Oto, J., Nakataki, E., Hata, M., Tsunano, Y., Okuda, N., Imanaka, H., & Nishimura, M. (2012). Comparison of bacterial contamination of blood conservation system and stopcock system arterial sampling lines used in critically ill patients. *American Journal of Infection Control*, 40(6), 530–534. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.08.006>
- Page, C., Retter, A., & Wyncoll, D. (2013). Blood conservation devices in critical care: A narrative review. *Annals of Intensive Care*, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-14>
- Papa, F., Rongioletti, M., Della Ventura, M., Di Turi, F., Cortesi, M., Pasqualetti, P., ... Liumbruno, G. M. (2011). Blood cell counting in neonates: A comparison between a low volume micromethod and the standard laboratory method. *Blood Transfusion*, 9(4), 400–406. <https://doi.org/10.2450/2011.0082-10>
- Perel, A. (2017). Iatrogenic hemodilution: A possible cause for avoidable blood

- transfusions? *Critical Care*, 21(291), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1872-1>
- Quinn, J. G., Levy, A. R., Cheng, C. K., Doucette, S., Theriault, C., Doiron, D., ... Tennankore, K. K. (2019). A contemporary description of patients' estimated blood losses from diagnostic phlebotomy in a census of hospital episodes from a Canadian tertiary care center. *Transfusion*, 59(9), 2849–2856. <https://doi.org/10.1111/trf.15434>
- Randi, M. L., Bertozzi, I., Santarossa, C., Cosi, E., Lucente, F., Bogoni, G., ... Fabris, F. (2020). Prevalence and causes of anemia in hospitalized patients: Impact on diseases outcome. *Journal of Clinical Medicine*, 9(950). <https://doi.org/10.3390/jcm9040950>
- Rao, S. V., Eikelboom, J. A., Granger, C. B., Harrington, R. A., Califf, R. M., & Bassand, J. P. (2007). Bleeding and blood transfusion issues in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, 28(10), 1193–1204. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm019>
- Rawal, G., Kumar, R., Yadav, S., & Singh, A. (2016). Anemia in intensive care: A review of current concepts. *The Journal of Critical Care Medicine*, 2(3), 109–114. <https://doi.org/10.1515/jccm-2016-0017>
- Sadowski, B. W., Lane, A. B., Wood, S. M., Robinson, S. L., & Kim, C. H. (2017). High-value, cost-conscious care: Iterative systems-based interventions to reduce unnecessary laboratory testing. *The American Journal of Medicine*, 130(9), 1112.e1-1112.e7. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.02.029>
- Salisbury, A. C., Alexander, K. P., Reid, K. J., Masoudi, F. A., Rathore, S. S., Wang, T. Y., ... Kosiborod, M. (2010). Incidence, correlates, and outcomes of acute, hospital-acquired anemia in patients with acute myocardial infarction. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 3(4), 337–346. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.110.957050>
- Salisbury, A. C., Amin, A. P., Reid, K. J., Wang, T. Y., Alexander, K. P., Chan, P. S., ... Kosiborod, M. (2012). Red blood cell indices and development of hospital-acquired anemia during acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 109(8), 1104–1110. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.11.045>

- Salisbury, A. C., Amin, A. P., Reid, K. J., Wang, T. Y., Masoudi, F. A., Chan, P. S., ... Kosiborod, M. (2011). Hospital-acquired anemia and in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, *162*(2), 300-309.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2011.05.021>
- Salisbury, A. C., Kosiborod, M., Amin, A. P., Reid, K. J., Alexander, K. P., Spertus, J. A., & Masoudi, F. A. (2011). Recovery from hospital-acquired anemia after acute myocardial infarction and effect on outcomes. *American Journal of Cardiology*, *108*(7), 949–954. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.05.026>. Recovery
- Salisbury, A. C., Reid, K. J., Alexander, K. P., Masoudi, F. A., Lai, S.-M., Chan, P. S., ... Kosiborod, M. (2011). Diagnostic blood loss from phlebotomy and hospital-acquired anemia during acute myocardial infarction. *Archives of Internal Medicine*, *171*(18), 1646–1653. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.361>
- Salisbury, A. C., Reid, K. J., Amin, A. P., Spertus, J. A., & Kosiborod, M. (2014). Variation in the incidence of hospital-acquired anemia during hospitalization with acute myocardial infarction (data from 57 US hospitals). *American Journal of Cardiology*, *113*(7), 1130–1136. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.12.017>
- Sanchez-giron, F., & Alvarez-mora, F. (2008). Reduction of blood loss from laboratory testing in hospitalized adult patients using small-volume (pediatric) tubes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *132*(12), 1916–1919.
- Schwartz, J., Padmanabhan, A., Aqui, N., Balogun, R. A., Connelly-smith, L., Delaney, M., ... Witt, V. (2016). Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice — Evidence-based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The seventh special issue. *Journal of Clinical Apheresis*, *31*(3), 149–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jca.21470>
- Shaffer, C. (2007). Diagnostic blood loss in mechanically ventilated patients. *Heart and Lung: Journal of Acute and Critical Care*, *36*(3), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2006.09.001>
- Shander, A. (2004). Anemia in the critically ill. *Critical Care Clinics*, *20*(2), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2004.01.002>
- Shander, A., & Corwin, H. L. (2020). A narrative review on hospital-acquired anemia: Keeping blood where it belongs. *Transfusion Medicine Reviews*, *34*(3), 195–199.

<https://doi.org/10.1016/j.tmr.v.2020.03.003>

- Thavendiranathan, P., Bagai, A., Ebidia, A., Detsky, A. S., & Choudhry, N. K. (2005). Do blood tests cause anemia in hospitalized patients? The effect of diagnostic phlebotomy on hemoglobin and hematocrit levels. *Journal of General Internal Medicine*, 20(6), 520–524. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1497.2005.0094.x>
- Tinmouth, A. T., McIntyre, L. A., & Fowler, R. A. (2008). Blood conservation strategies to reduce the need for red blood cell transfusion in critically ill patients. *Canadian Medical Association Journal*, 178(1), 49–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1503/cmaj.071298>
- Valentine, S. L., & Bateman, S. T. (2012). Identifying factors to minimize phlebotomy-induced blood loss in the pediatric intensive care unit. *Pediatric Critical Care Medicine*, 13(1), 22–27. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e318219681d>
- Van, P. Y., Riha, G. M., Cho, S. D., Underwood, S. J., Hamilton, G. J., Anderson, R., ... Schreiber, M. A. (2011). Blood volume analysis can distinguish true anemia from hemodilution in critically ill patients. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, 70(3), 646–651. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31820d5f48>
- Vincent, J. L., Reinhart, K., Gattinoni, L., Webb, A., Meier-hellmann, A., Nollet, G., & Peres-Bota, D. (2002). Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *Journal of the American Medical Association*, 288(12), 1499–1507. <https://doi.org/10.1001/jama.288.12.1499>
- Wang, J. K., & Klein, H. G. (2010). Red blood cell transfusion in the treatment and management of anaemia: The search for the elusive transfusion trigger. *Vox Sanguinis*, 98(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01223.x>
- Weiskopf, R. B., Kramer, J. H., Viele, M., Neumann, M., Feiner, J. R., Watson, J. J., ... Toy, P. (2000). Acute severe isovolemic anemia impairs cognitive function and memory in humans. *Anesthesiology*, 92(6), 1646–1652. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00000542-200006000-00023>
- Whitehead, N. S., Williams, L. O., Meleth, S., Kennedy, S. M., Ubaka-blackmoore, N., Geaghan, S. M., ... Graber, M. L. (2019). Interventions to prevent iatrogenic anemia: A laboratory medicine best practices systematic review. *Critical Care*, 23(278), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13054-019-2511-9>

- WHO. (2011). Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Retrieved October 1, 2021, from Vitamin and Mineral Nutrition Information System website:  
<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>
- Widness, J. A., Madan, A., Grindeanu, L. A., Zimmerman, M. B., Wong, D. K., & Stevenson, D. K. (2005). Reduction in red blood cell transfusions among preterm infants: Results of a randomized trial with an in-line blood gas and chemistry monitor. *Pediatrics*, *115*(5), 1299–1306. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1680.Reduction>
- Wu, Y., Spaulding, A. C., Borkar, S., Shoaie, M. M., Mendoza, M., Grant, R. L., ... Franco, P. M. (2021). Reducing blood loss by changing to small volume tubes for laboratory testing. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, *5*(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2020.08.007>
- Yao, R., Wu, G., Xu, L., Ma, B., Lin, J., Shi, L., ... Xia, Z. (2020). Diagnostic blood loss from phlebotomy and hospital acquired anemia in patients with severe burns. *Burns*, *46*(3), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.08.020>
- Zivot A, Lipton JM, Narla A, & Blanc L. (2018). Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine*, *24*(11), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

### **RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

Trabalho submetido por  
**Catarina da Silva Salvador Grilo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

**março de 2022**





# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

### **RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

Trabalho submetido por  
**Catarina da Silva Salvador Grilo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho orientado por  
**Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho**

e coorientado por  
**Mestre Teresa Maria da Silva do Nascimento**

**março de 2022**

## **Agradecimentos**

Agradeço à Doutora Lurdes Monteiro por me ter garantido estágio na SYNLAB, apesar dos tempos de pandemia que dificultaram a procura de local para realização de estágio.

Agradecimentos à minha orientadora externa Ana Paula de Almeida Farto, Especialista em Análises Clínicas pela orientação do meu percurso durante o estágio e pela sua simpatia e disponibilidade.

Aos restantes Especialistas em Análises Clínicas, aos Técnicos de Análises Clínicas e restantes colaboradores da SYNLAB por me acolherem com amabilidade e transmitirem conhecimento fundamental para o meu percurso profissional.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas de estágio pela sua amizade e companheirismo.

Reforço os meus agradecimentos à minha coorientadora Mestre Teresa Maria da Silva do Nascimento pela ajuda prestada na redação desta dissertação com sugestões e comentários que me permitiram realizar este trabalho com mais confiança nas minhas capacidades.

## Resumo

O presente relatório de estágio foi desenvolvido no âmbito do mestrado em Análises Clínicas do Instituto Universitário Egas Moniz. O estágio curricular teve lugar no laboratório central da SYNLAB com duração de seis meses e engloba diferentes valências, nomeadamente Hematologia, Imunologia, Microbiologia e Bioquímica. Ao longo do relatório são abordadas as técnicas e equipamentos utilizados e os parâmetros mais frequentemente determinados de acordo com a relevância clínica.

A Patologia Molecular foi uma área incluída no estágio, mas não é abordada nesta dissertação por ser facultativa para a realização do estágio.

Palavras-chave: Estágio, Hematologia, Imunologia, Microbiologia, Bioquímica

## Abstract

This internship report was developed within the scope of Master's degree in Clinical Analysis of Egas Moniz University Institute. The intership took place in the central laboratory of SYNLAB for six months and encompassed different áreas, namely Hematology, Immunology, Microbiology and Biochemistry. Throughout the report are discussed the techniques and equipment and the most frequently determined parameters according to clinical relevance.

Molecular Pathology was an area included in the internship, but is not covered in this dissertation because it is optional for the internship.

Keywords: Internship, Hematology, Immunology, Microbiology, Biochemistry

Índice

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Índice .....	3
Índice de figuras .....	8
Índice de tabelas .....	10
Lista de abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	16
2. Caracterização do laboratório.....	16
3. Fase Pré-analítica.....	17
3.1. Colheita e transporte das amostras biológicas .....	17
3.2. Triagem.....	17
4. Hematologia .....	18
4.1. Hemograma.....	18
4.1.1. Eritrograma .....	19
4.1.2. Plaquetograma.....	20
4.1.3. Leucograma.....	21
4.2. Estudo da morfologia do sangue periférico .....	22
4.2.1. Avaliação da série eritrocitária.....	23
4.2.2. Correção da contagem total de leucócitos.....	25
4.2.3. Avaliação da série leucocitária.....	26
4.3. Velocidade de sedimentação.....	27
4.4. Hemoglobina glicada .....	27
4.5. Citometria de fluxo .....	28
4.6. Hemostase.....	29
4.6.1. Tempo de protrombina (TP).....	30

4.6.2. Tempo de tromboplastina ativado (aPTT) .....	30
4.6.3. Fibrinogénio .....	30
4.6.4. Proteína C.....	31
4.6.5. Proteína S livre.....	31
4.6.6. Antitrombina III funcional (AT III funcional).....	32
4.6.7. Fator V .....	32
4.6.8 Fator VII.....	33
4.6.9. Fator VIII .....	33
4.6.10. Anticoagulante lúpico (AL) .....	34
4.6.11. D-dímero .....	34
5. Imunologia.....	35
5.1. Eletroforese de proteínas .....	35
5.1.1. Albumina.....	35
5.1.2. Fração $\alpha$ 1 .....	36
5.1.3. Fração $\alpha$ 2.....	36
5.1.4. Fração $\beta$ .....	36
5.1.5. Fração $\gamma$ .....	36
5.2. Imunofixação .....	37
5.3. ELISA .....	37
5.4. Phadia <sup>TM</sup> 1000.....	38
5.4 Autoimunidade.....	38
5.4.1. Phadia <sup>TM</sup> 250 .....	39
5.4.2. Imunofluorescência indireta (IFI) .....	43
5.4.3. Immunoblot.....	43
6. Microbiologia .....	45
6.1. Triagem.....	46
6.2. Exame microscópico.....	46

6.3. Exames culturais .....	47
6.3.1. Técnicas de inoculação .....	50
6.5. Identificação manual.....	51
6.6. Processamento das amostras biológicas.....	52
6.6.1. Urina.....	52
6.6.2. Exsudados urogenitais (uretral e vaginal).....	55
6.6.3. Fezes.....	56
6.6.4. Sangue .....	58
6.6.5. Amostras do trato respiratório superior.....	59
6.6.6. Amostras do trato respiratório inferior.....	60
6.5. Identificação automatizada - Vitek®MS .....	61
6.6. Antibiograma .....	62
7. Bioquímica .....	64
7.1. Avaliação da função renal.....	64
7.1.1. Creatinina .....	64
7.1.2. Ácido úrico.....	65
7.1.3. Microalbuminúria.....	66
7.2. Ionograma .....	67
7.3. Avaliação da função hepática .....	68
7.3.1. Aminotransaminases – Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) .....	68
7.3.3. Gama-glutamil transferase (GGT) .....	69
7.3.4. Albumina.....	70
7.3.5. Bilirrubina .....	70
7.3.6. Fosfatase alcalina (ALP) .....	71
7.4. Metabolismo lipídico .....	72
7.4.1. Colesterol total .....	72

7.4.2. Lipoproteína HDL .....	73
7.4.3. Lipoproteína LDL .....	74
7.4.4. Triglicéridos .....	75
7.5. Função cardíaca .....	75
7.5.1. Lactato desidrogenase (LD) .....	75
7.5.2. Troponina .....	76
7.6. Função pancreática .....	76
7.6.1. Lipase .....	77
7.6.2. Amilase .....	77
7.7. Função tiroideia .....	78
7.7.1. Hormona estimulante da tiroide (TSH).....	78
7.7.2. Tiroxina livre (FT4) .....	79
7.7.3. Tiroxina total (T4).....	80
7.7.4 Triiodotironina livre (FT3).....	80
7.7.5. Triiodotironina total (T3) .....	81
7.8. Metabolismo dos hidratos de carbono .....	81
7.9. Metabolismo do ferro.....	82
7.9.1. Ferro sérico.....	82
7.9.2. Transferrina .....	83
7.9.3. Capacidade total de fixação do ferro (CTFF) .....	83
7.9.4. Ferritina sérica.....	84
7.10. Estudo da fertilidade .....	85
7.10.1. Hormona folículo-estimulante (FSH) .....	85
7.10.2. Hormona Luteinizante (LH).....	86
7.10.3. Testosterona .....	86
7.10.4. Progesterona .....	87
7.10.5. Gonadotropina coriónica humana (hCG).....	87

7.10.6. Prolactina.....	88
7.11. Serologia infecciosa.....	88
7.11.1. Hepatites virais.....	88
7.11.2. Vírus da imunodeficiência humana.....	90
9. Controlo da qualidade.....	91
9.1. Controlo Interno da Qualidade (CIQ).....	91
9.2. Avaliação Externa da Qualidade (CEQ).....	91
10. Referências bibliográficas .....	92
ANEXO – Padrões de imunofluorescência indireta de ANA ( <i>International Consensus on ANA Patterns</i> ).....	100

## Índice de figuras

Figura 1: Alterações no tamanho e cor dos eritrócitos: (a) microcitose e hipocromia; (b) macrocitose; (c) policromasia.....	23
Figura 2: Inclusões eritrocitárias: (a) pontuado basófilo, (b) corpos de Pappenheimer, (c) anel de Cabot, (d) corpo de Howell-Jolly.....	25
Figura 3: Diferentes tipos de leucócitos: (a) neutrófilo, (b) linfócito, (c) eosinófilo, (d) basófilo, (e) monócito.....	26
Figura 4: Granulócitos imaturos ordenados por ordem crescente de diferenciação: (a) promielócito, (b) mielócito, (c) metamielócito (seta), (d) bastonete.....	26
Figura 5: Células da série leucocitária e principais patologias associadas: (a) neutrófilo hipersegmentado (anemia megaloblástica), (b) neutrófilo de Pelger-Huët (comum em SMD e LMA), (c) plasmócito (mieloma múltiplo), (d) blasto com bastonetes de Auer (LMA e alguns subtipos de SMD).....	27
Figura 6: Equação da reação de medição da proteína C.....	31
Figura 7: Equação da reação de medição de antitrombina III funcional.....	32
Figura 8: Técnicas de inoculação. Técnica de esgotamento semiquantitativo (A) e por quadrantes (B). .....	50
Figura 9: Equação da reação de medição de creatinina.....	65
Figura 10: Equação da reação da medição de ácido úrico.....	66
Figura 11: Equação da reação da medição de ALT.....	68
Figura 12: Equação da reação de medição de AST.....	69
Figura 13: Equação da reação de medição de GGT.....	70
Figura 14: Equação da reação de medição da albumina.....	70
Figura 15: Equação da reação da medição da bilirrubina conjugada.....	71
Figura 16: Equação da reação de medição da bilirrubina.....	71
Figura 17: Equação da reação de medição da fosfatase alcalina.....	72
Figura 18: Equação da reação de medição do colesterol.....	73
Figura 19: Equação da reação de medição de HDL – Fase 1. Libertação e eliminação de partículas não HDL.....	74
Figura 20: Equação da reação de medição de HDL – Fase 2. Libertação das partículas HDL pelo detergente adicionado e HDL é medido por uma reação de Trinder.....	74
Figura 21: Equação da reação de medição dos triglicerídeos.....	75

Figura 22: Equação da reação de medição de lactato desidrogenase (LD) .....	76
Figura 23: Equação da reação de medição da lipase. ....	77
Figura 24: Equação da reação de medição da amilase. ....	78
Figura 25: Equação da reação de medição da glucose. ....	82
Figura 26: Equação da reação de medição do ferro sérico. ....	83
Figura 27: Equação da reação de medição de CTFF. ....	84

## Índice de tabelas

Tabela 1: Valores de referência da concentração de hemoglobina. ....	19
Tabela 2: Alterações morfológicas dos eritrócitos e principais causas. ....	24
Tabela 3: Marcadores celulares para determinação das linhagens celulares. ....	29
Tabela 4: Doenças autoimunes e respetivos autoanticorpos associados. ....	39
Tabela 5: Diagnóstico diferencial de Doença de Crohn e Colite ulcerosa ....	43
Tabela 6: Perfil de autoanticorpos e <i>possível</i> diagnóstico. ....	44
Tabela 7: Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia. ....	48
Tabela 8: Leitura do número de colónias ....	53
Tabela 9: Interpretação dos resultados de uroculturas. ....	54
Tabela 10: Cartas para teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). ....	63

Lista de abreviaturas

**ADP** Adenosine diphosphate

**AL** Anticoagulante lúpico

**ALP** *Alkaline phosphatase*

**ALT** Alanina aminotransferase

**ANA** *Antinuclear antibodies*

**Anti-HBe** *Hepatitis B e antibody*

**Anti-HBc** *Hepatitis B core antibody*

**Anti-HBs** *Hepatitis B surface antibody*

**aPTT** *Activated partial thromboplastin time*

**AR** Artrite reumatóide

**ASCA** *Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*

**AST** Aspartato aminotransferase

**AT III** Antitrombina III

**ATP** *Adenosine triphosphate*

**BHI** *Brain heart infusion*

**CAM** Campyloset

**CMI** Concentração mínima inibitória

**CCP** *Cyclic citrullinated peptide*

**CHCM** Concentração de hemoglobina corpuscular média

**CID** Coagulação intravascular disseminada

**CEQ** Controlo externo da qualidade

**CIQ** Controlo interno da qualidade

**CLED** *Cystine lactose eletrolyte deficient*

**CMI** Concentração Mínima Inibitória

**CNA** *Columbia naladixic acid*

**CTFF** Capacidade total de fixação do ferro

**cTn** *Cardiac troponin*

**DNA** *Desoxyribonucleic acid*

**EDTA** *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**ELISA** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EP** Embolismo pulmonar

**EUCAST** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FEIA** *Fluorescent enzyme immunoassay*

**FR** Fator reumatoide

**FS** *Forward scatter*

**FSH** *Follicle stimulating hormone*

**FT3** *Free triiodothyronine*

**FT4** *Free thyroxine*

**GBM** *Glomerular basement membrane*

**GGT** Gama-glutamyl transferase

**GnRH** *Gonadotropin-releasing hormone*

**GV** Glóbulo vermelho

**Hb** Hemoglobina

**HbA1c** Hemoglobina A1c

**HBeAg** *Hepatitis B e antigen*

**HBsAg** *Hepatitis B surface antigen*

**hCG** *Human chorionic gonadotropin*

**HCM** Hemoglobina corpuscular média

**HCT** Hematócrito

**HDL** High-density lipoprotein

**HEKT** Hektoen

**HPLC** *High performance liquid chromatography*

**IFI** Imunofluorescência indireta

**Ig** Imunoglobulina

**IMT** *Integrated multisensor technology*

**INR** *International normalized ratio*

**ISI** Índice de sensibilidade internacional

**ISO** *International Organization for Standardization*

**ITU** Infecção do trato urinário

**IST** Infecção sexualmente transmissível

**LCR** Líquido cefalorraquidiano

**LD** Lactato desidrogenase

**LDL** *Low-density lipoprotein*

**LES** Lúpus eritematoso sistémico

**LH** *Luteinizing hormone*

**LMC** Leucemia mieloide crónica

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**MALDI-TOF MS** *Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

**MBPL** Manual de boas práticas laboratoriais

**MRSA** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

**pANCA** *Antineutrophil cytoplasmic antibodies*

**PCR** Proteína C reativa

**PEG** Polietilenoglicol

**p-NP** p-nitrofenol

**p-NPP** p-nitrofenilfosfato

**PVX** *Polyvitex*

**RDW** *Red cell distribution width*

**Ret** Reticulócito

**RIQAS** *Randox International Quality Assessment Schemes*

**RLU** *Relative light unit*

**RNA** *Ribonucleic acid*

**SAB** Sabouraud

**SAF** Síndrome anti-fosfolípido

**SEQC** *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*

**SIDA** Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

**SPN** Síndrome paraneoplásica neurológica

**SS** *Side scatter*

**T3** Triiodotironina

**T4** Tiroxina

**TBG** *Thyroxine-binding globulin*

**TFG** Taxa de filtração glomerular

**TG** Tiroglobulina

**TNF- $\alpha$**  *Tumour Necrosis Factor  $\alpha$*

**TP** Tempo de protrombina

**TPO** *Thyroid peroxidase*

**TSA** Teste de sensibilidade aos antibióticos

**TSH** *Thyroid stimulating hormone*

**TSH-R** *Anti-thyroid stimulating hormone receptor*

**tTG** *Tissue transglutaminase*

**TVP** Trombose venosa profunda

**UFC** Unidades formadoras de colónias

**UK NEQAS** *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**UV** Ultravioleta

**VCAT** Vancomicina, colimicina, anfotericina, trimetropim

**VCM** Volume corpuscular médio

**VHA** Vírus da hepatite A

**VHB** Vírus da hepatite B

**VHC** Vírus da hepatite C

**VIH** Vírus da imunodeficiência humana

**VLDL** *Very-low-density lipoprotein*

**VS** Velocidade de sedimentação

## 1. Introdução

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas do Instituto Superior Egas Moniz tem como principal objetivo aplicar na prática os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.

O estágio teve lugar no Laboratório Central da SYNLAB, em Lisboa, com a orientação da Dra Ana Paula Farto, Especialista em Análises Clínicas e em Genética Humana, pela Ordem dos Farmacêuticos. O estágio decorreu entre 15 de fevereiro de 2021 e 27 de agosto de 2021, com uma totalidade de 960 horas, distribuídas pelas várias valências do laboratório, nomeadamente, Fase Pré-analítica, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia, Hematologia e Patologia Molecular.

O laboratório da SYNLAB desempenha um papel importante na comunidade através do fornecimento de dados laboratoriais fiáveis para orientar os clínicos no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. Os sistemas de gestão da qualidade apropriados garantem a qualidade e competência dos laboratórios.

Este estágio providenciou a oportunidade de colaborar com diferentes profissionais, o contacto com a realidade de um laboratório clínico e a aquisição de competências técnico-científicas.

## 2. Caracterização do laboratório

O laboratório da SYNLAB é constituído pelo CoreLab que integra as áreas da Bioquímica e Imunologia, setor da Hematologia, setor do Batch, laboratório de Microbiologia e laboratório de Biologia Molecular.

O laboratório está equipado com aparelhos automatizados que permitem reduzir o tempo de resposta e garantir resultados fidedignos. Os equipamentos estão conectados a um sistema informático APOLLO onde são integrados e validados os resultados analíticos, além da informação clínica dos utentes, o histórico de análises anteriores e integração dos postos de colheita e informação sobre cada tipo de analito.

### 3. Fase Pré-analítica

A fase Pré-analítica inclui todos os procedimentos precedentes à análise das amostras, nomeadamente, atendimento do utente, identificação e registo do utente, colheita do material biológico, conservação, transporte e triagem.

#### 3.1. Colheita e transporte das amostras biológicas

A colheita das amostras biológicas é realizada por um técnico de colheitas, de acordo com o “Manual de Colheitas”. A conservação e o transporte são adaptados consoante o tipo de produto colhido.

#### 3.2. Triagem

As amostras, que são transportadas dos postos de colheitas, chegam ao laboratório central e são rececionadas na Triagem para Processamento, onde são triadas e processadas para criação de listas de trabalho, distribuição das amostras pelas valências respetivas e tratamento de amostras para envio a outros laboratórios.

Faz-se uma verificação das amostras aquando da sua receção, para evitar o seguimento de amostras não conformes e resultados incorretos. As amostras que cumprem os requisitos da qualidade são registadas no sistema informático e são distribuídas pelas respetivas secções do laboratório a que se destinam, havendo especial atenção às amostras urgentes. Os responsáveis de cada secção têm a responsabilidade de recolher as amostras.

A triagem das amostras de soro é efetuada pelo equipamento AutoMate 2500®, da Beckman Coulter, que permite a automatização do processamento das amostras. As amostras que entram no aparelho são distribuídas consoante os pedidos e são geradas alíquotas quando o material biológico tem de ser processado por vários aparelhos da Fase Analítica. O equipamento foi configurado de modo a distribuir as amostras consoante um esquema incorporado pelo laboratório, que estabelece o seguimento a dar a cada amostra – aparelho, urgente, anomalias e arquivo.

#### 4. Hematologia

A Hematologia é a ciência que estuda o sangue, os órgãos hematopoiéticos e as doenças hematológicas. Nesta secção do laboratório as amostras chegam em tubos de EDTA e de citrato. O sangue total em EDTA (com anticoagulante EDTA K3 ou K2) pode ser utilizado para hemograma, estudo da morfologia sanguínea, velocidade de sedimentação, doseamento de hemoglobina glicada, eletroforese de hemoglobinas, citometria de fluxo, grupos sanguíneos e teste Coombs. O plasma citratado, previamente centrifugado (3000 rpm, durante 15 minutos), é utilizado no estudo da hemostase.

##### 4.1. Hemograma

O hemograma é a avaliação e contagem de todos os componentes figurados do sangue, que se subdivide em eritrograma (eritrócitos), leucograma (glóbulos brancos) e trombocitograma (plaquetas).

A contagem e medição dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas é feita automaticamente através dos aparelhos UniCel DxH 800 Coulter Cellular, da Beckman Coulter, com base do princípio da impedância. As células passam por um pequeno orifício com eletrólitos. Por cada célula que passa é gerado um pulso elétrico que representa uma célula individual e a altura do pulso corresponde ao volume da célula (Tefferi, Hanson, & Inwards, 2005).

Na contagem diferencial de leucócitos, o DxH 800 utiliza uma tecnologia de dispersão de luz com um laser vermelho e dispersão de 5 ângulos para definir a granularidade e a lobularidade celular. Simultaneamente, são obtidas informações sobre o volume e as estruturas internas da célula com medições de impedância e condutividade. Uma solução de lise permite manter apenas reticulócitos, leucócitos e plaquetas, que são diferenciados pelas características distintas da perda de luz axial por citometria de fluxo (Meintker, Ringwald, Rauh, & Krause, 2013). O doseamento de Hb é efetuado por um espectrofotómetro, após lise dos GV (Bain, 2015).

O hemograma é um teste laboratorial solicitado frequentemente para avaliação de rotina e tem utilidade no diagnóstico e monitorização de doenças hematológicas, tais como, anemia, infeções, doenças inflamatórias e malignidade (Dean, 2005).

#### 4.1.1. Eritrograma

O eritrograma inclui a contagem de eritrócitos, a medição do hematócrito (HCT), a concentração de hemoglobina (Hb) e os índices hematimétricos calculados pelo *software* do contador, tais como, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e coeficiente dispersão eritrocitária (RDW) (Bain, 2015).

A concentração de Hb e os índices hematimétricos orientam no diagnóstico da anemia e na investigação da sua etiologia. Na tabela 1, estão apresentados os valores de referência da concentração de Hb, de acordo com o género e idade (WHO, 2011).

Tabela 1: Valores de referência da concentração de hemoglobina.

População	Intervalo de referência (Hb)
Crianças 6 – 59 meses	$\geq 110$ g/L
Crianças 5 – 11 anos	$\geq 115$ g/L
Crianças 12 – 14 anos	$\geq 120$ g/L
Mulheres (não grávidas)	$\geq 120$ g/L
Mulheres grávidas	$\geq 110$ g/L
Homens	$\geq 130$ g/L

Consoante o VCM, a anemia pode classificar-se entre 3 categorias – anemia microcítica (VGM  $< 80$  fL), anemia normocítica (VGM entre 80 e 100 fL) e anemia macrocítica (VGM  $> 100$  fL). A anemia microcítica é representativa de anemia ferropénica, talassémia, anemia devido a inflamação e anemia sideroblástica (DeLoughery, 2014). A anemia macrocítica pode ser anemia megaloblástica (deficiência em vitamina B12 e/ou folatos) ou anemia não megaloblástica (disfunção hepática, alcoolismo, síndrome mielodisplásica) (Nagao & Hirokawa, 2017). A anemia normocítica pode ser provocada por perdas de sangue, supressão da eritropoiese ou ocorrer devido à hemólise dos GV (Ford, 2013).

O hematócrito (%) equivale à proporção de eritrócitos que ocupam um dado volume de sangue total. A hemoglobina (g/L) é doseada pelo método da cianometahemoglobina modificado, com lise eritrocitária. As formas de hemoglobina presentes na amostra, à exceção de sulfohemoglobina, são convertidas em

cianometemoglobina são medidas a 540 nm por espectrofotometria. O VCM (fL) é indicativo do volume médio dos eritrócitos, que é calculado pela divisão do valor do HCT pelo número total de eritrócitos contado. A HCM (pg) corresponde ao peso médio de hemoglobina por eritrócito, ou seja, divisão entre Hb e eritrócitos. A CHCM (g/L) é a concentração média de Hb por unidade de volume de eritrócitos e é calculada pelo quociente entre hemoglobina e o hematócrito. O RDW (%) indica a variação da distribuição do volume dos eritrócitos (Bain, 2015).

A contagem dos reticulócitos é realizada por fluorescência, onde são contabilizados GV recém-formados com vestígios de RNA (Bain, 2015).

A contagem de reticulócitos contribui para a avaliação da capacidade de medula óssea produzir reticulócitos. A anemia pode ser classificada de acordo com a diminuição da contagem de reticulócitos, devido a produção inadequada de Ret, ou aumento da contagem provocada por perda excessiva ou destruição dos GVs. A avaliação da função da medula óssea em doentes após intervenção terapêutica (ferro, vitamina B12, ácido fólico, entre outros), após aplasia da medula óssea ou transplante de medula óssea permite avaliar a resposta à terapêutica (Buttarelli, 2016).

#### 4.1.2. Plaquetograma

O plaquetograma inclui a contagem de plaquetas, plaquetócrito, o volume plaquetário médio e o índice de dispersão plaquetária.

Em adultos saudáveis, a contagem de plaquetas distribui-se entre  $150 \times 10^9/L$  e  $400 \times 10^9/L$ . A trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior a  $150 \times 10^9/L$ ) é maioritariamente adquirida através do consumo aumentado de plaquetas, esplenomegalia, supressão da medula óssea provocada por fármacos ou infeções e falha da medula óssea. A trombocitose (contagem de plaquetas superior a  $400 \times 10^9/L$ ) está associada a um risco acrescido de trombose. A trombocitose primária pode ter origem hereditária ou adquirida com alterações direcionadas às células hematopoiéticas, enquanto a trombocitose secundária deve-se a fatores externos como inflamação crónica ou cancro (Daly, 2011).

O plaquetócrito (%) representa a razão entre o volume plaquetário e o volume de sangue total. O volume plaquetário médio (fL) é calculado a partir da razão entre o

plaquetócrito e a contagem de plaquetas. O índice de dispersão plaquetária representa a variação do volume das plaquetas (Leader, Pereg, & Lishner, 2012).

A utilização de índices associados ao volume plaquetário no diagnóstico é limitado e requer mais estudos, uma vez que é necessário estabelecer valores *cuf-off* no diagnóstico e na monitorização em diversas patologias (Korniluk, Koper-Lenkiewicz, Kamińska, Kemon, & Dymicka-Piekarska, 2019).

#### 4.1.3. Leucograma

O leucograma apresenta a contagem total de leucócitos e a fórmula leucocitária, em valores percentuais e absolutos, das cinco populações leucocitárias: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Os valores de referência para a contagem dos leucócitos é 4000-10000/ $\mu$ L. Leucopenia corresponde à diminuição da contagem total de leucócitos (valor de leucócitos <4000/ $\mu$ L) e pode ocorrer em infeções virais ou noutras condições como lupus sistémico eritematoso. Leucocitose equivale ao aumento de leucócitos (acima de 10000/ $\mu$ L) e está comumente associado a resposta a infeções ou em doenças malignas como leucemia (Bain, 2015; Direção Geral de Saude, 2011). Valores de leucócitos entre 50000/ $\mu$ L e 100000/ $\mu$ L representam reação leucocítica e pode ocorrer em infeções severas, sepsis, rejeição de órgãos ou em pacientes com tumores sólidos. Leucocitose superior a 100000/ $\mu$ L é praticamente sempre provocada por leucemias ou desordens mieloproliferativas (Riley & Rupert, 2015).

O tipo de leucocitose mais comum é neutrofilia (valor absoluto de neutrófilos superior a 8000/ $\mu$ L), que pode derivar de infeções, stress, inflamações crónicas, fármacos e outras causas (Direção Geral de Saude, 2011; Riley & Rupert, 2015). A neutropenia (neutrófilos <1500/ $\mu$ L) pode ocorrer devido produção inadequada ou destruição dos neutrófilos na medula óssea ou tempo de vida reduzido em circulação (Bain, 2015; Direção Geral de Saude, 2011).

Linfocitose (valor absoluto de linfócitos superior a 4000/ $\mu$ L) pode ocorrer em pacientes com tosse convulsa, sífilis, infeções virais, reações hipersensitivas e determinados subtipos de leucemias ou linfomas (Riley & Rupert, 2015). A leucopenia (linfócitos < 800/ $\mu$ L) é muito comum como resposta aguda ao *stress* e tem importância

no diagnóstico e monitorização de infeção por VIH e linfomas. Também pode se verificar em doentes sujeitos a quimioterapia (Bain, 2015; Direção Geral de Saude, 2011).

A monocitose (valor absoluto de monócitos superior a  $1200/\mu\text{L}$ ) pode ser consequente de infeções (vírus Epstein-Barr, tuberculose, fúngica, protozoários ou rickettsial), doenças autoimunes, esplenectomia ou ter causa maligna (Direção Geral de Saude, 2011; Riley & Rupert, 2015). A monocitopenia pode ocorrer devido doenças hemato-oncológicas, infeções, quimioterapia, terapêutica com corticoides (Bain, 2015).

A eosinofilia (valor absoluto de eosinófilos superior a  $300/\mu\text{L}$ ) pode ser sugestivo de condições alérgicas e infeções parasitárias. A basofilia (valor absoluto de basófilos superior a  $300/\mu\text{L}$ ) também é rara e improvável de provocar leucocitose isoladamente, mas pode ocorrer em situações alérgicas ou inflamatórias e leucemia mieloide crónica (LMC) (Direção Geral de Saude, 2011; Riley & Rupert, 2015).

A eosinopenia e basopenia são duas condições dificilmente detetadas na contagem diferencial de leucócitos e por serem anomalias pouco específicas não têm relevância clínica (Bain, 2015).

#### 4.2. Estudo da morfologia do sangue periférico

Os contadores automáticos estão programados para alertar a existência de características anómalas ao nível do hemograma. Nestas situações, é necessário a observação ao microscópio. O esfregaço sanguíneo a ser observado é efetuado pelo equipamento automático da Beckman Coulter, que também executa a coloração de May-Grunwald Giemsa.

A interpretação do esfregaço sanguíneo deve ser acompanhada do hemograma e da informação do paciente, nomeadamente, idade, género e etnia (Bain, 2015).

As características hematológicas que têm de ser confirmadas por observação microscópica são neutropenia, leucocitose, basofilia, macrocitose e neutrófilos hipersegmentados, características específicas de leucemias e linfomas, células imaturas, linfócitos atípicos, trombocitopenia, plaquetas gigantes, agregados plaquetários e fragmentos eritrocitários.

A observação do esfregaço sanguíneo é feita ao microscópio óptico, numa primeira fase, com objetiva de 10x para avaliar a qualidade do esfregaço, detetar células

anormais em menor quantidade, presença de *rouleaux* ou agregados eritrocitários e verificar a cauda do esfregaço, onde podem estar presentes agregados plaquetários e filamentos de fibrina. Com a objetiva de 40x procede-se à avaliação da morfologia eritrocitária, leucocitária e plaquetária e realização da fórmula leucocitária. A objetiva de 100x, com óleo de imersão, pode ser útil para observação de detalhes finos ou na pesquisa de parasitas da malária. Na fórmula leucocitária, conta-se cada grupo de leucócitos até se contar um total de 100 leucócitos, de modo a obter a percentagem de cada tipo de leucócito – neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Bain, 2015).

#### 4.2.1. Avaliação da série eritrocitária

Na observação microscópica da série eritrocitária é importante notar a cor, tamanho, morfologia, distribuição e inclusões eritrocitárias.

Em relação à cor, pode avaliar-se como hipocromia, normocromia e policromasia. Normocromia representa os eritrócitos normais (Tabela 1). Hipocromia ocorre nos eritrócitos com palidez no centro, devido à menor concentração de Hb e é comum na anemia ferropénica, anemia sideroblástica, talassémia e anemia de doenças crónicas. A policromasia está associado à presença de reticulócitos (Fig. 1) (Bain, 2015).

Em relação ao tamanho, as alterações do volume classificam-se como microcitose, normocitose e macrocitose. A normocitose representa os eritrócitos normais (Tabela 1). A microcitose corresponde à diminuição do volume dos eritrócitos e é comum na anemia ferropénica, anemia sideroblástica, talassémia e anemia de doenças crónicas. A macrocitose observa-se em eritrócitos com volume aumentado e pode ocorrer em anemia megaloblástica, doença hepática crónica, alcoolismo e síndromes mielodisplásicas (Fig. 1) (Bain, 2015).

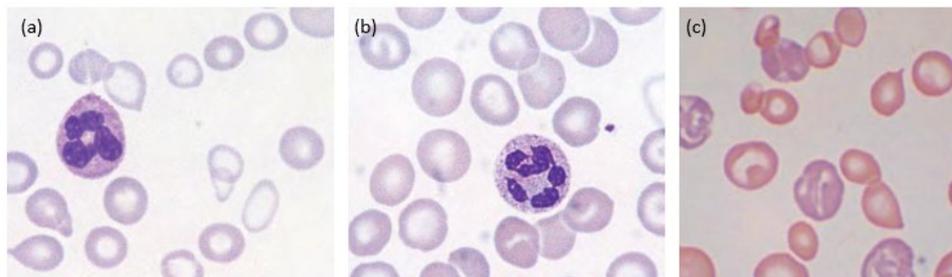
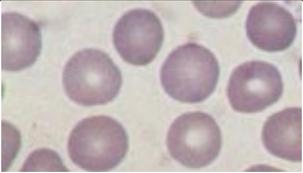
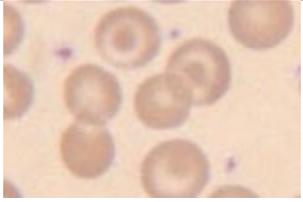
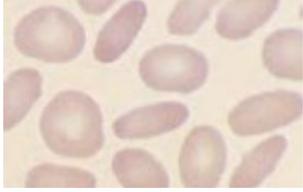


Figura 1: Alterações no tamanho e cor dos eritrócitos: (a) microcitose e hipocromia; (b) macrocitose; (c) policromasia.

Em termos de morfologia, as alterações que se podem ser observadas, para além da forma normal bicôncava, são os acantócitos, estomatócitos, dacriócitos, equinócitos, esferócitos, dianócitos, drepanócitos, eliptócitos e ovalócitos (Tabela 2) (Bain, 2015).

Tabela 2: Alterações morfológicas dos eritrócitos e principais causas.

Alterações morfológicas	Principais causas	Observação
Eritrócitos	Indivíduos saudáveis	
Acantócitos	Doença hepática grave, abetalipoproteinemia, pós esplenotomia	
Estomatócitos	Estomatocitose hereditária, alcoolismo, síndromes mielodisplásicas	
Dacriócitos	Mielofibrose, síndromes mieloproliferativas	
Equinócitos	Artefactos, uremia, insuficiência renal	
Esferócitos	Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, toxinas de bactérias	

Dianócitos	Doença hepática crónica, anemia ferropénica, talassemia, hemoglobinopatias	
Drepanócitos	Drepanocitose	
Eliptócitos/ ovalócitos	Eliptocitose/ovalocitose hereditária	

As inclusões eritrocitárias incluem anel de cabot (membrana nuclear remanescente), corpos de Heinz (hemoglobina desnaturada), reticulócitos, corpos Howell-Jolly (vestígios de DNA nuclear), pontuado basófilo (ribossomas e RNA precipitados) e corpos Pappenheimer (grânulos sideróticos) (Fig. 2) (Bain, 2015).

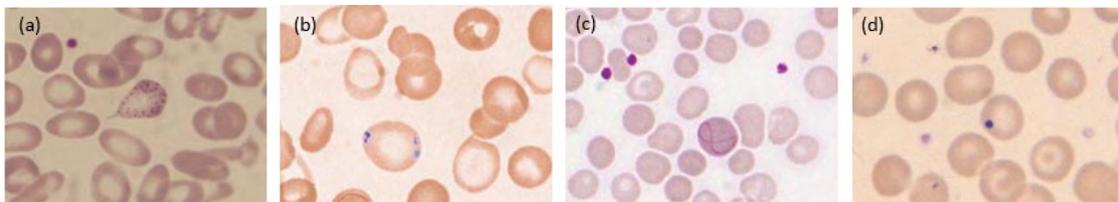


Figura 2: Inclusões eritrocitárias: (a) pontuado basófilo, (b) corpos de Pappenheimer, (c) anel de Cabot, (d) corpo de Howell-Jolly.

#### 4.2.2. Correção da contagem total de leucócitos

Os contadores automáticos não são eficazes a distinguir os eritroblastos dos leucócitos, o que pode contribuir para a alteração na contagem de leucócitos. A observação do esfregaço de sangue periférico permite corrigir a fórmula leucocitária e quantificar o número de eritroblastos (Bain, 2015).

#### 4.2.3. Avaliação da série leucocitária

A avaliação da série leucocitária consiste na observação microscópica da morfologia e número de leucócitos. Os leucócitos normalmente observados em sangue periférico são neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos (Fig. 3).

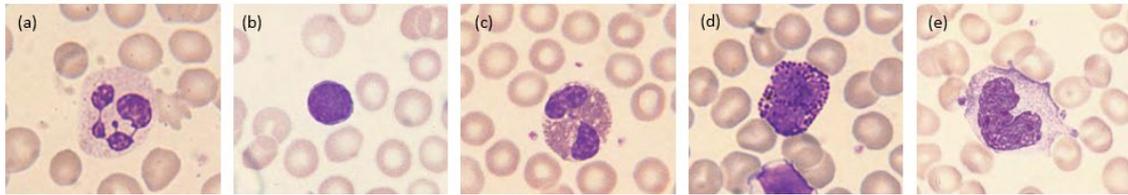


Figura 3: Diferentes tipos de leucócitos: (a) neutrófilo, (b) linfócito, (c) eosinófilo, (d) basófilo, (e) monócito.

Quanto à quantidade, as alterações podem ser avaliadas como neutrofilia, linfocitose, monocitose, eosinofilia e basofilia em consideração ao aumento acima do valor de referência para cada tipo de leucócito. A diminuição do número classifica-se como neutropenia, linfopenia, monocitopenia, eosinopenia (raro) e basopenia (raro) (Bain, 2015).

A observação do esfregaço sanguíneo permite confirmar a presença ou erro na detecção de granulócitos imaturas pelo contador automático. A contagem destas células é integrada na correção contagem diferencial de leucócitos manual (Fig. 4).

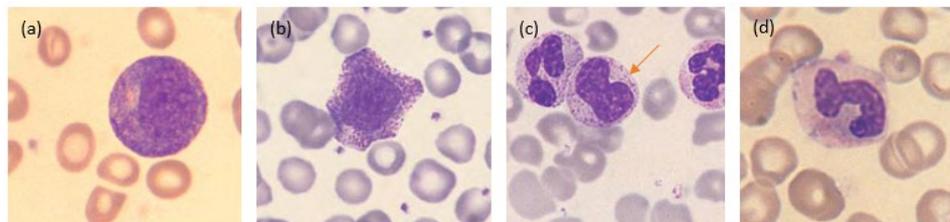


Figura 4: Granulócitos imaturos ordenados por ordem crescente de diferenciação: (a) promielócito, (b) mielócito, (c) metamielócito (seta), (d) bastonete.

Durante o estágio em Hematologia tive a oportunidade de observar esfregaços de sangue para avaliação externa da qualidade. Na figura 5, estão demonstradas algumas células associadas as patologias que identifiquei (Bain, 2015).

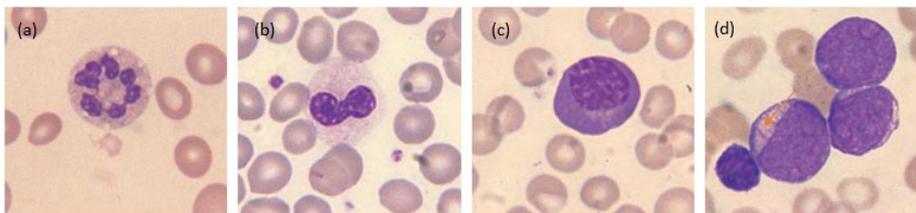


Figura 5: Células da série leucocitária e principais patologias associadas: (a) neutrófilo hipersegmentado (anemia megaloblástica), (b) neutrófilo de Pelger-Huët (comum em SMD e LMA), (c) plasmócito (mieloma múltiplo), (d) blasto com bastonetes de Auer (LMA e alguns subtipos de SMD).

#### 4.3. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) mede a velocidade, em mm/h, a que os eritrócitos depositam e indiretamente gradua o estado inflamatório do indivíduo. A VS não é específica para nenhuma doença, mas em combinação com outros testes é utilizada para determinar a atividade inflamatória aumentada (Tishkowski & Gupta, 2021).

A medição da VS é efetuada automaticamente no aparelho TEST 1 (ALIFAX® da SYSMEX). Os tubos de sangue total são introduzidos no aparelho em *racks* e são homogeneizados durante 2 minutos. Uma agulha de aspiração fechada recolhe 150  $\mu$ L de amostra e distribui cada amostra por capilar, posteriormente centrifugados a 20g. A temperatura da área de detenção é mantida a 37°C. O sistema utiliza um microfotómetro de raios infravermelhos com comprimento de onda de luz equivalente a 950 nm. Os impulsos elétricos, capturados por um detetor de fotodiodo, são diretamente correlacionados com a agregação eritrocitária em cada nível capilar. Um algoritmo matemático converte os dados brutos obtidos da avaliação de sinais de densidade óptica em resultados de VS, que são transformados em valores de Westergren comparáveis (Cha et al., 2009).

#### 4.4. Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada (HbA1c) é utilizada no diagnóstico e monitorização de diabetes mellitus. A HbA1c é um derivado de hemoglobina formado por reações não enzimáticas entre a molécula de glicose e a cadeia  $\beta$  da hemoglobina, seguido da estabilização de um intermediário lábil na forma cetoamina por um rearranjo de Amadori. A medição de HbA1c representa o valor de glicemia dos últimos 2-3 meses e mantém-se

estável na presença de variações glicémicas repentinas (Ang, Thevarajah, Alias, & Khor, 2015).

O equipamento D-100<sup>TM</sup> HbA<sub>1c</sub>, da Bio-Rad, baseia-se no princípio da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), onde as hemoglobinas são separadas com base nas interações iónicas com a coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. A absorvância das frações separadas é medida a 415 nm ao passarem num fluxo celular. O software D-100 analisa e calcula os valores de HbA<sub>1c</sub> baseado na curva de calibração de 2 níveis (Maesa et al., 2016).

#### 4.5. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de imunofenotipagem que permite quantificar, identificar e categorizar populações celulares através da expressão de marcadores de superfície ou intracelulares que são detetados por anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos. Antes da incubação com anticorpos monoclonais, os eritrócitos são hemolisados. Uma radiação laser incide nos fluorocromos, que ficam excitados e emitem luz num determinado comprimento de onda que é captado por um detetor que converte em sinais elétricos.

A identificação de linhagens celulares específicas permite o diagnóstico de diversas leucemias e distúrbios de imunodeficiência e a determinação do alvo terapêutico contra a linhagem de células cancerosas (Herold & Mitra, 2021).

A escolha dos painéis de marcadores no diagnóstico de doenças hematológicas é realizada tendo em consideração a análise do hemograma e a hipótese diagnóstica baseada no histórico clínico. Os painéis de marcadores combinam os anticorpos monoclonais mais relevantes para diferenciar as populações celulares. Na tabela 3, estão discriminados alguns antígenos específicos para determinação da linhagem celular (Martins & Gagliani, 2008).

Tabela 3: Marcadores celulares para determinação das linhagens celulares.

Linhagem	Marcadores celulares
Mielóide	CD13, CD33, MPO, CD15, CD14, CD117, CD41, CD42b, CD61 e glicoforina-A
Linfóide T	CD3, CD4, CD8, CD7, CD2, CD5, CD1a, TCR- $\alpha\beta$ , TCR- $\gamma\delta$
Linfóide B	CD19, CD79a, CD22, CD20, CD103, CD138, IgG, IgA, IgD e IgM (cadeia pesada $\mu$ ) e cadeias leves kappa ou lambda
Células NK	CD16, CD56, CD57
Marcadores de ativação	CD38, HLA-DR, CD23, CD11c e CD25
Marcadores de proliferação	CD71 e Ki67
Blastos	CD34, TdT e CD117

#### 4.6. Hemostase

A hemostase é a resposta fisiológica que mantém a integridade dos vasos sanguíneos de modo a prevenir e interromper hemorragias ou coagulação excessiva. Os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes são responsáveis pelo equilíbrio hemostático (Toulon, 2016).

No laboratório da SYNLAB, a função da coagulação é avaliada no BCS XP, da Siemens. Os parâmetros avaliados são tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina ativado (aPTT), fibrinogênio, proteína C, proteína S livre, antitrombina III funcional (AT III funcional), fatores V, VII, VIII, anticoagulante lúpico e d-dímero.

A avaliação de TP e aPTT tem o propósito de monitorizar a terapêutica de anticoagulantes, avaliação inicial de hemorragias e também pode ser solicitado na triagem pré-operatória de rotina. Os distúrbios hemorrágicos podem ser classificados em defeitos hemostáticos primários ou secundários. Os defeitos hemostáticos primários devem-se a perturbações das plaquetas ou do fator de von Willebrand, enquanto os defeitos secundários são deficiências dos fatores de coagulação, devido a causas congénitas ou adquiridas (Kamal, Tefferi, & Pruthi, 2007).

#### 4.6.1. Tempo de protrombina (TP)

O tempo de protrombina (s) avalia a via extrínseca através da medição do tempo que decorre até à formação de coágulo de fibrina, através da incubação do plasma com quantidades ótimas de tromboplastina e cálcio. O TP é utilizado na monitorização da terapêutica anticoagulante oral com antagonistas de vitamina K, deteção de deficiência nos fatores de coagulação da via extrínseca e é útil na avaliação da função hepática em doenças do fígado (Siemens Healthcare Diagnostics, 2018d).

Na monitorização da terapêutica anticoagulante oral é recomendado pela OMS a indicação dos valores de TP em *International Normalized Ratio* (INR). O INR é a razão entre o TP do doente e o TP de referência, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI). O valor de ISI é fornecido pelo fabricante (Siemens Healthcare Diagnostics, 2013).

#### 4.6.2. Tempo de tromboplastina ativado (aPTT)

O tempo parcial de tromboplastina ativada (s) é um teste de rastreio para a deteção de transtornos da via intrínseca da coagulação ou da via comum. Nos pacientes, sob terapêutica anticoagulante é expectável que o aPTT seja prolongado, devido à diminuição dos fatores II, VII, IX e X. A determinação de aPTT é útil na monitorização da terapêutica de pacientes com risco hemorrágico ou trombótico.

O procedimento analítico consiste na incubação do plasma com quantidades ótimas de fosfolípidos, ativador superficial e íões cálcio que provoca a ativação dos fatores da via intrínseca. O tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina é medido e corresponde ao aPTT (Siemens Healthcare Diagnostics, 2019).

#### 4.6.3. Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína sintetizada no fígado e nos megacariócitos e é libertada para a corrente sanguínea. Transforma-se em fibrina na presença de trombina, para formação do coágulo (Burtis & Bruns, 2016).

Níveis elevados de fibrinogénio são encontrados como resultado do comportamento como proteína de fase aguda e constituem um fator de risco nas doenças cardiovasculares. A diminuição adquirida de fibrinogénio pode ocorrer devido a

coagulopatia de consumo, doença hepática aguda ou crônica, hemorragias, queimaduras, em caso de choque e carcinoma.

A avaliação do fibrinogénio consiste na medição do tempo de coagulação através da modificação do método de Clauss. O plasma citratado é levado à coagulação com grande excesso de trombina. O tempo de coagulação depende do teor em fibrinogénio presente na amostra (Siemens Healthcare Diagnostics, 2018b).

#### 4.6.4. Proteína C

A proteína C é um inibidor da coagulação, dependente da proteína K, que regula a atividade dos fatores V e VIII. A deficiência congénita de heterozigotos aumenta o risco de trombozes venosas, dependentes da idade. A deficiência de homozigotos está associada a episódios trombóticos muito graves em recém-nascidos. A deficiência adquirida pode resultar da deficiência em vitamina K (absorção ineficaz ou terapia anticoagulante oral).

No aparelho, determina-se quantitativamente a proteína C funcionalmente ativa através da incubação do plasma citratado com um ativador específico de veneno de serpente que ativa a proteína C e por um teste cinético é medido o aumento da absorvância a 405 nm, de acordo com o esquema de reação (Fig. 6) (Siemens Healthcare Diagnostics, 2017a).

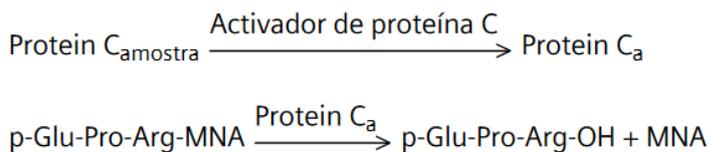


Figura 6: Equação da reação de medição da proteína C.

#### 4.6.5. Proteína S livre

A proteína S livre é uma proteína plasmática fisiologicamente ativa, dependente da vitamina K. Na coagulação exibe função anticoagulante ao atuar como cofator da proteína C ativada. A proteína S estimula a inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa através da proteína Ca e, conseqüentemente, o seu efeito inibidor da coagulação. A diminuição da atividade da proteína S aumenta o risco tromboembólico.

No teste de medição da concentração de proteína S livre, a proteína Ca produz a degradação do fator Va pela adição de veneno de víbora de Russel. A proteína S, como atua como cofator, acelera a reação. O aumento do tempo de coagulação é diretamente proporcional à atividade da proteína S livre presente na amostra. O momento da coagulação é detetado de forma óptica (Siemens Healthcare Diagnostics, 2014).

#### 4.6.6. Antitrombina III funcional (AT III funcional)

A antitrombina III funcional é um inibidor plasmático da trombina e do fator X ativado e forma um complexo inativo irreversível com essas enzimas. A determinação da antitrombina III fisiologicamente ativa permite o diagnóstico de deficiência hereditária e adquirida de antitrombina III, que representa risco elevado de trombose. As deficiências adquiridas podem ser consequência do consumo de antitrombina III após operações de maior dimensão ou devido a coagulação intravascular disseminada (CID) em casos de sepsis, nefroses, lesões hepáticas parenquimais e contracetivos com estrogénio.

O método para a determinação quantitativa da AT III funcional consiste na conversão da AT III da amostra num inibidor imediato através da heparina e inativa a trombina presente. O conteúdo residual de trombina é determinado por um teste cinético, medindo o aumento da absorvância a 405 nm, segundo o esquema reacional (Fig. 7). A alteração na absorvância está inversamente proporcional com a atividade da AT III na amostra (Siemens Healthcare Diagnostics, 2018a).

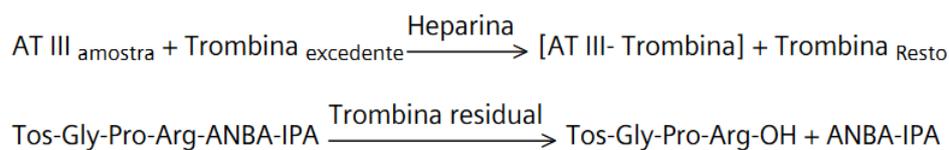


Figura 7: Equação da reação de medição de antitrombina III funcional.

#### 4.6.7. Fator V

O fator V é uma proteína da coagulação, pertencente à via comum da coagulação (Chaudhry, Usama, & Babiker, 2021). A determinação do fator V é útil para o diagnóstico de deficiências em fator V, congénitos ou adquiridos. As deficiências congénitas são raras, enquanto as adquiridas detetam-se em casos de disfunção hepática, coagulopatia de

consumo, hiperfibrinólise e tumores. Uma mutação frequente do fator V está associado a risco aumentado de tromboembolia.

O princípio do método que ocorre no aparelho consiste na incubação de plasma com deficiência de fator de coagulação V com plasma diluído do paciente e tromboplastina, que conduz à ativação dos fatores da via extrínseca da coagulação. É medido o tempo decorrido desde a adição de tromboplastina até à formação de coágulo de fibrina. O plasma do paciente com deficiência em fator V não será capaz de compensar a ausência do fator do plasma com deficiência desse fator, resultando num TP prolongado. (Siemens Healthcare Diagnostics, 2018c).

#### 4.6.8 Fator VII

O fator VII é uma proteína da coagulação, da via extrínseca. O fator VII, como tem o tempo de semi-vida mais curto, é o primeiro fator a aumentar o TP nos casos de doença hepática (Chaudhry et al., 2021).

À semelhança do princípio utilizado para o fator V, o plasma diluído do paciente é incubado com plasma deficiente em fator VII e tromboplastina para medir o TP. O plasma do paciente com deficiência em fator VII não será capaz de compensar a ausência do fator do plasma com deficiência desse fator, resultando num TP prolongado (Siemens Healthcare Diagnostics, 2018d, 2018c).

#### 4.6.9. Fator VIII

O fator VIII é uma proteína da coagulação da via comum. A hemofilia A é uma perturbação da coagulação causada pela diminuição da atividade de fator VIII e é herdada por um padrão recessivo ligada ao cromossoma X (Chaudhry et al., 2021). A gravidade da hemofilia A depende do grau de deficiência em fator VIII. A hemóstase mínima é assegurada por uma atividade de fator VIII de aproximadamente 10%-40%. Abaixo desses valores, existe risco acrescido de hemorragia.

A atividade do fator VIII é medida através de um teste cromogénico. O fator VIII ativado pela trombina acelera a conversão do fator X em fator Xa na presença de fator IX ativado, fosfolípidos e íons de cálcio. A atividade de Xa é avaliada pela hidrólise de um

substrato o p-nitroanilida (pNA) específico do fator Xa. A taxa de libertação inicial de pNA medida a 405 nm é diretamente proporcional à atividade do fator Xa e, conseqüentemente, à atividade do fator VIII presente na amostra (Siemens Healthcare Diagnostics, 2017b).

#### 4.6.10. Anticoagulante lúpico (AL)

O anticoagulante lúpico (AL) é constituído por autoanticorpos contra fosfolípidos carregados negativamente ou complexos de fosfolípidos com  $\beta$ -2-glicoproteína 1 ou factores de coagulação como a protrombina. O AL ocorre principalmente em doenças autoimunes e é um fator de risco para os pacientes com trombozes de etiologia desconhecida. O AL é detetado com testes de coagulação sensíveis a fosfolípidos, como é exemplo do APTT que é prolongado.

O anticoagulante lúpico é detetado com a utilização de um reagente com ativador de veneno de víbora de Russel que provoca a coagulação através da ativação direta do fator X. Os anticorpos AL prolongam o tempo de coagulação do reagente de rastreio. Quando o teste de rastreio é prolongado faz-se uma segunda incubação do plasma do doente com reagente rico em fosfolípidos para correção específica de anticoagulante lúpico, como teste confirmatório.

No laboratório da SYNLAB, para excluir a deficiência de fatores II, V e X, faz-se uma mistura 1:1 de plasmas de utentes com plasma normal e do plasma em estudo (Siemens Healthcare Diagnostics, 2017d).

#### 4.6.11. D-dímero

O d-dímero é o produto da degradação da fibrina de ligações transversão. A análise é indicada para utilização em conjunto com um modelo de avaliação de probabilidade pré-teste clínico para excluir trombose venosa profunda (TVP) e embolismo pulmonar (EP) em doentes em ambulatório com suspeita destas patologias. Pode ser utilizada para monitorização de mudança relativa da concentração de d-dímero.

No equipamento, as partículas de polietileno covalente revestidas com anticorpo monoclonal (8D3) agregam-se quando misturadas com amostras com d-dímero. A região

de ligações transversais de d-dímero possui uma estrutura esterióssimétrica, isto é, o determinado antigénio para o anticorpo monoclonal ocorrer 2 vezes. Consequentemente, basta apenas um anticorpo para despoletar uma reação de agregação que é depois detetada turbidimetricamente através do aumento da turvação (Siemens Healthcare Diagnostics, 2017c).

## 5. Imunologia

A imunologia é o estudo do sistema imunológico responsável pela proteção contra agentes patogénicos por meio de várias linhas de defesa. O sistema imunitário é altamente regulado e quando ocorre perturbação do seu equilíbrio, pode ocorrer doenças infecciosas, autoimunes e alérgicas.

A avaliação da resposta do sistema imunitário pode ser realizada em soro, urina 24 horas e LCR.

### 5.1. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas ou proteinograma é uma técnica no rastreio de anormalidade nas proteínas séricas. No equipamento Capillarys 2, da Sebia, as moléculas carregadas são separadas de acordo a sua mobilidade eletroforética dentro de um capilar de sílica preenchido com um tampão alcalino com um pH específico, por eletroforese capilar. A separação também é influenciada pelo pH do eletrólito e o fluxo eletrosmótico. A deteção das proteínas é detetada por UV a 200 nm na extremidade do capilar. As proteínas são separadas em 6 frações distintas, nomeadamente albumina,  $\alpha$ 1-globulinas,  $\alpha$ 2-globulinas,  $\beta$ 1-globulinas,  $\beta$ 2-globulinas e  $\gamma$ -globulinas (Sebia, 2013).

O proteinograma está indicado para a identificação dos doentes com mieloma múltiplo ou com desordens de outras proteínas séricas (O'Connell, Horita, & Kasravi, 2005).

#### 5.1.1. Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no sangue, sintetizada no fígado, com função transportadora de proteínas e de manutenção da pressão osmótica (Silva, Lopes,

& Faria, 2008). A diminuição da concentração da albumina no sangue pode dever-se a doença hepática que compromete a sua síntese ou em casos de perda ou destruição desta proteína. Desnutrição, síndrome nefrótica, terapia hormonal, gravidez e queimaduras também podem ser responsáveis pelo decréscimo do nível de albumina. O aumento de albumina pode estar associado a desidratação (O'Connell et al., 2005).

#### 5.1.2. Fração $\alpha_1$

A fração  $\alpha_1$  representa  $\alpha_1$ -antitripsina, protrombina, transcortina, globulina ligadora de tiroxina e  $\alpha$ -fetoproteína. Esta fração tende a aumentar em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, de forma inespecífica. A  $\alpha_1$ -antitripsina corresponde a 90% do pico normal da fração  $\alpha_1$ . A deficiência homocigótica em  $\alpha_1$ -antitripsina e a cirrose hepática são as principais causas da diminuição do pico na banda  $\alpha_1$  (Silva et al., 2008).

#### 5.1.3. Fração $\alpha_2$

Na fração  $\alpha_2$  migram ceruloplasmina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, haptoglobina eritropoetina e a colinesterase e tendem a apresentar maior concentração em processos de fase aguda (Silva et al., 2008).

#### 5.1.4. Fração $\beta$

A fração  $\beta$  é constituída por transferrina (pico  $\beta_1$ ),  $\beta$ -lipoproteínas (pico  $\beta_2$ ) proteína do complemento C3. A transferrina está aumentada na anemia ferropénica, na gravidez e no uso de métodos contraceptivos hormonais. A diminuição de C3 está relacionada com doenças glomerulares. O aumento das  $\beta$ -lipoproteínas ocorre devido ao excesso de colesterol sérico em situações como hipotireoidismo, icterícia obstrutiva e diabetes *mellitus* (Silva et al., 2008). IgA, IgM, IgG e proteínas do complemento podem ser identificadas na fração  $\beta$  (O'Connell et al., 2005).

#### 5.1.5. Fração $\gamma$

A fração  $\gamma$  é constituída por imunoglobulinas (Ig). Os anticorpos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE constituem a fração  $\gamma$ . A IgG é a única imunoglobulina que migra por toda a

fração  $\gamma$ . As alterações do pico da banda  $\gamma$  refletem o que ocorre com IgG. A IgA migra tipicamente na área de junção com a fração  $\beta$ . A IgM na região entre IgG e IgG e é detetada em situações de infecção aguda (Silva et al., 2008).

A proteína C reativa (PCR) está localizada entre as frações  $\beta$  e  $\gamma$  (O'Connell et al., 2005).

## 5.2. Imunofixação

A imunofixação é uma técnica que combina a eletroforese e imunoprecipitação utilizada para a detecção de bandas monoclonais em amostras de soro e urina (Bence Jones), no diagnóstico de mieloma múltiplo.

O procedimento é processado automaticamente no equipamento HYDRASYS, da Sebia. Numa primeira fase ocorre a migração de proteínas em gel de agarose, depois são adicionados antissoros para IgG, IgM, IgA, cadeia Kappa e cadeia Lambda ao longo do gel onde ocorreu a migração. Após incubação, os anticorpos precipitam as proteínas alvo. O imunoprecipitado criado fica fixado ao gel e as restantes proteínas são removidas por lavagem e absorção com papel de feltro. A coloração das proteínas é feita com coloração violeta ácido (Amin Nordin et al., 2020; Bossuyt, Bogaerts, Schiettekatte, & Blanckaert, 1998).

## 5.3. ELISA

O imunoensaio enzimático (ELISA) é baseado numa reação imunológica entre anticorpo e antigénio, seguido de reação enzimática despoletada por adição de um substrato. Consoante o formato do ELISA, é possível detetar anticorpos ou antigénios nas amostras de soro para avaliação da resposta imunológica e auxílio no diagnóstico de infeções virais ou bacterianas.

Esta técnica é também feita de forma automatizada, no aparelho Euroimmun Analyzer I-2p. Na determinação semiquantitativa de anticorpos no soro por ELISA direto, as amostras diluídas dos pacientes são incubadas nos poços revestidos com antigénio, numa primeira reação. No caso de as amostras serem positivas, os anticorpos ligam-se ao antigénio. Numa segunda fase, ocorre uma segunda incubação com IgG anti-humana

marcada enzimaticamente, capaz de catalisar uma reação de cor após a adição de substrato. No final é adicionada uma solução de paragem e é efetuada a leitura fotométrica num comprimento de onda de 450 nm e um comprimento de onda de referência. A intensidade luminosa é diretamente proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra (620-650 nm).

Neste equipamento são avaliados a serologia e autoimunidade. Na serologia, detetam-se IgA, IgG e IgM anti-*Chlamydia trachomatis*, IgA e IgG anti-*Helicobacter pylori*, IgA e IgG anti-SARS-CoV-2, IgG e IgM anti-HSV-1 (gC1), IgG e IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae*, IgM e IgG anti-HSV-2 (gG2), IgM e IgG anti-HSV-1.

Quanto à avaliação da autoimunidade, pesquisa-se IgG anti-C1q (CIC), IgM e IgG anti-fosfolípidos e IgG anti-dsDNA pelo método de ELISA (Alhajj & Farhana, 2021; EUROIMMUN, 2022).

#### 5.4. Phadia™ 1000

O Phadia™ 1000, da Thermo Fisher, é um equipamento utilizado para quantificação de IgE no soro através do método de FEIA, no diagnóstico de alergias. A alergia é uma reação de hipersensibilidade imediata devido à exposição a um alérgico.

O alérgico de interesse, acoplado covalentemente ao ImmunoCAP, reage com os anticorpos específicos na amostra. Após remoção de anticorpos inespecíficos por lavagem, os anticorpos contra isotipos específicos marcados por enzima são adicionados para formar um complexo. Depois da incubação, o conjugado enzimático não ligado é removido por lavagem e o complexo ligado é incubado com um agente de desenvolvimento. Com a paragem da reação, a fluorescência do eluato é medida. O valor de resposta é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos específicos para o alérgico presentes na amostra. Para avaliar os resultados do teste, os valores das respostas das amostras do paciente são transformados em concentrações através da utilização de uma curva de calibração (ThermoFisher, 2020d).

#### 5.4 Autoimunidade

As doenças autoimunes surgem da resposta imunitária inadequada contra o próprio organismo, controlada por propriedades dos genes e do ambiente. Ambas podem

aumentar a suscetibilidade à autoimunidade ao afetarem a reatividade e a qualidade das células do sistema imunitário. Os antígenos, específicos ou não de órgãos, alvo do ataque imunológico são controlados por estes fatores. A especificidade do antígeno é afetada pela apresentação e reconhecimento de antígeno, expressão do antígeno e estado e resposta dos órgãos-alvo (Marrack, Kappler, & Kotzin, 2001).

No laboratório da SYLAB, as doenças autoimunes são avaliadas no Phadia™ 250 (ThermoFisher), na técnica de ELISA, por Imunofluorescência Indireta e por ImmunoBlot. Os autoanticorpos são marcadores específicos para o diagnóstico as doenças autoimunes.

#### 5.4.1. Phadia™ 250

Os autoanticorpos são detetados pela técnica EliA™ (imunoensaio fluoroenzimático – FEIA). Os poços de poliestireno EliA™ pré-revestidos com antígeno específico são incubados com soro. Na presença de autoanticorpos na amostra, estes ligam-se ao antígeno. Após lavagem dos anticorpos não ligados, são adicionados anticorpos marcados enzimaticamente contra anticorpos (IgA, IgG ou IgM) humanos, que se ligam aos autoanticorpos complexados aos antígenos específicos. O conjugado não ligado é lavado e o complexo fixado é incubado com solução de desenvolvimento. Após paragem da reação, procede-se à leitura da fluorescência gerada. O valor de resposta é diretamente proporcional à concentração de autoanticorpo presente na amostra.

Na tabela 4, estão apresentados os autoanticorpos que se podem pesquisar para diagnóstico de doenças autoimunes (ThermoFisher, 2015a, 2020b, 2020c).

Tabela 4: Doenças autoimunes e respetivos autoanticorpos associados.

Doença autoimune	Autoanticorpos
Doença celíaca	Anti-Transglutaminase tecidual IgA e IgG
	Anti-Gliadina desaminada IgA e IgG
	Anti-Gliadina IgA e IgG
Artrite reumatóide	Anti-Péptido citrulinado cíclico (CCP)
	Fator reumatoide IgA e IgG
Vasculite e Síndrome de Goodpasture	Anticorpos contra mieloperoxidase

Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	Anticorpos contra proteinase 3 Anticorpos contra membrana basal glomerular (anti-GBM)
Doença hepática autoimune	Anti-mitocôndria
Síndrome antifosfolípídica	Anti-Cardiolipina IgA, IgG e IgM Anti- $\beta$ 2-glicoproteína I IgA, IgG e IgM
Doença tiroidea autoimune	Anti-Recetor da tiroglobulina (anti-TSH-R) Anti-peroxidase da tiroide
Anemia Perniciosa	Anti-Fator intrínseco

#### 5.4.1.1. Doença celíaca

Doença celíaca é uma doença autoimune, em pessoas geneticamente predispostas, devido à ingestão de glúten, gliadina do trigo insolúvel em água e prolaminas do centeio e cevada que provoca uma inflamação crónica, causando lesões na mucosa do intestino delgado. A transglutaminase tecidual (tTG) é considerada o principal autoantígeno da doença celíaca. Os anticorpos IgA anti-tTG é um marcador serológico com especificidade elevada para a doença celíaca. Os anticorpos IgG anti-tTG, por sua vez, são menos específicos, no entanto, auxilia no diagnóstico de doença celíaca nos doentes com deficiência em IgA (ThermoFisher, 2012, 2020c).

#### 5.4.1.2. Artrite reumatoide (AR)

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistémica caracterizada pela inflamação crónica das articulações e pode resultar na erosão e destruição gradual da cartilagem.

O fator reumatoide (FR) é um anticorpo contra a fração Fc da IgG. Os complexos imunológicos formados por FR e IgG são responsáveis pela artrite reumatoide. De acordo com a história clínica, o FR permite o diagnóstico e o prognóstico de AR. No entanto, em cerca de 20% dos doentes com AR não é detetado FR e a positividade para FR não é exclusivo de AR, uma vez que também está presente noutras doenças autoimunes e infecciosas (ThermoFisher, 2015b).

Como a sensibilidade do FR é limitada para artrite reumatoide, o anticorpo contra péptido cíclico citrulado (CCP) é altamente específico para AR (ThermoFisher, 2020b).

A deteção de anti-CCP e fator reumatoide IgA e IgM permitem o diagnóstico da artrite reumatoide, juntamente com outras informações clínicas.

Anti-CCP e fator reumatoide IgM podem ser detetados antes do aparecimento dos sintomas, no entanto estão associados a artrite reumatoide mais grave. A dupla positividade para fator reumatoide IgA e IgM é altamente específico para o diagnóstico de artrite reumatoide. Nas situações de fator reumatoide IgA elevado, está associado à atividade da doença e pode levar a uma resposta clínica fraca aos inibidores de TNF- $\alpha$  (ThermoFisher, n.d.-b).

#### 5.4.1.3. Síndrome anti-fosfolípido

A síndrome anti-fosfolípido (SAF) ou síndrome de Hughes é caracterizada por sintomas como trombozes arteriais/venosas ou abortos recorrentes, em simultâneo com resultados positivos persistentes para os autoanticorpos anti-fosfolípidos.

Os anticorpos anti-cardiolipina pertencem ao grupo de autoanticorpos anti-fosfolípidos. Além de auxiliarem no diagnóstico de síndrome anti-fosfolípido, também servem para avaliar o risco trombótico nos doentes com lúpus eritematoso sistémico (LES) (ThermoFisher, 2015a).

Quando os anticorpos anticardiolipina e o anticoagulante lúpico são negativos e existe uma forte suspeita de síndrome antifosfolipídica, a deteção de anticorpos  $\beta$ 2-glicoproteína I pode ajudar no diagnóstico de SAF (ThermoFisher, 2011).

#### 5.4.1.4. Doença tiroideia

A doença autoimune da tiroide inclui doenças autoimunes distintas, mas patogenicamente relacionadas com a tiroide, como é o caso da doença de Graves ou a tiroidite de Hashimoto. Os autoanticorpos responsáveis por estas doenças são anti-recetor TSH, anti-tiroglobulina (anti-TG) e anti-peroxidase da tiroide (anti-TPO).

A grande maioria dos doentes com tiroide (>98%) possui anticorpos anti-TG e/ou anti-TPO. Na doença de Hashimoto, a maioria dos doentes apresenta anti-TG e anti-TPO, enquanto na doença de Graves 30% dos pacientes possui anti-TG e 70% apresenta anti-TPO. Anti-TG está presente também noutros tipos de doenças autoimunes da tiroide,

assim como em doenças autoimunes não tiroideias. A tiroglobulina como é uma glicoproteína fundamental na biossíntese de T3 e T4, nestas doenças os níveis de T3 e T4 produzidos e secretados são reduzidos. O anti-TPO impede que a peroxidase da tiroide (hemoproteína de membrana integral) catalise a iodinação da TG e também o acoplamento de dois redúdos de iodotirosina presentes na molécula de TG para formar tiroxina (ThermoFisher, 2016, 2020a).

A doença de Graves (hipertiroidismo) deve-se à ligação de anticorpos ao recetor de TSH, que ativam as células foliculares da tiroide. A grande maioria dos doentes recentemente diagnosticados tem anticorpos anti-TSH-R detetáveis no soro (ThermoFisher, 2017a).

#### 5.4.1.5. Anemia perniciosa

A anemia perniciosa é uma gastrite atrófica autoimune e caracteriza-se pela deficiência em vitamina B12.

Em indivíduos normais, as células parietais produzem fator intrínseco, que tem a função de transporte de vitamina B12 pela parede de íleo. Na anemia perniciosa, os anticorpos anti-fator intrínseco e os anticorpos dirigidos às células parietais comprometem a absorção de vitamina B12 e, por isso, são úteis para o seu diagnóstico (ThermoFisher, n.d.-a).

#### 5.4.1.6. Doença de Crohn vs Colite ulcerosa

A doença de Crohn e a colite ulcerosa são doenças inflamatórias intestinais caracterizadas por inflamação do trato gastrointestinal e os sintomas associados são diarreia, dor abdominal, hemorragia retal, perda de peso e anemia.

A medição combinada de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos com perfil perinuclear (pANCA) é a forma utilizada para o diagnóstico diferencial de doença de Crohn e colite ulcerosa (Tabela 5) (ThermoFisher, 2017b).

Tabela 5: Diagnóstico diferencial de Doença de Crohn e Colite ulcerosa

	Doença de Crohn	Colite ulcerosa
ASCA	Positivo	Negativo
pANCA	Negativo	Positivo

#### 5.4.2. Imunofluorescência indireta (IFI)

A imunofluorescência indireta, utilizando as células Hep-2 como substrato, é o método de referência para o *screening* de autoanticorpos dirigidos aos componentes nucleares e citoplasmáticos. A detecção destes autoanticorpos contribui para o diagnóstico de diversas doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença mista do tecido conjuntivo, artrite reumatoide (AR), síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva e hepatite crônica autoimune ativa. Os padrões de fluorescência obtidos pela ligação dos autoanticorpos aos constituintes nucleares ou citoplasmáticos permitem distinguir o tipo de doenças autoimunes, assim como também é possível determinar os títulos dos autoanticorpos (Voigt et al., 2012).

As lâminas de IFI são preparadas de forma automatizada no aparelho Sprinter XL (Euroimmun) com duas diluições diferentes. A aquisição de imagens focadas dos campos de reação é obtida por microscopia de imunofluorescência automatizada. Os padrões de fluorescência são avaliados pelo software EUROPattern (Euroimmun), que é um sistema de diagnóstico assistido por computador que implica a validação técnica de todos os resultados pelos técnicos de laboratório. As intensidades de sinal de amostras positivas e negativas diferem significativamente e a avaliação microscópica permite a determinação do padrão de fluorescência. Cada anticorpo ligado corresponde a um padrão de fluorescência típico, de acordo com a localização do autoantígeno correspondente (Euroimmun, 2019; Voigt et al., 2012).

Em anexo, estão representados os alguns padrões de resultados negativos e positivos para autoanticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos em células Hep-2.

#### 5.4.3. Immunoblot

O ensaio *immunoblot* é uma técnica automatizada efetuada no equipamento EUROBlot One (Euroimmun), que utiliza tiras de teste revestidas com múltiplos

antigénios. Na primeira etapa de reação, as tiras são incubadas com amostras diluídas. No caso de as amostras serem positivas, os anticorpos específicos IgG (também IgM e IgA) ligam-se ao antigénio correspondente. As tiras são submetidas a uma segunda incubação com IgG anti-humana marcada enzimaticamente, capaz de catalisar uma reação de cor para revelar os anticorpos que se ligaram na primeira reação.

Neste equipamento são efetuados os perfis ANA, hepático, esclerose sistémica, neuronais, miosites e mitocondrial (Tabela 6) (Euroimmun, n.d., 2016b, 2016a, 2017c, 2017a, 2017b).

Tabela 6: Perfil de autoanticorpos e possível diagnóstico (Euroimmun, n.d., 2016b, 2016a, 2017c, 2017a, 2017b).

Perfil	Antigénios alvo dos autoanticorpos	Diagnóstico
ANA (IgG)	dsDNA, nucleossomas, histonas, SS-A, Ro-52, SS-B, nRNP/Sm, Sm, Mi-2 $\alpha$ , Mi-2 $\beta$ , Ku, CENP A, CENP B, Sp100, PML, Scl-70, PM-Scl100, PM-Scl75, RP11, RP155, gp210, PCNA e DFS70	Síndrome de Sharp, LES, síndrome de Sjögren, esclerose sistémica progressiva, poli/dermatomiosite, síndrome de sobreposição, síndrome de CREST, colangite biliar primária
Hepático (IgG)	AMA-M2, M2-3E (BPO), Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP e Ro-52	Colangite hepática biliar primária, aumento de transaminases por razões desconhecidas, suspeita de hepatite autoimune
Esclerose sistémica (IgG)	Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, RP155, fibrilarina, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR e Ro-52	Esclerose sistémica progressiva (formas difusa e limitada), síndrome de sobreposição
Anticorpos anti-neuronais (IgG)	Anfifisina, CV2, PNMA2 (Ma2/Ta), Ri, Yo e Hu	Síndrome paraneoplásica neurológica (SPN)

Miosites (IgG)	Mi-2 $\alpha$ , Mi-2 $\beta$ , TIF1 $\gamma$ , MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl100, PM- Scl75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Ro-52 e cN-1A	Poli/dermatomiosite, miosite idiopática, síndrome antissintetase, miosites de corpos de inclusão e síndromes de sobreposição
Mitocondrial (IgG)	AMA-M2, M2-3E, M4 e M9	Colangite biliar primária

## 6. Microbiologia

A Microbiologia Clínica é a área dedicada ao isolamento e caracterização dos organismos infecciosos e na determinação da suscetibilidade aos agentes antimicrobiológicos. Embora as metodologias em microbiologia tenham evoluído com o avanço de novas tecnologias, os métodos culturais e fenotípicos para a identificação de microrganismos em cultura permanecem na prática diária do laboratório (Chandler, 2013).

O setor da Microbiologia é onde maior variedade de amostras chegam para estudo bacteriológico, parasitológico, micológico ou micobacteriológico, dependendo do tipo de produto e da análise requisitada.

O diagnóstico de doenças infecciosas está extremamente dependente da qualidade das amostras, da quantidade apropriada e do acompanhamento de informação clínica pertinente (Chandler, 2013). A correta análise e interpretação de resultados implica que as amostras sejam selecionadas, colhidas e transportadas corretamente (Baron et al., 2013).

Na interpretação dos resultados laboratoriais, deve-se ter em conta as informações clínicas, como género, idade e sintomatologia, data de início, exposições significativas e estado imunológico, de modo a evitar a antibioterapia desnecessária (Baron et al., 2013; Washington, 1996).

Estas informações são importantes para valorização clínica. O local anatómico, de onde se colhe a amostra, é constituído por microbiota inofensiva que na interpretação clínica não tem significado clínico. Dá-se o exemplo do estafilococos coagulase-negativa que fazem parte da microbiota da pele, trato gastrointestinal, vagina, uretra e trato

respiratório superior. Quando é isolado de amostras destes locais anatómicos, geralmente interpreta-se como não tendo significado clínico. No entanto, no contexto de infeções associadas a dispositivos intravasculares e materiais protéticos implantados, o isolamento de estafilococos coagulase-negativa em vários locais do dispositivo em várias amostras de sangue colhidas separadamente é de valorizar (Washington, 1996).

O estágio da SYNLAB, na área da Microbiologia, foi mais focado na bacteriologia e o presente relatório descreve as técnicas realizadas durante o estágio.

### 6.1. Triagem

A triagem é muito importante para processar apenas as amostras adequadas e garantir resultados viáveis. Na avaliação das condições das amostras tem-se em atenção a natureza do produto, o modo de colheita, o transporte, entre outros (Fonseca et al., 2004).

### 6.2. Exame microscópico

A observação microscópica fornece informações sobre a qualidade da amostra e permite identificar de forma presuntiva os microrganismos através da morfologia característica microbiana e do local de colheita (Fonseca et al., 2004; Murdoch, Werno, & Jennings, 2019).

A preparação dos esfregaços para observação ao microscópio, depende da consistência e tipo de amostra. Nas amostras líquidas, coloca-se uma gota da amostra na lâmina e estender numa camada fina e, quando já estiver seca, fixa-se com metanol. Para amostras sólidas, coloca-se uma gota de água destilada na lâmina para colocar uma porção de amostra e emulsionar, estendendo por fim. Procede-se também com secagem e fixação com etanol. A preparação dos esfregaços de amostras espessas ou purulentas baseia-se na técnica de estiramento, ou seja, coloca-se uma porção de amostra na lâmina e com outra lâmina pressiona-se e faz-se deslizar as lâminas ao longo uma da outra.

Nos exames diretos a fresco, a preparação da amostra não envolve coloração e consiste apenas na colocação da amostra na lâmina, cobrir com lamela e observar ao microscópio com objetiva de 10x e de 40x. Com a observação direta pretende-se obter

uma visão geral dos elementos celulares e distinguir os microrganismos (bactérias, fungos ou parasitas).

A observação microscópica de preparações coradas tem a vantagem de se identificarem características morfológicas mais distintas, como a forma e afinidade para os corantes (Fonseca et al., 2004).

No laboratório de microbiologia, as colorações de Gram e de Kinyoun são efetuadas de forma automática pelo aparelho PolyStainer (IUL), que é programado para cada procedimento de coloração.

Na observação de esfregaços corados com coloração de Gram é possível distinguir bactérias Gram positivas (azul-violeta) e bactérias Gram negativas (vermelho) e caracterizar as suas estruturas (cocos, bacilos ou filamentos ramificados) e tamanho. As bactérias adquirem cores diferentes consoante a composição da parede celular. As bactérias Gram positivas têm uma parede celular de peptidoglicanos espessa que tem a capacidade de reter o corante violeta cristal. Nas bactérias Gram negativas, a camada de peptidoglicanos é mais fina e, por isso, não retém o corante cristal violeta e quando são incubadas com corante safranina ficam vermelhas (Tille, 2017).

Existem bactérias, as micobactérias, que são ácido álcool resistentes e não coram com coloração de Gram, pela parede celular ser constituído por ácido micólico (lípidos cerosos). Na técnica de Kinyoun, a parede celular das micobactérias adquire uma cor vermelha por manter o corante fucsina devido à capacidade de resistência à descoloração por álcool-ácido, conferida pelo elevado teor em ácido micólico na parede celular. A observação microscópica, utilizando esta coloração, permite o diagnóstico precoce de infeção de micobactérias, dado que o período de incubação em meios de cultura é extremamente prolongado (Tille, 2017).

### 6.3. Exames culturais

Os meios de cultura permitem o crescimento e o isolamento dos microrganismos presentes num produto biológico através do mimetismo do seu ambiente natural pela adição de nutrientes, fatores de crescimento e/ou inibidores. Consoante a composição destes elementos, os meios de cultura podem ser seletivos, não seletivos, de enriquecimento ou diferenciais (Bonnet, Lagier, Raoult, & Khelaifia, 2019).

Os meios seletivos permitem o isolamento de determinado microrganismo, por inibirem o crescimento de microbiota indesejada pelo efeito de antibióticos, químicos, antissépticos, sais de sódio, corantes, entre outros inibidores (Bonnet et al., 2019). Os meios nutritivos ou não seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos. Os meios seletivos e não seletivos também podem ser diferenciais, por permitirem a diferenciação das características dos microrganismos de interesse. Os meios líquidos de enriquecimento (caldos) permitem a recuperação de microrganismos presentes em menor quantidade nas amostras (Tille, 2017).

A escolha dos meios de cultura vai depender do tipo de produto biológico para permitir o crescimento dos microrganismos mais prováveis de provocar infeção no local anatómico onde se colheu a amostra.

Na tabela 7, estão dispostos os meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia da SYNLAB (Tille, 2017).

Tabela 7: Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia.

Meio de cultura	Classificação	Princípio
CLED (Cistina lactose deficiente em eletrólitos)	Não seletivo, diferencial	Isolamento de microrganismos presentes na urina, com diferenciação pela capacidade de fermentar lactose e a deficiência de eletrólitos inibe o <i>swarming</i> de <i>Proteus</i> spp.
COS (gelose Columbia + 5% sangue de carneiro)	Não seletivo, diferencial	Favorece o crescimento de bactérias fastidiosas e também adequado para o crescimento de bactérias anaeróbias. Distinção pelas propriedades hemolíticas, nomeadamente, hemólise total, parcial ou sem hemólise ( $\beta$ -, $\alpha$ -, $\gamma$ -hemolíticos, respetivamente).
CNA (gelose Columbia com sangue carneiro suplementado com colimicina e ácido nalidíxico)	Seletivo, diferencial	Crescimento de bactérias Gram positivas e inibição de bactérias Gram negativas por efeito da mistura inibitória CNA. Também permite diferenciação das propriedades hemolíticas.

PVX (Polyvitex ou Gelose chocolate)	Não seletivo, enriquecimento	Crescimento das bactérias fastidiosas <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> devido à presença de fatores X e V (obtido da hemólise dos eritrócitos). Incubação numa atmosfera 5% em CO <sub>2</sub> .
VCAT (Gelose chocolate com vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetropim)	Seletivo	Crescimento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> , com incubação numa atmosfera 5% em CO <sub>2</sub> . Também tem fatores X e V. A mistura VCAT inibitória inibe o crescimento de bacilos Gram negativos e leveduras
CAM (Gelose Campyloesel)	Seletivo	Crescimento de <i>Campylobacter</i> intestinal (principalmente <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> )
MacConkey	Seletivo, diferencial	Crescimento de bactérias Gram negativas ( <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>E. coli</i> ). Sais biliares e cristal violeta inibem crescimento de bactérias Gram positivas. Diferenciação pela capacidade de fermentar a lactose.
Hektoen	Seletivo, diferencial	Crescimento de bacilos enteropatogénicos Gram negativos, particularmente <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp, de amostras de fezes. Os sais biliares inibem as bactérias Gram positivas e retardam o crescimento de algumas <i>Enterobacteriaceae</i> . Diferenciação pela capacidade de fermentar os açúcares lactose, sacarose e salicina e pela produção de sulfureto de hidrogénio (H <sub>2</sub> S).
Granada (meio cromogénico)	Seletivo, diferencial	Crescimento de bactérias Gram positivas. Diferenciação por pigmentação laranja de <i>Streptococcus</i> do grupo B ( <i>S. agalactiae</i> )
MRSM (meio cromogénico)	Seletivo, diferencial	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA)

Sabouraud	Seletivo, diferencial	Crescimento de fungos e leveduras pela presença de peptonas e dextrose. Gentamicina e cloranfenicol inibe o crescimento da maioria das bactérias. Incubação a 35°C.
Müller-Hinton	Não seletivo	Meio utilizado para testes de sensibilidade antimicrobiana.
Caldo Todd-Hewitt	Seletivo	Crescimento de <i>Streptococcus</i> do grupo B ( <i>S. agalactiae</i> ), no rastreio na mulher grávida. Enriquecimento de <i>Staphylococcus aureus</i> para rastreio dos <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA)
Caldo Selenito	Seletivo	Crescimento de <i>Salmonella</i> spp. e algumas espécies <i>Shigella</i> spp. Selenito inibe maior parte das bactérias Gram positivas e negativas.
Caldo BHI ( <i>Brain heart infusion agar</i> )	Não seletivo	Meio universal para bacteriologia aeróbia exigente e para recuperação primária de fungos e de <i>Actinomycetales</i> .

### 6.3.1. Técnicas de inoculação

No laboratório de microbiologia, as técnicas de inoculação mais frequentes são método de esgotamento semi-quantitativo (com ansa calibrada de 1 µL) para amostras de urina, método de esgotamento por quadrantes (ansa de plástico ou zaragatoa) para a maioria das restantes amostras e método de espalhamento com zaragatoa para exame micológico e em antibiogramas manuais (Fig. 8) (Tille, 2017).

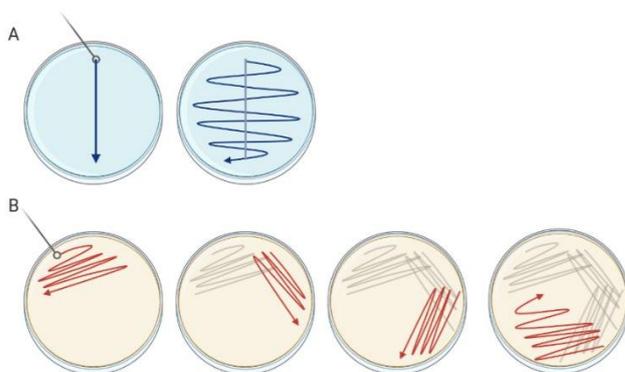


Figura 8: Técnicas de inoculação. Técnica de esgotamento semiquantitativo (A) e por quadrantes (B) (Criado com biorender.com).

### 6.5. Identificação manual

Após 18-24h de incubação dos meios de cultura, é observado o aspeto macroscópico das colónias, tendo em conta a cor, forma, dimensão, elevação, margem, superfície, consistência, produção de pigmento e alterações no meio de cultura (ex.: hemólise, alteração da cor) (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

Consoante a observação macroscópica das colónias, podem fazer-se testes de identificação baseados nas características metabólicas.

O teste da potassa é utilizado para diferenciar bactérias Gram negativas e Gram positivas. A parede celular das bactérias Gram negativas é rompida por uma solução de hidróxido de potássio 3%, que permite que os restos de DNA sejam libertados para a suspensão, ficando agregados e formam um filamento ao se elevar a ansa (reação positiva). A parede celular das bactérias Gram positivas é mais resistente e não é rompida pela adição de KOH 3% (Fonseca et al., 2004).

O teste da catalase permite identificar as bactérias Gram Positivas produtoras de catalase. Após seleção de uma colónia isolada, transfere-se com uma ansa de plástico para uma lâmina de vidro e adiciona-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3%. As bactérias com catalase desdobram o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A libertação de  $O_2$  é observada pela formação de bolhas de ar (reação positiva). A ausência ou fraca formação de efervescência é interpretado como negativo (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

O teste da coagulase é utilizado para diferenciar *Staphylococcus aureus* dos *Staphylococcus* coagulase negativa. *S. aureus* coagulase positiva produz 2 tipos de coagulase – livre e ligada. A coagulase ligada à parede celular bacteriana ou fator *clumping* reage diretamente com fibrinogénio plasmático. A precipitação do fibrinogénio resulta na aglutinação das bactérias em agregados visíveis (reação positiva). *Staphylococcus* coagulase negativa, como não possuem coagulase na forma ligada, não aglutinam na presença de fibrinogénio plasmático (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

O teste da citocromo oxidase permite a distinção das bactérias que possuem citocromo oxidase. Esta enzima atua como elo final na cadeia de respiração aeróbio, transferindo eletrões ( $H^+$ ) para o oxigénio, com formação de água. Numa lâmina de vidro, transfere-se uma colónia isolada com uma ansa de plástico e adiciona-se solução tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac). Este corante

substitui o oxigénio como aceitador de eletrões. As reações positivas revelam-se pelo desenvolvimento de cor roxa nos primeiros 10 segundos (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017). No laboratório de microbiologia da SYNLAB, utilizam-se apenas ansas de plástico descartáveis, mas não é demais ressaltar que é extremamente importante não utilizar ansas metálicas para evitar reações falso positivas.

#### 6.6. Processamento das amostras biológicas

No laboratório de microbiologia da SYNLAB, as amostras mais frequentemente processadas são urina, fezes, expectoração, lavados e aspirados brônquicos, exsudados urogenitais e orofaríngeos e hemocultura.

O processamento das amostras depende do tipo de produto biológico e da relevância clínica do microrganismo isolado. Quando as amostras não cumprem os requisitos necessários para processamento deve-se notificar o médico/serviço requisitante e em determinadas situações, como é exemplo tempo prolongado do transporte da colheita, pedir nova colheita (Fonseca et al., 2004).

##### 6.6.1. Urina

A urina assética é a amostra utilizada para avaliar a presença de infeção urinária através da observação do sedimento ao microscópio e de crescimento cultura, para no caso de ser positivo, fazer identificação e antibiograma. A urina habitualmente é um produto biológico estéril, mas pode ser contaminado pelo arrastamento de microrganismos durante a micção. A fim de evitar erros na interpretação da urocultura, na colheita da amostra, deve rejeitar-se o primeiro jato de urina (Fonseca et al., 2004).

Este produto biológico deve ser colhido com precaução para evitar a contaminação da flora comensal (Baron et al., 2013).

Na observação microscópica do sedimento a fresco, avalia-se a qualidade da amostra (número de células epiteliais por campo), presença de microrganismos e quantidade de leucócitos (resposta imunitária perante uma infeção urinária em indivíduos imunocompetentes). A observação é efetuada no equipamento automático Atellica UAS 800 Analyzer, da Siemens, que através do software integrado faz uma seleção de campos de observação com maior interesse.

As urinas asséticas são semeadas em meio CLED com ansa calibrada de 1  $\mu$ L, por método semi-quantitativo (Fig. 8). O meio CLED (cistina lactose deficiente em eletrólitos) é um meio de cultura não seletivo e diferencial das bactérias fermentadores de lactose das bactérias não fermentadoras de lactose. A deficiência em eletrólitos permite a inibição de *swarming* na presença de *Proteus* sp.

Após semear as placas, são colocadas a incubar a 37°C durante 18-24 horas. No dia seguinte é feita a observação das uroculturas e contagem do número de colónias (Tabela 8) (Fonseca et al., 2004).

Tabela 8: Leitura do número de colónias (adaptado de Fonseca et al., 2004)

Número de colónias	Unidades formadoras de colónias
1	10 <sup>3</sup> UFC/mL
10	10 <sup>4</sup> UFC/mL
100	10 <sup>5</sup> UFC/mL

A interpretação dos resultados deve ter em consideração o produto biológico, método de colheita, idade e tipo de doente (ambulatorio ou internado), sintomatologia, observação do sedimento urinário ao microscópio e histórico de exames bacteriológicos antecedentes. Também se deve ter em atenção a contaminação da amostra, que ocorre quando no exame cultural crescem duas ou mais colónias distintas (polimicrobiana) (Fonseca et al., 2004) e/ou se observam leucócitos no sedimento urinário. Na interpretação dos resultados é importante distinguir infeção, colonização e contaminação de acordo com o tipo de amostra de urina (Tille, 2017).

Ao fim de 18-24h de incubação, o resultado é considerado negativo quando o sedimento é não patológico (<10 leucócitos/campo) e não se observa crescimento bacteriano no meio de cultura. No caso de se verificar sedimento patológico (>10 leucócitos/campo) sem crescimento bacteriano é necessário proceder à observação ao microscópio do sedimento corado com coloração Gram. Se se observar bactérias, realiza-se reisolamento em meio COS a 37°C, durante 18-24 horas.

Se se considerar que as amostras de urina colhidas por jato médio têm alta probabilidade de contaminação, a interpretação das uroculturas com crescimento podem

ser interpretadas de acordo com o número de estirpes isoladas e o número de UFC/mL (Tabela 9) (Wilson & Gaido, 2004).

Tabela 9: Interpretação dos resultados de uroculturas.

Número de estirpes isoladas	Quantidade UFC/mL	Interpretação
1	$<10^2$	Possível contaminante
1	$\geq 10^2$	Isolado significativo
2	$\geq 10^5$ nas 2 estirpes	Isolado significativo
2	$\geq 10^5$ apenas 1 estirpe	Isolado significativo e contaminante
2	$<10^5$ nas 2 estirpes	Possível contaminante
$\geq 3$	$\geq 10^5$ apenas 1 estirpe	Isolado significativo e contaminantes
$\geq 3$	$\geq 10^5$ nas 3 estirpes	Possíveis contaminantes

De acordo com os critérios de Kass, o crescimento de  $\geq 10^5$  colónias é significativo de infeção urinária (Fonseca et al., 2004). Nos pacientes do sexo masculino com ITU complicadas o limite de diagnóstico de  $\geq 10^4$  fornece aumento da sensibilidade sem comprometer a especificidade (Stamm, 1992).

Nalgumas situações, uroculturas negativas não são obrigatoriamente exclusão de ITU, tais como doentes em antibioterapia, limpeza com soluções antissépticas antes de efetuar a colheita, poliúria (Norma n.º 008/2012) (Direção-Geral da Saúde, 2012).

Os microrganismos mais frequentemente associados às ITUs nas crianças e adultos são as Enterobactereáceas, sendo *Escherichia coli* o principal agente etiológico. Em ambiente hospitalar, outros microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Enterococcus* spp. podem também estar na origem de ITUs devido à exposição dos doentes internados a fatores de risco (algaliação permanente, cálculos urinários e outras complicações urinárias) (Fonseca et al., 2004).

As colónias puras valorizadas são preparadas para identificação no MALDI-TOF e o antibiograma é efetuado no VITEK®2.

### 6.6.2. Exsudados urogenitais (uretral e vaginal)

Os exsudados urogenitais são utilizados para o diagnóstico ou a exclusão de infecções sexualmente transmissíveis (IST). Os exsudados vaginais ou uretrais são colhidos com uma zaragatoa e são transportadas em meio de transporte com carvão, de modo a recuperar microrganismos, incluindo anaeróbios e fastidiosos. É também enviada uma segunda zaragatoa para realização de esfregaços (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

A determinação das amostras apropriadas para diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos. Algumas infecções do aparelho genital feminino têm origem em microrganismos da microbiota que se tornam patogênicos devido a fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da microbiota. (Fonseca et al., 2004). A grande maioria das infecções do trato genital inferior são sexualmente transmissíveis (Tille, 2017).

No exame direto a fresco dos exsudados vaginais pretende-se observar e quantificar células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e microrganismos potencialmente patogênicos. Os exsudados são inoculados nos meios COS, PVX e SAB. Os dois primeiros meios ficam a incubar a 37°C durante 48h, COS em aerobiose e PVX numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. O meio SAB é incubado em aerobiose a 30°C, durante 5 dias. As observações dos meios são efetuadas às 24 e 48 horas (Fonseca et al., 2004).

Os exsudados uretrais (masculinos e femininos) são inoculados nos meios COS e PVX. Na pesquisa de *Neisseriae gonorrhoeae*, inocula-se também meio VCAT, que é incubado em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C durante 72 horas, com observações às 24, 48 e 72 horas (Fonseca et al., 2004).

Nas mulheres grávidas, os exsudados vaginais e retais são utilizados para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, por ser o agente patológico mais frequente de infecção neonatal precoce (Areal et al., 2010). As amostras são inoculadas em meio de enriquecimento TODD, que é posteriormente colocado a incubar durante 18 a 24 horas, a 37°C. No dia seguinte, a suspensão é repicada para o meio cromogénico GRANADA, que é incubado durante 48 horas, num ambiente de anaerobiose e a 37°C. Na avaliação macroscópica das colónias, são valorizadas as colónias com pigmento laranja, sugestivas de *Streptococcus* do grupo B.

*Trichomonas vaginalis* e *Neisseriae gonorrhoeae* são os principais agentes patogênicos identificados em exsudados uretrais e retais, nas mulheres e nos homens. As vaginites são provocadas maioritariamente por *Trichomonas vaginalis*, *Neisseriae gonorrhoeae* e, raramente, por Streptococcus  $\beta$ -hemolíticos. *Chlamydia trachomatis* é responsável pela infeção do cérvix. A coloração Gram de exsudados uretrais e cervicais permite a identificação direta de *Neisseriae gonorrhoeae*. A deteção de diplococos intracelulares é sugestiva de *Neisseriae gonorrhoeae*, nos homens. Nas mulheres, a presença de diplococos extracelulares é típica da microbiota da vagina. O diagnóstico definitivo nas mulheres deve ser confirmado por exame cultural (Tille, 2017).

O diagnóstico de vaginose bacteriana é essencialmente morfológico com observação ao microscópio de *clue cells*. Em meio COS, as colónias com  $\beta$ -hemólise características de *Staphylococcus aureus* são valorizadas por poderem estar associados ao uso de tampões (Fonseca et al., 2004).

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* é realizada com recurso a testes rápidos de antígeno (imunoensaios cromogénicos). Um resultado é considerado positivo quando aparecem 2 linhas coloridas no dispositivo (Esim Buyukbayrak et al., 2010).

A identificação final é processada no MALDI-TOF e o antibiograma é efetuado no VITEK®2.

### 6.6.3. Fezes

As infeções do aparelho gastrointestinal são muito frequentes na população em geral, principalmente nas crianças e idosos com maior grau de morbidade. Na validação clínica, os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia são fundamenta para orientar a pesquisa do agente causador de infeção (Fonseca et al., 2004).

As amostras de fezes frescas devem ser transportadas para o laboratório e processadas dentro de 2 horas após a colheita, de modo a garantir a sobrevivência de *Shigella* e *Campylobacter*. No caso de impossibilidade de processamento até 2 horas, as amostras devem ser colocadas em meio de transporte Cary-Blair (Humphries & Linscott, 2015).

As amostras de fezes, quando submetidas frescas e sem conservantes, são observadas macroscopicamente para selecionar preferencialmente áreas que contenham sangue e/ou muco. Estas porções tendem a conter maior número de patogénicos entéricos e, por isso, devem ser utilizadas para processar as coproculturas. Na rotina, as preparações das amostras fecais são observadas no microscópio a fresco (Humphries & Linscott, 2015).

Na rotina, faz-se pesquisa de *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Campylobacter* spp. Todas as amostras de fezes são semeadas nos meios MacConkey, Hektoen e caldo selenito (se turvo pós incubação, efetuar subcultura para meio Hektoen) e incubados em aerobiose a 37°C, durante 18-24h. Adicionalmente, faz-se um teste rápido de rastreio de pesquisa de antígeno específico *Campylobacter* e, se o resultado for positivo, semeia-se em meio CAM e coloca-se a incubar a 42°C, num ambiente microaerófilico (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>). Os meios CAM devem ser incubados pelo menos 48h e examinados em 24 e 48 horas. Nas crianças até aos 2 anos, as fezes são também semeadas em meio CNA e incubadas a 37°C (18-24h) para despiste de *Staphylococcus aureus* (Humphries & Linscott, 2015).

Na interpretação dos resultados culturais dos meios HEKT, são valorizadas as colónias verdes a azuladas (não fermentadoras de lactose), com ou sem produção de H<sub>2</sub>S, sugestivas de *Salmonella* spp e *Shigella* spp, respetivamente. A identificação de *Shigella* ao nível da espécie pode ser executada com recurso a testes de antígeno por aglutinação de látex para antígeno somático. No caso de *Salmonella*, os antissoros dos testes de rápidos de aglutinação são dirigidos contra antígenos somáticos, flagelares e somáticos (Humphries & Linscott, 2015).

No meio MCK, as colónias cor-de-rosa (fermentadoras de lactose) são sugestivas de *Escherichia coli*. A identificação de *Escherichia coli* enterohemorrágica (O157-H7), é realizada por testes rápidos de aglutinação com antissoros contra antígenos específicos para O157 (Humphries & Linscott, 2015).

A pesquisa de *Clostridium difficile* (deteção de proteína não toxina) e de toxina A é efetuada por teste rápido de rastreio, em fezes diarreicas, quando solicitado pelo médico (Tille, 2017).

A identificação final é processada no MALDI-TOF e o antibiograma é efetuado no VITEK®2.

#### 6.6.4. Sangue

As infeções da corrente sanguínea são doenças infecciosas provocadas pela presença de microrganismos viáveis em circulação no sangue, que pode resultar no desencadeamento de uma resposta inflamatória, que pode evoluir rapidamente para sepsis (Viscoli, 2016).

A presença de bactérias na corrente sanguínea, bacteremia, pode ser transitória, contínua ou intermitente. A bacteremia transitória é assintomática e resulta de procedimentos em locais anatómicos não estéreis, como é o caso de procedimentos dentários. A bacteremia contínua ocorre com a libertação de microrganismos a uma taxa constante na corrente sanguínea, em casos de sepsis, endocardite bacteriana e outras infeções endovasculares. Na maioria das outras infeções, a bacteremia intermitente ocorre com a presença periódica de bactérias em vários períodos de tempo (Tille, 2017).

A cultura de sangue ou hemocultura são colhidas como um conjunto, onde se inocula sangue do paciente para uma garrafa aeróbia e uma garrafa anaeróbia, cada uma com um meio líquido de enriquecimento (Martinez & Wolk, 2016).

O sangue é um produto biológico estéril e, por isso, o microrganismo isolado da hemocultura por norma é o agente etiológico da infeção (Fonseca et al., 2004). Os microrganismos mais frequentes de provocar bacteremias são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* spp. (Martinez & Wolk, 2016).

A contaminação de hemocultura com microbiota da pele durante a colheita é frequente e deve-se diminuir o risco de contaminação através da correta preparação da pele antes da punção venosa com clorexidina (não recomendado para crianças <2 meses) ou tintura de iodo a 2% em adultos e crianças >2 meses (Baron et al., 2013)

A deteção de microrganismos é efetuada por um método automático no equipamento BacT/ALERT®3D. Os microrganismos presentes na amostra produzem dióxido de carbono por metabolizarem os substratos no meio de cultura. A presença de CO<sub>2</sub> na hemocultura provoca a alteração da cor do sensor no fundo de cada garrafa para

uma tonalidade mais clara. Ao se incidir luz no sensor, a luz refletida é medida por um fotodetector que compara com a leitura inicial do leitor.

As amostras são consideradas positivas quando se verifica concentração inicial de CO<sub>2</sub> elevada, taxa de produção de CO<sub>2</sub> alta incomumente e/ou produção sustentada de CO<sub>2</sub>. As amostras que ficam durante 5 dias a incubar sem produção de CO<sub>2</sub> são consideradas negativas (BioMérieux, 2010).

Quando há alerta de hemocultura positiva, esta é retirada do aparelho para se efetuar um esfregaço corado por GRAM (observação microscópio) e para realizar subcultura em meio sólido COS. Os meios podem ser incubados em atmosfera de aerobiose, com 5% CO<sub>2</sub> ou em anaerobiose, a 35°C durante 24-48 horas, consoante o microrganismo a pesquisar (Fonseca et al., 2004).

A interpretação do resultado positivo de hemocultura depende do microrganismo detetado (aeróbio ou anaeróbio) e o número de conjuntos de hemoculturas com recuperação do agente patogénico. Os resultados positivos devem ser notificados com brevidade para que a terapia antimicrobiana seja iniciada o mais rapidamente possível (Martinez & Wolk, 2016).

A identificação final é processada no MALDI-TOF e o antibiograma é efetuado no VITEK®2.

#### 6.6.5. Amostras do trato respiratório superior

A grande maioria das infeções do aparelho respiratórias superiores tem etiologia viral. No diagnóstico bacteriológico, é importante distinguir o(s) agente(s) implicado(s) na infeção da microbiota mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios. Vários agentes patogénicos, assim como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem colonizar a orofaringe de indivíduos saudáveis em pequeno número ou transitoriamente (Fonseca et al., 2004).

*Streptococcus pyogenes* (grupo A) é o principal causador de infeções bacterianas na faringe. *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* são outras bactérias potenciais

de provocar faringite. A pesquisa destas bactérias apenas é efetuada quando solicitada especificamente pelo médico, por existir suspeita clínica (Fonseca et al., 2004).

O exame direto não é recomendado, devido à existência de flora mista na orofaringe e nasofaringe, que dificulta a interpretação no diagnóstico (Fonseca et al., 2004).

Os exsudados nasofaríngeos são semeados em meio COS e caldo TODD e incubados em aerobiose a 37°C, durante 24-48h. Se o caldo TODD ficar turvo é sinal que ocorreu crescimento bacteriano e faz-se passagem do meio líquido para CNA.

A identificação e valorização das colónias é efetuada pela observação da presença ou ausência de hemólise e o tipo de hemólise em meio COS. A observação de  $\beta$ -hemólise é sugestiva de *S. pyogenes* (Tille, 2017).

*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* não são agentes etiológicos de faringite e, por isso, não são valorizados nas culturas de exsudados nasofaríngeos (Baron et al., 2013).

A colheita de amostras da nasofaringe pode ter utilidade em estudos epidemiológicos para despistar portadores de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) para vigilância e controlo de surtos de infeção nosocomial (Fonseca et al., 2004). O exsudado nasofaríngeo é inoculado num meio cromogénio para deteção de MRSA. As colónias que após incubação (a 37°C, 18-24h) apresentam cor rosa avermelhado são sugestivas de estirpes MRSA (Tille, 2017).

A identificação final é processada no MALDI-TOF e o antibiograma é efetuado no VITEK®2, à exceção de *Haemophilus influenza* (TSA manual).

#### 6.6.6. Amostras do trato respiratório inferior

O diagnóstico de infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras (expetoração, secreções e lavados brônquicos) com microrganismos da microbiota do trato respiratório superior durante a colheita, que frequentemente são os agentes etiológicos das infeções respiratórias do trato respiratório inferior. É essencial avaliar a qualidade das amostras, de modo a processar apenas os produtos viáveis. Uma amostra é considerada apropriada quando se observa ao microscópio menos de 10 células epiteliais por campo e pelo menos 25 leucócitos/campo,

na objetiva de 10x (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017). As amostras respiratórias são também coradas com coloração Kinyoun para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (Tille, 2017).

Os lavados bronco-alveolares são centrifugados a 1500 rpm, durante 15 minutos, e o sedimento é utilizado para exames direto e cultural. Os lavados após centrifugação, as expetorações e secreções brônquicas são inoculados segundo o método dos quatro quadrantes nos meios COS, HAEM e MacConkey. Os meios são colocados a incubar a 37°C, durante 24-48 horas e, adicionalmente, os meios COS e HAEM são incubados numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando requisitado pelo médico, as amostras podem ser inoculadas em meio Sabouraud para exame micológico.

As culturas do trato respiratório são normalmente culturas mistas e a interpretação baseia-se na consideração dos microrganismos predominantes e naquelas conhecidos como patogénicos relevantes (Murdoch et al., 2019).

As culturas são valorizadas tendo em consideração a observação de Gram, Ziehl-Neelsen e a informação clínica para posteriores reisolamentos e identificação no MALDI-TOF. Após a identificação da estirpe valorizada, realiza-se um antibiograma.

#### 6.5. Identificação automatizada - Vitek®MS

O laboratório de microbiologia está equipado com um sistema automatizado, Vitek®MS da BIOMÉRIEUX, que utiliza a tecnologia MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) para identificação microbiana a partir de colónias isoladas valorizadas, ao nível do género, espécie, subespécie ou estirpe, consoante os espectros de referência disponíveis nas bases de dados (Singhal, Kumar, Kanaujia, & Viridi, 2015).

A amostra para análise é envolvida por uma matriz e deixa-se a secar para que a matriz e a amostra cristalizem. Num ambiente de alto vácuo, é aplicado um feixe de laser que ionizada a amostra. Os iões protonados são acelerados a um potencial fixo e separados consoante a relação massa/carga num tubo de voo em vácuo, onde é posteriormente medido o tempo de voo. O perfil proteico do microrganismo desconhecido é comparado com perfis de microrganismos conhecidos contidos numa base de dados, tendo em conta um determinado valor de confiança. A identificação ao nível da espécie consiste

principalmente na deteção de proteínas ribossomais e algumas proteínas de manutenção (Singhal et al., 2015; Tille, 2017).

#### 6.6. Antibiograma

O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) ou antibiograma é um perfil das sensibilidades e resistências de um microrganismo específico sujeito a uma bateria de antibióticos. Os antibiogramas têm um papel fundamental na orientação clínica da escolha do melhor tratamento antibiótico, de acordo com o espectro de sensibilidade do microrganismo. Além disso, permitem detetar e monitorizar as tendências na resistência aos antibióticos, que é uma grande ameaça para a Saúde Pública. A apresentação dos resultados de TSA aos clínicos deve ser limitada e com utilidade clínica de modo a preservar antibióticos de últimas gerações (Minnesota Department of Health, 2018).

O antibiograma só é realizado nas amostras colhidas corretamente e quando a bactéria isolada tem significado clínico (Fonseca et al., 2004).

A partir de uma colónia isolada faz-se suspensão numa solução salina até se obter uma turvação correspondente a 0,50-0,63 na escala de McFarland. Como controlo da suspensão, inocula-se com uma ansa de 10 µL em meio COS e coloca-se a incubar, de modo a garantir que os microrganismos da suspensão para TSA estão viáveis. A suspensão é colocada na cassete VITEK®2 Smart Carrier Station™ (Tabela 10), que contém 64 poços com concentrações específicas de antibiótico. Após colocação no aparelho VITEK®2 (BIOMÉRIEUX), as cassetes são incubadas a uma temperatura controlada e a luz transmitida através de cada poço é medida a cada 15 minutos. Os valores de concentração mínima inibitória (CMI) são gerados pelo software do sistema que faz uma análise algorítmica da cinética de crescimento (Tille, 2017). Os padrões de suscetibilidade e mecanismos de resistência são interpretados pelo software de acordo com as normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Tabela 10: Cartas para teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA).

	Bactérias	Cartas
Gram positivas	<i>Enterococcus</i>	AST-586
	<i>Streptococcus</i>	STO3 e AST-586
	<i>Staphylococcus</i>	AST-648
Gram negativas	Geral	AST-355
	<i>Pseudomonas</i>	AST-373
	<i>Acinetobacter</i>	

Apesar do avanço da automação no laboratório de microbiologia, existem determinados antibiogramas que os equipamentos não realizam, como é o caso do TSA de *Haemophilus influenzae*. Os métodos manuais alternativos são o método de difusão em disco e os Etest. O primeiro método consiste na colocação de discos com uma concentração conhecida de antibiótico num meio de cultura Muller-Hinton previamente inoculado. Após em incubação, as bactérias crescem na superfície do meio sólido, exceto na proximidade do disco, onde a concentração é suficientemente alta para inibir o crescimento. Os diâmetros dos halos de inibição em redor de cada disco são medidos em milímetros e estão relacionados com o CMI. O método de Etest assemelha-se ao método de difusão em disco, mas os discos são substituídos por tiras que contêm um gradiente de concentração de antibiótico e têm uma escala numérica que auxilia a interpretação da CMI (Tille, 2017).

Os *breakpoints* do tamanho da zona inibitória e de CMI que definem as categorias sensível com dose padrão, sensível com aumento da exposição e resistente para cada antibiótico e determinado microrganismo são definidos e atualizados anualmente pela EUCAST (EUCAST, 2019). As regras de EUCAST são baseadas em *breakpoints* clínicos atuais e no conhecimento dos mecanismos de resistência (Leclercq et al., 2013).

## 7. Bioquímica

As análises bioquímicas avaliam as funções fisiológicas do ser humano e estão organizadas por órgãos e sistemas, nomeadamente, função renal, hepática, gástrica, pancreática e intestinal, estudo dos lípidos, hidratos de carbono, proteínas plasmáticas, metabolismo do ferro, entre outras funções e patologias.

No laboratório *core* da SYNLAB, existem duas cadeias constituídas por Atellica® CH Analyzer e Atellica® IM Analyzer que permitem o seguimento e processamento de modo otimizado e sequencial.

É a área mais automatizada no laboratório, mas a função humana continua a ser fundamental para garantir que as calibrações e os controlos cumprem o controlo da qualidade diário.

As amostras da bioquímica são soro obtido após a coagulação do sangue com gel que serve de barreira física entre soro e o coágulo.

### 7.1. Avaliação da função renal

A normal função renal implica a filtração do sangue, regulação da concentração hidro-eletrolítica, excreção de produtos finais do metabolismo e produção de eritropoietina, 1,25-dihidroxitamina D e renina. A avaliação da função renal é importante no diagnóstico e prognóstico de doença renal e na monitorização da resposta à terapêutica (Gounden, Bhatt, & Jialal, 2021).

Os biomarcadores renais disponíveis no laboratório da SYNLAB são a creatinina, ácido úrico e microalbuminúria.

Na maioria das doenças renais, a função renal é afetada pela diminuição do número de nefrónios funcionais e não ao comprometimento da função de cada nefrónio. A avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG) fornece indicadores úteis na avaliação da gravidade e progressão do dano renal (Rifai, Horvath, & Wittwer, 2018).

#### 7.1.1. Creatinina

A creatinina é o subproduto da degradação de fosfato de creatina no músculo e é produzida a uma taxa constante pelo corpo, dependente da massa muscular. A maior parte

da creatinina sérica é eliminado pelo rim. O aumento da concentração de creatinina no sangue deve-se à diminuição da capacidade de eliminação pelos rins (Gounden et al., 2021). Os níveis elevados de creatinina também podem ocorrer na paralisia da distrofia muscular, anemia, leucemia e hipertiroidismo. A diminuição da concentração pode ser observada em glomerulonefrite, insuficiência cardíaca congestiva, necrose tubular aguda, choque, doença renal policística e desidratação (Gowda et al., 2010).

A determinação quantitativa da creatinina no soro e na urina é utilizada no diagnóstico e monitorização de doenças renais e monitorização dos doentes em diálise renal.

O ensaio baseia-se na reação de ácido pícrico com creatinina em meio alcalino, que tem em conta o princípio de Jaffe. Desta reação é produzido um complexo creatinina picrato avermelhado (Fig. 9). A concentração de creatinina é diretamente proporcional à velocidade de formação do complexo, que é medida a 505/571 nm (Siemens Healthineers, 2019f).

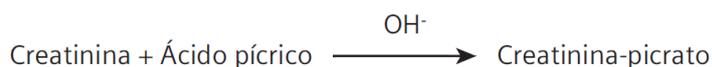


Figura 9: Equação da reação de medição de creatinina.

### 7.1.2. Ácido úrico

O ácido úrico é um composto nitrogenado sintetizado no fígado como produto final do metabolismo de proteínas e do ciclo da ureia. Aproximadamente 85% do ácido úrico é eliminado pelos rins e o restante é excretado pelo trato gastrointestinal. A concentração de ácido úrico sérico aumenta devido à diminuição da TFG nas situações de doença renal aguda ou crónica e insuficiência renal. A hiperuricemia pode ter origem em causas não renais, tais como sangramento do trato gastrointestinal superior, desidratação, estados catabólicos e dietas ricas em proteína. A diminuição de ácido úrico pode estar associada à fome, dieta pobre em proteínas e doença hepática grave. A creatinina sérica é mais precisa na avaliação da função renal, no entanto, o ácido úrico é um marcador que aumenta mais precocemente na doença renal (Gounden et al., 2021).

O ácido úrico pode ser utilizado no diagnóstico de insuficiência renal, gota e eclâmpsia.

O método da determinação quantitativa consiste na reação enzimática de Fossati que utiliza uricase com um ponto final idêntico a Trinder (Fig. 10). O ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio. A partir do peróxido de hidrogénio forma-se um composto colorido, consoante o efeito catalítico da peroxidase. A quantidade de ácido úrico é diretamente proporcional à quantidade de composto produzido. A absorvância do composto é medida como uma reação de ponto final a 545/694 nm (Siemens Healthineers, 2019a).

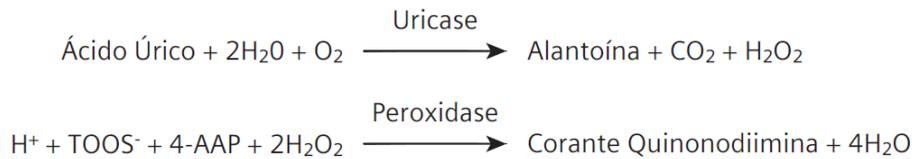


Figura 10: Equação da reação da medição de ácido úrico.

### 7.1.3. Microalbuminúria

A microalbuminúria representa a albumina excretada na urina em quantidades superiores a 30 mg/dia. O aumento da quantidade de albumina na urina representa um elevado risco de danos na capacidade de filtração glomerular nos rins. Para além do diagnóstico de doença renal, a determinação da albumina na urina é importante em pacientes com diabetes *mellitus* a fim de avaliar o risco de evolução para nefropatia.

A microalbuminúria pode também surgir em casos de hipertensão, em algumas anomalias de lípidos e em diversos distúrbios imunológicos, bem como noutras condições tal como a prática vigorosa de exercício físico, desidratação, sangue na urina, infeção do trato urinário e alguns fármacos.

O ensaio baseia-se no trabalho de Fielding e Hellsing e mede níveis muito reduzidos de albumina na urina, através do método de imunoturbidimetria reforçada com PEG. A albumina presente na urina, previamente diluída, reage com antissoro específico que produz um precipitado que é medido turbidimetricamente a 340/596 nm. A concentração de albumina na amostra de urina é determinada através da construção de uma curva padrão a partir das absorvâncias de amostras padrão (Siemens Healthineers, 2019n).

## 7.2. Ionograma

O ionograma é uma análise onde se mede os níveis de eletrólitos. A prescrição do ionograma inclui a determinação laboratorial das concentrações séricas dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ), que fornece informações importantes sobre o equilíbrio osmótico e ácido-base do organismo (Sousa, Sousa, Vaz, & Abecasis, 2021).

O sódio é catião extracelular principal e tem papel fundamental na manutenção da hemóstase através da manutenção da pressão osmótica e da distribuição de fluídos nos vasos sanguíneos. O potássio é o principal catião intracelular, com papel crucial na atividade celular dos sistemas neuronais e musculares. O cloro é o principal anião extracelular e contribuí no equilíbrio da distribuição de fluído extracelular (Sousa et al., 2021).

As alterações dos eletrólitos séricos podem ter origem em condições muito diversas e podem comprometer a hemóstase, que se pode manifestar com episódios que colocam a vida em risco. Desequilíbrio nos níveis de potássio podem resultar em paragens ou arritmias cardíacas e no caso de alteração na concentração de sódio há o risco de edema cerebral (Sousa et al., 2021). As medições de cloro são utilizadas no diagnóstico e monitorização de distúrbios metabólicos e de eletrólitos, tais como fibrose cística e cetoacidose diabética. As alterações nos níveis de sódio podem ocorrer em aldosteronismo, diabetes *insipidus*, hipertensão de causa suprarrenal, doença de Addison, desidratação e secreção inadequada de hormonas antidiuréticas.

A medição dos eletrólitos é obtida pela utilização de tecnologia de multisensor integrado (IMT) V-LYTE® indireta. Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  presentes na amostra diluída interagem com a superfície do eletrodo específico para cada eletrólito até estabelecer um equilíbrio. Esta interação gere um potencial elétrico que é diretamente proporcional ao logaritmo da atividade do analito na amostra. A concentração dos íons é obtida através da equação de Nernst, onde estabelece comparação entre o potencial elétrico gerado na amostra e o potencial gerado numa solução padrão aquando da calibração do ensaio (Siemens Healthineers, 2019o).

### 7.3. Avaliação da função hepática

O fígado é um órgão responsável diversas funções, que incluem síntese de proteínas, produção de enzimas digestivas, desintoxicação de vários metabolitos e contribui para o metabolismo, a regulação de GV e a síntese e armazenamento de glicose (Lala, Goyal, Bansal, & Minter, 2021).

A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são os principais marcadores de avaliação de lesão hepatocelular, enquanto a fosfatase alcalina e a gama-glutamil transferase (GGT) são elevados em situações de lesão colestática. A função excretora pode ser avaliada pela medição de bilirrubina e a função metabólica por testes de coagulação (abordado em Hematologia) e albumina (Kasarala & Tillmann, 2016).

#### 7.3.1. Aminotransaminases – Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

As aminotransaminases incluem alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e estão envolvidas na transferência dos grupos amina do aspartato e da alanina para o ácido cetoglutárico. O aumento dos níveis séricos de transaminases deve-se à lesão dos hepatócitos que resulta na alteração da permeabilidade da membrana celular com vazamento excessivo de transaminases.

A ALT é uma enzima citosólica encontrada em altas concentrações no fígado. A ALT apesar de ser mais específica do fígado, pode também apresentar concentrações elevadas no miocárdio (Kasarala & Tillmann, 2016).

A determinação de ALT auxilia no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas e também cardíacas e consiste num método cinético enzimático composto por duas reações (de ensaio e a indicadora) (Fig. 11). A absorvância de NADH reduzido é medida a 340/410 nm e a velocidade de redução da absorvância é proporcional à atividade de ALT (Siemens Healthineers, 2019b).

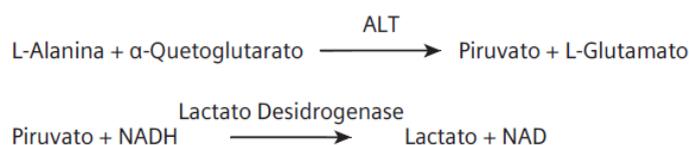


Figura 11: Equação da reação da medição de ALT.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) está presente em isoenzimas citosólicas e mitocondriais e está presente no fígado, músculo cardíaco e esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos. O aumento de AST sérico pode ocorrer devido a causas não hepáticas. Este marcador é menos específico para a avaliação hepática e deve ser avaliado juntamente com a medição de ALT (Lala et al., 2021).

A medição da atividade da AST consiste num método cinético enzimático constituído pela reação de ensaio (reação da AST com formação do oxalacetato) e a reação indicadora (reação da desidrogenase) (Fig. 12) (Burtis & Bruns, 2016). A absorvância de NADH reduzido é medido a 340/410 nm e a atividade da AST é proporcional à velocidade de redução da absorvância (Siemens Healthineers, 2017).



Figura 12: Equação da reação de medição de AST.

### 7.3.3. Gama-glutamil transferase (GGT)

A gama-glutamil transferase (GGT) é uma glicoproteína que está presente nas membranas celulares e tem como função catalisar a transferência de um grupo gama-glutamil de péptidos para outros aminoácidos. Localiza-se em vários órgãos do corpo, nomeadamente, rim, pâncreas, fígado, intestino, próstata, testículos, baço, coração e cérebro (Lala et al., 2021).

A determinação quantitativa da GGT é útil no diagnóstico da doença hepatobiliar e na avaliação de doentes com problemas de alcoolismo. O ensaio consiste numa reação do substrato sintético (L- $\gamma$ -glutamil-3-caboxi-4-nitroanilida) com a glicilglicina que atua como recetor de resíduo de  $\gamma$ -glutamil e liberta-se 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB). Como a GGT é o catalisador da reação, a sua medição corresponde à velocidade de formação do produto de reação, medida fotometricamente a 410/478 nm como um ensaio cinético de ordem zero (Fig. 13) (Siemens Healthineers, 2019j).

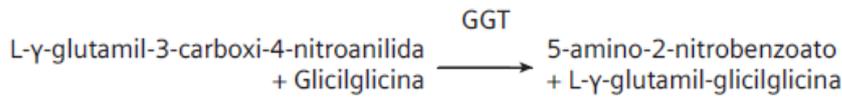


Figura 13: Equação da reação de medição de GGT.

#### 7.3.4. Albumina

A albumina é a proteína circulante mais abundante no plasma e é sintetizada exclusivamente nos hepatócitos. A maior parte da albumina é excretada para a corrente sanguínea e tem função como modulador da pressão oncótica plasmática e transportador de diversos compostos (Moman, Gupta, & Varacallo, 2022).

O prolongado período de semi-vida da albumina dificulta a interpretação no contexto de lesão hepática aguda. Na doença hepática crónica, a albumina é o primeiro marcador da função hepática a diminuir no decorrer da cirrose hepática, precocemente ao aumento da bilirrubina ou do tempo de protrombina. O diagnóstico diferencial para hipoalbuminemia inclui cirrose, desnutrição calórica-proteica, enteropatia perdedora de proteínas, síndrome nefrótica e infeção crónica (Kasarala & Tillmann, 2016).

A medição da albumina tem utilidade no diagnóstico e monitorização de disfunções hepáticas, assim como renais. A albumina da amostra liga-se quantitativamente ao BCG com pH 4,2, que resulta num complexo de BCG-albumina medido como reação de ponto final a 596/694 nm (Fig. 14) (Siemens Healthineers, 2018).

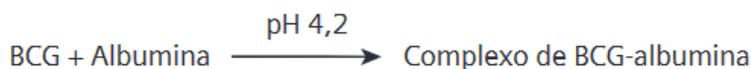


Figura 14: Equação da reação de medição da albumina.

#### 7.3.5. Bilirrubina

A bilirrubina é um composto do heme resultante da degradação da hemoglobina, que em determinadas concentrações pode ser tóxico para o organismo. A bilirrubina não conjugada é insolúvel em água e nos hepatócitos é conjugada com albumina para adquirir solubilidade. A bilirrubina conjugada é secretada ativamente na bile canalicular e é drenada para o intestino delgado para eliminação nas fezes. Em condições de obstrução

biliar prolongada e colestase intra-hepática, a excreção de bilirrubina é prejudicada e fica acumulada no sangue e na pele (Kalakonda, Jenkins, & John, 2021).

A determinação da bilirrubina direta ou conjugada é útil no rastreamento de disfunções hepáticas ou no diagnóstico de icterícia. A sua quantificação tem em base o método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente oxidante (Fig. 15). A reação de oxidação induz uma redução da densidade ótica da cor amarela, específica da bilirrubina. A concentração de bilirrubina direta na amostra é tanto maior, quanto mais acentuada for a redução na densidade ótica a 451/545 nm (Siemens Healthineers, 2020a).

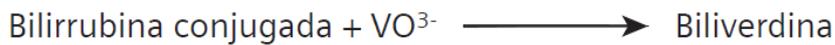


Figura 15: Equação da reação da medição da bilirrubina conjugada.

A bilirrubina total é a conjugação da bilirrubina conjugada e não conjugada, que resulta da destruição normal e anormal dos eritrócitos. A quantificação de bilirrubina total auxilia no diagnóstico e monitorização de doenças hepatobiliares, hemolíticas, hematológicas e metabólicas. Nos recém-nascidos, o aumento de bilirrubina total apresenta um fator de risco de encefalopatia por bilirrubina (kernicterus).

O procedimento analítico é baseado num método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente oxidante, de acordo com a figura 16. A um pH 2,9, aproximadamente, a bilirrubina conjugada e não conjugadas oxidam na presença de vanadato e do detergente, que resulta na redução na densidade ótica da cor amarela. A concentração de bilirrubina total na amostra é diretamente proporcional à redução na densidade ótica a 451/545 nm (Siemens Healthineers, 2020b).



Figura 16: Equação da reação de medição da bilirrubina.

### 7.3.6. Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é uma isoenzima localizada na camada externa das membranas celulares e catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato orgânico no espaço extracelular. A ALP está localizada em diferentes tecidos do corpo e desempenham

diferentes funções consoante a sua localização. No fígado, a ALP está presente no citosol e na membrana canalicular dos hepatócitos. A maior parte da ALP sérica é libertada do fígado e dos ossos e em pequenas quantidades do intestino.

O principal valor clínico da ALP sérica reside no diagnóstico de doença hepática colestática. Concentrações aumentadas de ALP sérica são inespecíficas e, por isso, deve-se ter em consideração a GGT para avaliar se a fonte é hepática ou não hepática (Lowe, Sanvictores, & John, 2021).

O ensaio da ALP consiste num procedimento de referência para medição da atividade catalítica da fosfatase alcalina a 37°C. A ALP catalisa a transfosforilação do p-nitrofenilfosfato (p-NPP) para p-nitrofenol (p-NP) na presença do tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). A adição de iões magnésio e zinco melhoram a reação (Fig. 17). A variação na absorvância a 410 nm é diretamente proporcional à atividade de ALP. A variação é medida utilizando uma técnica de velocidade bicromática (410/478 nm) (Siemens Healthineers, 2019i).

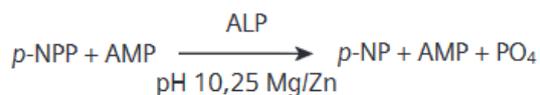


Figura 17: Equação da reação de medição da fosfatase alcalina.

#### 7.4. Metabolismo lipídico

Os lípidos são compostos localizados por todo o corpo e desempenham funções fundamentais, como fonte e armazenamento de energia, podem ser hormonas ou precursores hormonais, são componentes funcionais e estruturais das membranas celulares e servem de isolamento para permitir condução nervosa ou evitar perdas de calor. O aumento da concentração plasmática de colesterol de determinadas frações de lipoproteínas podem resultar na deposição e retenção de colesterol nas paredes vasculares, com aumento do risco de aterosclerose (Rifai et al., 2018).

##### 7.4.1. Colesterol total

O colesterol é uma molécula lipofílica que desempenha funções que contribuem para o funcionamento normal das células. O colesterol como componente estrutural das membranas celulares modula a sua fluidez, é uma molécula precursora na síntese de

vitamina D e hormonas esteróides e sexuais e é também constituinte do sal biliar responsável por facilitar a absorção de vitaminas lipossolúveis. Dada a natureza hidrofóbica do colesterol, é transportado no sangue por lipoproteínas (Huff, Boyd, & Jialal, 2021).

Níveis elevados de colesterol estão associados a distúrbios do metabolismo de lípidos e lipoproteínas, enquanto a diminuição da concentração reduz o risco de doença cardíaca coronária.

O ensaio utilizado na determinação do colesterol consiste num método enzimático que utiliza a conversão colesterol-esterase e colesterol-oxidase seguida de um ponto final Trinder (Fig. 18) (Siemens Healthineers, 2020c).

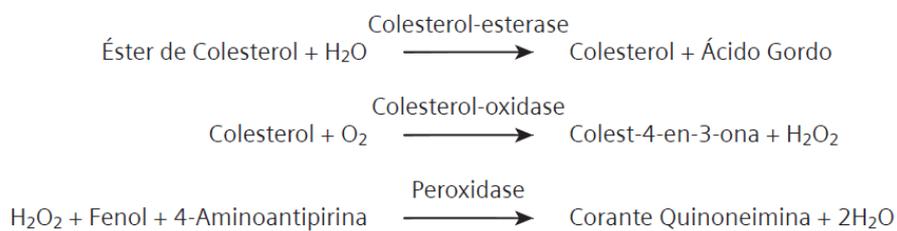


Figura 18: Equação da reação de medição do colesterol.

#### 7.4.2. Lipoproteína HDL

As lipoproteínas são complexos macromoleculares responsáveis pelo transporte dos lípidos por terem uma natureza hidrofóbica. No núcleo da estrutura localizam-se triglicéridos e ésteres de colesterol e à superfície forma-se uma monocamada constituída por apolipoproteínas, fosfolípidos e colesterol livre (Rifai et al., 2018).

A HDL tem propriedades antiterogénicas, incluindo efluxo de colesterol dos macrófagos da parede celular, transporte e remoção subsequentes de colesterol através do sistema hepatobiliar, propriedades antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios e função endotelial (Hageman & Sharma, 2021).

A determinação de HDL é aplicada ao diagnóstico e monitorização de distúrbios lipídicos como diabetes *mellitus*, arterosclerose, doenças renais e hepáticas e é útil na avaliação do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O ensaio é subdividido em 2 etapas. Na primeira fase, ocorre a eliminação de quilomícras, colesterol VLDL e colesterol LDL por efeito da colesterol-esterase e colesterol-oxidase. O

peróxido, produto da segunda reação, é eliminado pela catalase (Fig. 19). Na segunda etapa, a catalase é inibida por azida sódica (Fig. 20). A intensidade do corante quinoneimina produzido na reação Trinder, medida a 596/694 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol (Siemens Healthineers, 2020d).

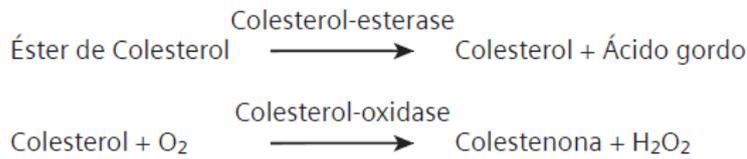
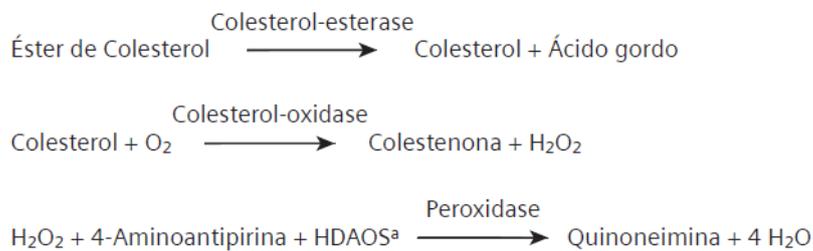


Figura 19: Equação da reação de medição de HDL – Fase 1. Libertação e eliminação de partículas não HDL.



<sup>a</sup> HDAOS = N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina

Figura 20: Equação da reação de medição de HDL – Fase 2. Libertação das partículas HDL pelo detergente adicionado e HDL é medido por uma reação de Trinder.

#### 7.4.3. Lipoproteína LDL

A LDL é uma lipoproteína responsável pelo transporte de colesterol para onde é necessário a reparação celular. O aumento dos níveis de LDL é um dos principais fatores de risco que contribui para a formação de placas ateroscleróticas e, conseqüentemente, aumenta o risco de doença cardiovascular (Pirahanchi, Sinawe, & Dimri, 2021).

O ensaio que mede o colesterol LDL consiste em 2 passos de reação distintos. Numa primeira fase, o colesterol é eliminado à exceção da lipoproteína de baixa densidade, por colesterol-esterase e colesterol-oxidase. O peróxido produzido pela oxidase é eliminado pela catalase. Após a libertação do colesterol LDL por um detergente, é realizada a sua medição específica. A catalase obtida na primeira reação é inibida por azida de sódio. A concentração de colesterol é diretamente proporcional à intensidade de quinoneimina produzida na reação Trinder, medida a 596/694 nm (Siemens Healthineers, 2019e).

#### 7.4.4. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são ésteres constituídos por três moléculas de ácidos gordos e um resíduo de glicerol e são uma forma de armazenamento de energia (Burtis & Bruns, 2016).

A utilidade clínica na determinação dos triglicerídeos aplica-se no diagnóstico e monitorização de pacientes com diabetes *mellitus*, nefrose, obstrução hepática, entre outras doenças que afetam o metabolismo lipídico ou associadas a distúrbios endócrino.

O método de medição dos triglicerídeos baseia-se na reação enzimática trifásica Fossati com um ponto final Trinder (Fig. 21). O método de reagente único quantifica os triglicerídeos totais, incluindo mono e diglicéridos e frações de glicerol livre. A absorvância do composto obtido é medida como uma reação de ponto final a 505/694 nm (Siemens Healthineers, 2021c).

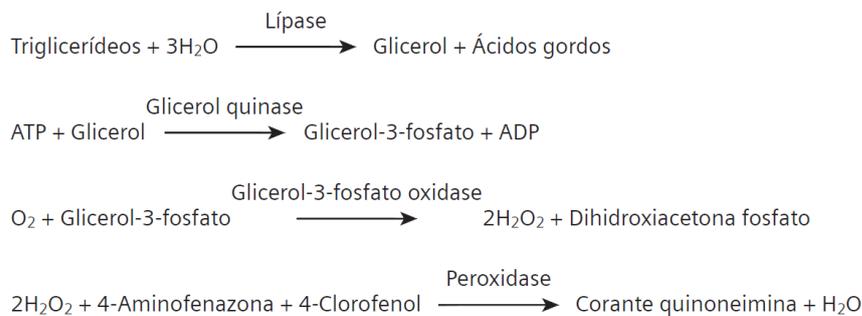


Figura 21: Equação da reação de medição dos triglicerídeos.

#### 7.5. Função cardíaca

##### 7.5.1. Lactato desidrogenase (LD)

O lactato desidrogenase é uma enzima que catalisa reversivelmente a oxidação de L-lactato a piruvato, onde  $\text{NAD}^+$  é aceitador de hidrogénio. Este biomarcador apresenta distribuição ampla no organismo e o aumento de concentração de LD sérica pode ocorrer devido a diversas condições clínicas, como enfarte do miocárdio, hepatite, hemólise e doenças pulmonares ou do músculo esquelético (Burtis & Bruns, 2016).

Este biomarcador é útil no diagnóstico do enfarte do miocárdio e enfarte pulmonar. A medição da concentração de LD é proporcional à velocidade de produção de NADH, na reação onde LD é a enzima catalisador (Fig. 22). A quantidade de NADH

obtida é medida através do aumento na absorvância a 340/410 nm (Siemens Healthineers, 2019l).

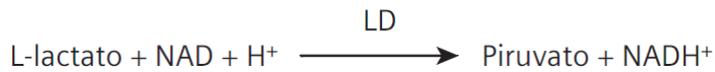


Figura 22: Equação da reação de medição de lactato desidrogenase (LD).

### 7.5.2. Troponina

As troponinas são proteínas específicas do músculo cardíaco e a sua determinação analítica auxilia no diagnóstico de lesão cardíaca. O complexo constituído pelas três subunidades de troponina, nomeadamente troponina T (cTnT), troponina I (cTnI) e troponina C (cTnC), regula a interação da actina e miosina na contração cardíaca. As cTnI e cTnT são os biomarcadores cardíacos mais específicos de lesão cardíaca, enquanto cTnC não é uma troponina específica para o coração (Burtis & Bruns, 2016).

A medição de cTnI consiste num imunoensaio em sanduíche de 3 locais, utilizando tecnologia quimioluminométrica direta. O reagente na fase sólida é constituído por partículas magnéticas de látex conjugadas com estreptavidina com 2 anticorpos monoclonais biotinizados. A quantidade de troponina I na amostra é diretamente proporcional à quantidade de unidades de luz relativa (RLU) (Siemens Healthineers, 2019q).

### 7.6. Função pancreática

O pâncreas é uma glândula composta por tecido endócrino e exócrino. A porção endócrina é organizada em ilhéus de Langerhans, constituída por diferentes tipos de células endócrinas responsáveis pela secreção de hormonas, tais como, insulina, glucagon, somostatina, grelina e polipéptido pancreático (Sayed & Mukherjee, 2021).

A lípase e a amilase são enzimas secretadas pelo pâncreas e têm principal importância no diagnóstico de pancreatite aguda.

### 7.6.1. Lipase

A lipase é uma enzima presente nas secreções pancreáticas responsável pela digestão dos lípidos, por catalisar a quebra dos triglicéridos em ácidos gordos livres e glicerol. Concentrações aumentadas de lipase sérica podem ser indicativo de pancreatite (Pirahanchi & Sharma, 2021). Na pancreatite aguda, os níveis de lipase sérica tende a aumentar ao fim de 4 a 8 horas, pico às 24 horas e decresce ao após 8 a 14 dias. Ao contrário da amilase sérica, a lipase sérica mantém concentrações elevadas durante um período de tempo mais prolongado (Rompianesi et al., 2017).

As medições de lipase auxiliam no diagnóstico e monitorização de doenças pancreáticas, como pancreatite aguda e obstrução do ducto pancreático.

O ensaio laboratorial consiste na medição da atividade da lipase no soro pela reação enzimática da lipase (Fig. 23), com produção de metilresorufina que é medida a 571/694 nm. A atividade da lipase é diretamente proporcional à produção de metilresorufina (Siemens Healthineers, 2019m).

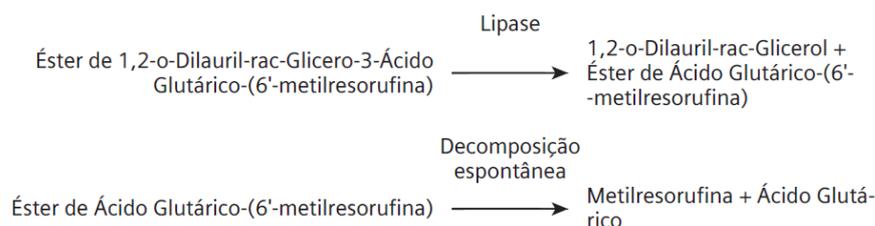


Figura 23: Equação da reação de medição da lipase.

### 7.6.2. Amilase

A amilase é uma enzima digestiva secretada principalmente pelo pâncreas e glândulas salivares e é responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas nas moléculas de amido, resultando na conversão dos hidratos de carbono complexos em compostos mais simples. A amilase também pode estar presente noutros tecidos com quantidades menores, o que faz com que a hiperamilasemia pode ter origem noutras patologias para além de doenças pancreáticas e salivares, como é o caso de doenças gastrointestinais, malignidade e doenças ginecológicas (Akinfemiwa & Muniraj, 2021).

A quantificação da amilase pancreática tem utilidade no diagnóstico e monitorização dos distúrbios pancreáticos.

A atividade da amilase pancreática é medida através da reação enzimática, com as isoformas não pancreáticas bloqueadas por anticorpos. O soro é incubado com dois anticorpos monoclonais contra amilase salivar, sem afetar a atividade da amilase pancreática. Na primeira reação a amilase pancreática divide o substrato etilideno-G7-pNP em oligossacarídeos e pNP-G2, pNP-G3 e pNP-G4. Glucosidase é adicionada e é a enzima indicadora para libertar p-nitrofenol (p-NP). A glicose terminal é bloqueada, impedindo a clivagem pela glucosidase. A absorvância de p-NP livre é medida 410/694 nm e a sua produção é diretamente proporcional à atividade da lípase pancreática presente no soro (Fig. 24) (Siemens Healthineers, 2019c).

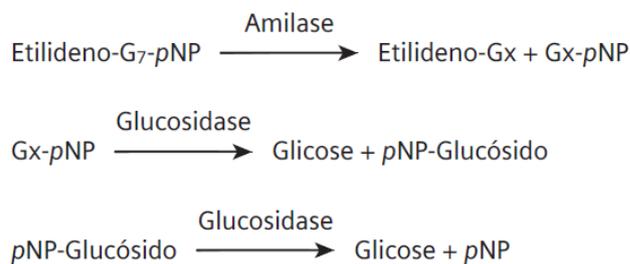


Figura 24: Equação da reação de medição da amilase.

## 7.7. Função tiroideia

A tiroide é uma glândula endócrina com função reguladora da taxa metabólica basal, estimula o crescimento somático e psíquico e tem um papel fundamental no metabolismo do cálcio (Khan & Farhana, 2021).

A função tiroideia é avaliada a partir do doseamento de TSH e FT4. Nas situações de maior dificuldade no diagnóstico ou maior gravidade clínica, a medição adicional de T3 é recomendada (Norma DGS 039/2011) (Direção Geral de Saude, 2012).

### 7.7.1. Hormona estimulante da tiroide (TSH)

A hormona estimulante da tiroide (TSH) é uma glicoproteína sintetizada e segregada pela pituitária anterior numa resposta a um mecanismo de feedback negativo que envolve as concentrações de FT3 (T3 livre) e FT4 (T4 livre). Além disso, a hormona de libertação de tirotropina (TRH) estimula diretamente a produção de TSH. A TSH liga-se aos recetores das células-alvo a fim de estimular a reprodução e hipertrofia de células e de estimular a glândula da tiroide para sintetizar e segregar T3 e T4.

A medição dos níveis de TSH em circulação é relevante na avaliação da função tireoideia. Tem utilidade especialmente no diagnóstico diferencial do hipotireoidismo primário (tireoide), secundário (pituitária) e terciário (hipotálamo). No hipotireoidismo primário, os níveis de TSH são significativamente elevados, enquanto no hipotireoidismo secundário e terciário, os níveis estão reduzidos.

O ensaio de quantificação da TSH é um ensaio de terceira geração que utiliza o anticorpo anti-TSH monoclonal de rato marcado com FITC, o anticorpo anti-FITC monoclonal ligado por covalência a partículas paramagnéticas, um rastreador constituído por éster de acridina e um anticorpo anti-TSH monoclonal de rato conjugado com albumina de soro bovino (BSA) para a deteção quimioluminométrica. A quantidade de TSH na amostra é diretamente proporcional às quantidades de unidades de luz relativa (RLU) detetadas pelo sistema (Siemens Healthineers, 2021a).

#### 7.7.2. Tiroxina livre (FT4)

A tiroxina (T4) é uma hormona sintetizada e segregada pela glândula da tireoide e desempenha um papel importante na regulação do metabolismo. A TSH regula a segregação de T4 para a circulação por um mecanismo de feedback negativo. Em circulação, 99,95% da T4 está inversamente ligada ao transporte de proteínas, principalmente à globulina ligante de tiroxina (TBG), e a restante T4 não ligada tem circulação livre. A fração não ligada FT4 é metabolicamente ativa e precursora da triiodotironina (T3).

Os níveis de FT4 estão correlacionados com a secreção e metabolismo da T4. No hipotireoidismo e no hipertireoidismo, os níveis de FT4 igualam as alterações nos níveis da T4 total. A medição de FT4 é útil quando ocorrem níveis alterados da T4 total devido às alterações nas proteínas ligadas a T4, especialmente a TBG. Nos indivíduos com gravidez normal ou terapia com esteroides podem ocorrer alterações nos níveis de TBG, no entanto, os níveis de FT4 permanecem inalterados e os níveis de T4 total igualam as alterações na TBG.

O ensaio para quantificação de FT4 consiste num imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta. A FT4 na amostra compete com a T4 marcada com éster de acridina no reagente numa quantidade limitada de anticorpo anti-

T4 policlonal biotilado de coelho. A anti-T4 marcada com biotina está ligada à avidina que, por sua vez, está ligada por covalência às partículas paramagnéticas na fase sólida. A quantidade de FT4 na amostra é diretamente proporcional à quantidade de RLU detetadas pelo sistema (Siemens Healthineers, 2020m).

#### 7.7.3. Tiroxina total (T4)

Nos indivíduos saudáveis, os níveis de TBG não afetam na interpretação nos níveis de T4. No entanto, na gravidez, estrogénios excessivos, androgénios, esteroides anabolizantes e glicocorticoides são conhecidos por alterar os níveis de TBG (proteína principal de transporte de T4) e podem originar valores falsos da tiroide em testes de funcionamento da tiroide. Os níveis alterados de T4 nestas situações podem não refletir com exatidão o estado da tiroide.

A quantificação de T4 é efetuada por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A T4 na amostra compete com a T4 ligada por covalência a partículas paramagnéticas na fase sólida por uma quantidade limitada de anticorpo anti-T4 monoclonal de rato marcado com éster de acridina. A quantidade de T4 na amostra é inversamente proporcional à quantidade de RLU detetada pelo sistema (Siemens Healthineers, 2020n).

#### 7.7.4 Triiodotironina livre (FT3)

A triiodotironina é uma hormona sintetizada e segregada pela glândula da tiroide e formada pela deiodinação periférica de tiroxina (T4). A triiodotironina livre (FT3) corresponde à fração em circulação livre, por não se ligar ao transporte de proteínas. A T3 livre é metabolicamente ativa.

Os níveis de FT3 estão correlacionados com a secreção e o metabolismo de T3. No hipotireoidismo e no hipertireoidismo, os níveis de FT3 igualam as alterações nos níveis de T3 total. No entanto, a medição de FT3 livre é útil quando ocorrem alterações nos níveis de T3 total devido às alterações nas proteínas de transporte.

A medição de FT3 é feita através de um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A FT3 na amostra compete com um análogo T3 ligado covalentemente às partículas paramagnéticas na fase sólida para uma quantidade

limitada de anticorpo anti-T3 monoclonal de rato marcado com éster de acridina. A quantidade de FT3 na amostra é inversamente proporcional à quantidade de RLU detetada pelo sistema (Siemens Healthineers, 2020o).

#### 7.7.5. Triiodotironina total (T3)

Nos indivíduos saudáveis, as concentrações de TBG permanecem relativamente constantes em indivíduos saudáveis, mas noutras situações, como anteriormente mencionadas, os níveis de T3 podem não refletir de forma precisa o estado da tiroide.

Para fins de diagnóstico, a concentração de T3 é mais sensível a certas condições da tiroide do que T4. Enquanto os níveis de T4 são um indicador sensível (e superior) de hipotiroidismo, os níveis de T3 caracterizam o hipertiroidismo. Além disso, a concentração de T3 no soro altera mais rápida e significativamente do que a concentração de T4, fazendo com que o nível de T3 seja um excelente indicador da capacidade de resposta da tiroide aos testes de estimulação e supressão. Em condições de estimulação forte da tiroide, o nível de T3 fornece uma boa estimativa da reserva tiroidea.

O ensaio da T3 consiste num imunoensaio competitivo com recorrência à tecnologia quimioluminescente direta. A T3 na amostra compete com o análogo de T3, que é ligado por covalência às partículas paramagnéticas na fase sólida para uma quantidade limitada de anticorpos anti-T3 monoclonais de rato marcados com éster de acridina. A quantidade de T3 na amostra é inversamente proporcional à quantidade de RLU detetada pelo sistema (Siemens Healthineers, 2020p).

#### 7.8. Metabolismo dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são macronutrientes com funções vitais para o funcionamento do corpo. Estas moléculas são fonte de energia, ajudam a controlar o metabolismo da glicose e insulina no sangue, participam no metabolismo do colesterol e triglicerídeos e na fermentação. Os carboidratos da dieta são degradados em glicose no trato digestivo, para consumo de energia. A glicose em excesso na corrente sanguínea é armazenado no fígado e no tecido muscular como reserva energética (Holesh, Aslam, & Martin, 2021).

A determinação quantitativa de glicose no soro auxilia no diagnóstico e monitorização de distúrbios do metabolismo de hidratos de carbono, incluindo a diabetes *mellitus*, hipoglicemia neonatal, hipoglicemia idiopática e sobredosagem de insulina.

O ensaio enzimático baseia-se no ensaio de Slein que utiliza enzimas hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase (Fig. 20). A glicose é fosforilada por ATP na presença de hexoquinase, produzindo glicose-6-fosfato e ADP. A glicose-6-fosfato é oxidada na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase, ao mesmo tempo que NAD é oxidado e forma-se NADH. A absorvância de NADH é medida como reação de ponto final a 340/410 nm. A diferença entre a absorvância inicial e final é proporcional à concentração de glicose (Fig. 25) (Siemens Healthineers, 2020e).

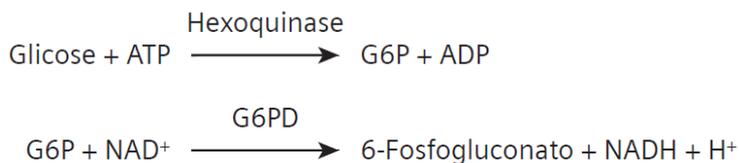


Figura 25: Equação da reação de medição da glicose.

## 7.9. Metabolismo do ferro

O ferro constitui a estrutura da porfirina como átomo central, sendo importante no transporte de oxigénio na hemoglobina e mioglobina, é cofator essencial na função de várias enzimas e, como componente dos citocromos, é responsável pelo transporte de eletrões na cadeia respiratória (Norma n.º 030/2013).

A deficiência em ferro pode ocorrer com ou sem anemia numa fase precoce (Norma n.º 030/2013) (Direção Geral de Saude, 2015).

### 7.9.1. Ferro sérico

O ferro sérico (N: 50-150 µg/dL) equivale à quantidade de ferro unido à transferrina. A utilidade diagnóstica deste parâmetro está condicionada pela variabilidade biológica ao longo do dia e devido a processos infecciosos ou inflamatórios (Norma n.º 030/2013).

A quantificação do ferro sérico serve de apoio ao diagnóstico e monitorização de hemocromatose e anemias por deficiência em ferro (Direção Geral de Saude, 2015).

O ensaio consiste na degradação de ferro sérico da transferrina em condições ácidas, sendo reduzido à forma ferrosa. O ferro ferroso é complexado com ferrozina (indicador sensível de ferro) para produzir um cromóforo colorido, que absorve a 571/658 nm (Fig. 26) (Siemens Healthineers, 2019h).

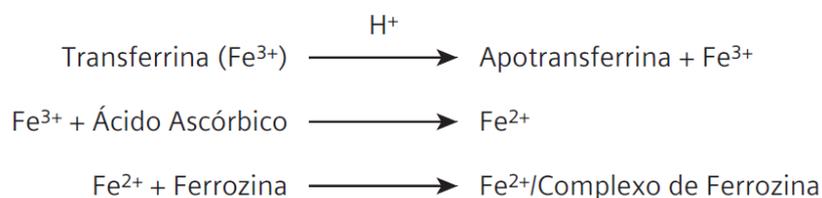


Figura 26: Equação da reação de medição do ferro sérico.

### 7.9.2. Transferrina

A transferrina é a proteína principal responsável por transportar ferro na circulação sanguínea. O doseamento da transferrina tem menor interferência de variabilidade biológica (Norma n.º 030/2013) (Direção Geral de Saude, 2015).

A medição da concentração de transferrina tem uma boa correlação com a medição da capacidade total de fixação do ferro (CTFF) e tem utilidade na avaliação dos níveis globais de ferro. Níveis reduzidos de transferrina estão associados a inflamação aguda, doença hepática crónica e hemocromatose; enquanto níveis aumentados verificam-se na deficiência em ferro, gravidez, hepatite e na utilização de contraceptivos orais.

A medição da transferrina ocorre por um ensaio imunoturbidimétrico reforçado por polietilenoglicol (PEG). O soro é diluído e a transferrina presente reage com um antissoro específico que origina um precipitado, medido de forma turbidimétrica a 430/596 nm. A concentração da transferrina é determinada com recurso à construção de uma curva de calibração a partir da observância de padrões (Siemens Healthineers, 2019p).

### 7.9.3. Capacidade total de fixação do ferro (CTFF)

A capacidade total de fixação ao ferro equivale ao doseamento de ferro num soro onde a ferritina foi previamente saturada *in vitro*. A transferrina e CTFF representam a

mesma função fisiológica, mas com resultados expressos em unidades diferentes (Norma n.º 030/2013) (Direção Geral de Saude, 2015).

A determinação da capacidade total de ligação de ferro ocorre num processo sequencial, monitorizado espectrofotometricamente. A amostra de soro é adicionada a um reagente ácido que contém ferro e um corante fixador de ferro. O ferro fixado é libertado pelo ácido. O tampão neutro adicionado e a variação no pH contribuem para o ferro ligue e sature a transferrina. A redução na absorvância é diretamente proporcional à capacidade de ligação de ferro na amostra (Fig. 27) (Siemens Healthineers, 2019d).

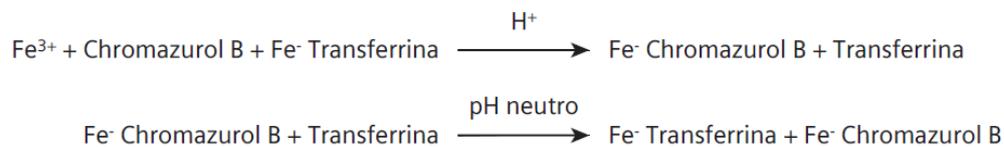


Figura 27: Equação da reação de medição de CTFF.

#### 7.9.4. Ferritina sérica

A ferritina é um composto constituído por moléculas de ferro ligadas a apoferritina, representando as reservas de ferro no organismo. É responsável pela absorção, armazenamento e libertação do ferro e permanece nos tecidos até ser necessário para eritropoiese. Quando necessário, as moléculas de ferro são libertadas da apoferritina e ligam-se à transferrina que transporta o ferro às células eritropoéticas (Siemens Healthineers, 2019g).

A ferritina sérica (N: 30-340 ng/mL) é o parâmetro do metabolismo do ferro com maior utilidade e o melhor para avaliar as reservas de ferro no organismo, sendo que baixas concentrações são sinal de deficiência em ferro. No entanto, valores falsamente normais podem ocorrer em situações de infeção ou inflamação, insuficiência renal, artrite reumatoide e hepatite (Norma n.º 030/2013) (Direção Geral de Saude, 2015).

A ferritina sérica é medida por um imunoensaio do tipo *sandwich* efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos antiferritina. O anticorpo antiferritina policlonal está marcado com éster acridina e o anticorpo antiferritina monoclonal, na fase sólida, está ligado covalentemente a partículas paramagnéticas. A quantidade de ferritina

na amostra é diretamente proporcional à quantidade de unidades de luz relativa (RLU) detetadas pelo sistema (Siemens Healthineers, 2019g).

#### 7.10. Estudo da fertilidade

O estudo da fertilidade consiste na determinação das hormonas responsáveis pela regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

As hormonas FSH, LH, hCG e prolactina são doseadas por um imunoensaio do tipo de sanduíche, que recorre à tecnologia de quimioluminescência direta. Existe uma correlação direta entre a concentração destas hormonas na amostra e a quantidade de RLU detetadas pelo sistema. O ensaio de testosterona e progesterona consiste num imunoensaio competitivo combinado com quimioluminescência direta. A concentração de testosterona ou progesterona presente na amostra é indiretamente proporcional à quantidade de RLU emitido

##### 7.10.1. Hormona folículo-estimulante (FSH)

A hormona folículo-estimulante (FSH) é uma hormona de glicoproteína segregada pela adeno-hipófise em resposta à hormona libertadora de gonodotrofina (GnRH) segregada pelo hipotálamo. A secreção de FSH é regulada por mecanismos de feedback positivo e negativo que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise, os órgãos reprodutores e as hormonas esteroides sexuais e da hipófise. Nas mulheres, a FSH atua sobre os folículos ovarianos com função estimuladora do desenvolvimento do folículo e a da produção de estradiol e outros estrogénios durante a fase folicular do ciclo menstrual e, em sinergia com LH, provoca a ovulação. Nos homens, a FSH estimula a espermatogénese nas células de Sertoli nos túbulos seminíferos dos testículos.

Concentrações anormais de FSH combinados com níveis aumentados ou diminuídos de LH, estrogénios, progesterona e testosterona estão associados a várias patologias. Níveis elevados de FSH verificam-se nas mulheres durante a fase da menopausa ou com hipofunção ovariana primária, enquanto nos homens está associado a hipogonadismo primário. Níveis diminuídos de FSH estão associados a hiperfunção ovariana primária nas mulheres e a hipergonadismo primário nos homens. As mulheres

com níveis normais ou baixos de FSH podem ter síndrome do ovário policístico (Siemens Healthineers, 2020i).

#### 7.10.2. Hormona Luteinizante (LH)

A hormona luteinizante (LH) é uma hormona de glicoproteína segregada pela adeno-hipófise em resposta à hormona libertadora de gonodotrofina (GnRH) segregada pelo hipotálamo. A secreção de LH é regulada por mecanismos de feedback positivo e negativo que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise, os órgãos reprodutores e as hormonas esteroides sexuais e da hipófise. Nas mulheres, a LH estimula a produção de estrogénios nas células teca dos folículos (FSH converte em estradiol na fase folicular), provoca a ovulação ao atuar sinergicamente com FSH no folículo de Graaf durante o pico de meio ciclo e estimula a formação do corpo lúteo após ovulação e secreção de progesterona. Nos homens, a LH estimula a secreção de testosterona nas células de Leydig no tecido intersticial dos testículos.

Concentrações anormais de LH combinados com níveis aumentados ou diminuídos de FSH, estrogénios, progesterona e testosterona estão associados a várias patologias. Níveis elevados de LH estão associados a menopausa, hipofunção ovariana primária e síndrome do ovário policístico na mulher e a hipogonadismo primário no homem. A diminuição de LH verifica-se em casos de hiperfunção ovariana primárias nas mulheres e de hipergonadismo primário nos homens (Siemens Healthineers, 2021b).

#### 7.10.3. Testosterona

A testosterona é uma hormona esteroide controlada pela LH e é o principal androgénio nos homens. A LH libertada pela adeno-hipófise atua diretamente nas células de Leydig para a produção de testosterona. A testosterona estimula a maturação adulta dos órgãos genitais externos e das características sexuais secundárias.

A diminuição de testosterona nos homens pode ocorrer em casos de hipogonadismo hipogonadotrópico, falha testicular, hiperprolactinemia, hipopituitarismo, algumas doenças hepáticas e renais e doenças graves. Nas mulheres, os níveis de testosterona são muito inferiores e o aumento da concentração sérica pode ser

verificado na síndrome policística, hiperplasia adrenal, infertilidade, hirsutismo, amenorreia e obesidade (Siemens Healthineers, 2020l).

#### 7.10.4. Progesterona

A progesterona é uma hormona esteroide responsável pela regulação do aparelho reprodutor feminino durante o ciclo menstrual. A progesterona é produzida pelo corpo lúteo para preparação do endométrio para implante do blastocisto e pela placenta para manutenção da gravidez. O córtex adrenal masculino e feminino e os testículos são fontes menores de progesterona.

No início do ciclo menstrual (fase folicular), os níveis de progesterona são baixos. Após a ovulação, a produção de progesterona pelo corpo lúteo aumenta rapidamente, com um pico de concentração após 4 a 7 dias da ocorrência da ovulação. Estes níveis mantêm-se durante 4 a 6 dias e diminuem posteriormente para os níveis de referência, com indução da menstruação. Durante a gravidez, os níveis de progesterona aumentam constantemente até aos níveis máximos no terceiro trimestre.

A avaliação clínica da progesterona confirma a ovulação e a função lútea normal nas mulheres não grávidas. As mulheres que utilizam contraceptivos orais apresentam níveis de progesterona suprimidos. A produção inadequada de progesterona pelo corpo lúteo pode ser sugestiva de deficiência da fase lútea, que está associada a infertilidade e aborto precoce (Siemens Healthineers, 2020j).

#### 7.10.5. Gonadotropina coriónica humana (hCG)

A gonadotropina coriónica humana (hCG) é uma glicoproteína sintetizada pelas células da placenta e está envolvida na conservação do corpo lúteo durante a gravidez. Ao fim de 1 semana de conceção, a hCG pode ser detetada e os níveis aumentam exponencialmente durante 8 a 10 semanas após o último ciclo menstrual. A concentração de hCG começa a diminuir com o início da produção de esteroides na placenta, cerca de 12 semanas após a conceção. Os níveis de hCG podem também estar aumentados em situações de gravidez ectópica, ameaça de aborto e fim recente da gravidez (Siemens Healthineers, 2020g).

#### 7.10.6. Prolactina

A prolactina é uma hormona polipeptídica de cadeia única segregada pela adeno-hipófise, responsável pelo início e manutenção da lactação nas mulheres e pela regulação da função gonadal nos homens e nas mulheres. Esta hormona é também sintetizada pela placenta e está presente no líquido amniótico. Durante a gravidez e a lactação pós-parto, a prolactina sérica aumenta entre 10 e 20 vezes. O exercício físico, stress e sono podem provocar o aumento temporário da concentração de prolactina.

Níveis de prolactina sérica constantemente elevados, na ausência de lactação durante a gravidez e pós-parto, podem ser indicadores de hiperprolactinemia. As consequências mais frequentes de hiperprolactinemia são galactorreia, amenorreia e infertilidade nas mulheres e impotência e hipogonadismo nos homens. Insuficiência renal, hipotiroidismo e adenomas hipofisários secretores de prolactina são causas comuns de níveis anormais elevados de prolactina (Siemens Healthineers, 2020k).

#### 7.11. Serologia infecciosa

A serologia infecciosa baseia-se na deteção de anticorpos e/ou antigénios para o diagnóstico de doenças infecciosas. No contacto com um antigénio de um agente infeccioso, são desenvolvidos inicialmente anticorpos da classe IgM. Posteriormente ocorre mudança para a produção de anticorpos da classe IgG, que se tornam a classe predominante. A pesquisa de anticorpos IgM pressupõe o diagnóstico de infeções recentes. As IgG têm a capacidade de atravessar a placenta, contrariamente às IgM, permitindo uma imunidade passiva aos recém-nascidos (Valente et al., 1993).

##### 7.11.1. Hepatites virais

As hepatites virais são doenças hepáticas infecciosas que podem evoluir para quadros clínicos mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular (Viana et al., 2017).

No laboratório da SYNLAB, estão disponíveis os testes de rastreio para vírus da hepatite A, B e C. Os marcadores serológicos são determinados por imunoenaios do tipo sanduíche (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg), indireto do tipo sanduíche (anti-HVC),

de captura (anti-VHA IgM) e competitivo (anti-VHA total, anti-HBe), com recurso à tecnologia de quimioluminescência. À exceção do imunoensaio competitivo, a quantidade de marcador serológico na amostra é diretamente proporcional à quantidade de RLU detetadas pelo sistema.

O vírus da hepatite A (VHA) é um vírus de RNA, de cadeia simples, da família Picornaviridae. A transmissão do VHA ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de alimentos contaminados ou devido a fracas condições sanitárias. O período de incubação varia entre 15 e 40 dias (média 30 dias). A infeção crónica não se verifica nas infeções por VHA. O anticorpo para o VHA é detetável após o aparecimento dos sintomas. O anti-VHA IgM é detetável durante 3 a 6 meses após início dos sintomas, enquanto o anti-VHA IgG pode persistir indefinidamente. A deteção de anti-VHA IgM é sugestivo de infeção aguda pelo VHA. O anti-VHA total é utilizado principalmente para a determinação de infeção antiga (Siemens Healthineers, 2020f).

O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus de DNA pertencente à família *Hepadnaviridae*. Os principais meios de transmissão do VHB são relações sexuais desprotegidas, transfusões sanguíneas, transmissão vertical e partilha de objetos cortantes. O período de incubação varia entre 60 e 180 dias, com uma média de 90 dias. O HBV é constituído por uma estrutura externa (envelope viral) e uma estrutura interna (core) e os antígenos de cada estrutura estimulam a produção de anticorpos. Os marcadores serológicos de infeção por VHB são antígeno de superfície (HBsAg), anticorpo para antígeno de superfície (anti-HBs), anticorpo para antígeno core (anti-HBc), antígeno “e” (HBeAg) e anticorpo para antígeno “e” (anti-HBe) (Viana et al., 2017).

O HBsAg é o primeiro marcador serológico a surgir numa infeção aguda por VHB. O anti-HBc total está presente durante todo o período de infeção e nos indivíduos que recuperaram de infeção passada. O HBeAg é um marcador de níveis elevados de replicação viral, que corresponde a uma alta taxa de infecciosidade. A persistência de HBeAg superior a 10 semanas e/ou HBsAg e DNA de VHB superior a 6 meses indica evolução para infeção crónica pelo VHB (Viana et al., 2017).

A deteção exclusiva de anti-HBs indica imunidade contra VHB em indivíduos imunizados pela vacina da hepatite B. Os indivíduos que recuperaram de infeção passada

desenvolvem anticorpos anti-HBs e anti-HBc. Os indivíduos com infeção crónica não produzem anti-HBs (Viana et al., 2017).

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus de RNA da família *Flaviviridae* (Viana et al., 2017). A transmissão do VHC ocorre principalmente por transfusão sanguínea, consumo de drogas por via intravenosa, procedimentos de colocação de piercings ou tatuagens, exposição nosocomial, contacto sexual, contacto doméstico casual, técnicas de reprodução assistida e de mãe para o filho durante a gravidez, o parto ou no período pós-parto. O VHC é o principal agente etiológico de hepatite crónica que não A e B. A presença de anticorpos do VHC indica infeção passada ou possibilidade de transmitir VCH (Siemens Healthineers, 2019k).

#### 7.11.2. Vírus da imunodeficiência humana

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um retrovírus da subfamília *Lentivirinae*, que se propaga por contacto sexual, transmissão perinatal e exposição a sangue ou produtos hemáticos infetados. O VIH do tipo 1 (VIH-1) é o principal agente responsável pela síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA). Nas infeções por VIH do tipo 2 (VIH-2), as taxas de transmissão e replicação do vírus são inferiores e a taxa de declínio das células T CD4 é mais lenta. O procedimento efetuado no Atellica é um teste de rastreio da infeção por VIH através da deteção de anticorpos anti-VIH-1 e/ou anti-VIH-2 e/ou antígenos p24. As amostras reativas devem ser testadas novamente e devem ser acompanhadas com testes suplementares (Siemens Healthineers, 2020h).

## 9. Controlo da qualidade

O laboratório da SYNLAB tem o objetivo de garantir resultados confiáveis e rigorosos, com base nas Normas ISO 9001, ISO 15189 e Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL), requisitos legais e regulamentação aplicável.

### 9.1. Controlo Interno da Qualidade (CIQ)

O CIQ é praticado diariamente, antes de serem processadas quaisquer amostras, em todos os setores do laboratório da SYNLAB com o objetivo de realizar resultados reprodutíveis.

A passagem de controlos é efetuada no início da corrida analítica, nos ensaios com elevado número de amostras processadas, após nova calibração, troca de reagente ou intervenção técnica no equipamento. Os resultados dos controlos são analisados nos gráficos de Levey-Jennings com aplicação das regras múltiplas de Westgard. O objetivo dos controlos é garantir deteção de anomalias, avaliação de erros a fim de corrigir imediatamente.

### 9.2. Avaliação Externa da Qualidade (CEQ)

O laboratório da SYNLAB participa em vários programas de CEQ, tais como, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*, *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC)*, *Randox International Quality Assessment Schemes (RIQAS)* e Programa Nacional de Avaliação da Qualidade Laboratorial orientado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Nestes programas é avaliado o desempenho dos laboratórios participantes, atribuindo comparação entre os laboratórios relatados num relatório dos resultados.

## 10. Referências bibliográficas

- Akinfemiwa, O., & Muniraj, T. (2021). Amylase. Retrieved December 29, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/>
- Alhadj, M., & Farhana, A. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Retrieved December 15, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Amin Nordin, F. D., Mohd Khalid, M. K. N., Abdul Aziz, S. M., Mohamad Bakri, N. A., Ahmad Ridzuan, S. N., Abdul Jalil, J., ... Yakob, Y. (2020). Performance comparison of EasyFix G26 and HYDRASYS 2 SCAN for the detection of serum monoclonal proteins. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(6), e23254. <https://doi.org/10.1002/jcla.23254>
- Ang, S. H., Thevarajah, M., Alias, Y., & Khor, S. M. (2015). Current aspects in hemoglobin A1c detection: A review. *Clinica Chimica Acta*, 439, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.019>
- Areal, A., Nunes, S., Moreira, M., Faustino, M. A., Cardoso, L., & Sá, C. (2010). Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos, factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 41(1), 16–21.
- Bain, B. J. (2015). *Blood Cells A Practical Guide* (5th ed.; John Wiley & Sons, Ed.).
- Baron, E. J., Miller, J. M., Weinstein, M. P., Richter, S. S., Gilligan, P. H., Thomson, R. B., ... Pritt, B. S. (2013). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), e22–e121. <https://doi.org/10.1093/cid/cit278>
- BioMérieux. (2010). *BacT/ALERT® 3D User Manual*. France.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Bossuyt, X., Bogaerts, A., Schiettekatte, G., & Blanckaert, N. (1998). Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clinical Chemistry*, 44(5), 944–949. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.5.944>
- Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2016). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (7th ed.; B. G. Sawyer, Ed.). Elsevier.
- Buttarello, M. (2016). Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(Suppl. 1), 123–132. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12500>
- Cha, C. H., Park, C. J., Cha, Y. J., Kim, H. K., Kim, D. H., Honghooon, ... Cho, H. I. (2009). Erythrocyte sedimentation rate measurements by test 1 better reflect inflammation than do those by the westergren method in patients with malignancy,

- autoimmune disease, or infection. *American Journal of Clinical Pathology*, 131(2), 189–194. <https://doi.org/10.1309/AJCP0U1ASTLRANIJ>
- Chandler, L. (2013). Challenges in Clinical Microbiology Testing. In *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction* (pp. 315–326). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415783-5.00020-7>
- Chaudhry, R., Usama, S. M., & Babiker, H. M. (2021). Physiology, Coagulation Pathways. Retrieved December 20, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>
- Daly, M. E. (2011). Determinants of platelet count in humans. *Haematologica*, 96(1), 10–13. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.035287>
- Dean, L. (2005). Blood and the cells it contains. In *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- DeLoughery, T. G. (2014). Microcytic anemia. *New England Journal of Medicine*, 371(14), 1324–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215361>
- Direção-Geral da Saúde. (2012). *Norma 008/2012: Diagnóstico e Tratamento da Infecção do Trato Urinário em Idade Pediátrica*.
- Direção Geral de Saude. (2011). *Norma 063/2011: Prescrição e determinação do hemograma*.
- Direção Geral de Saude. (2012). *Norma 039/2011: Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação e Monitorização da Função Tiroideia*. Lisboa.
- Direção Geral de Saude. (2015). *Norma 030/2013: Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto*.
- Esim Buyukbayrak, E., Kars, B., Karsidag, A. Y. K., Karadeniz, B. I., Kaymaz, O., Gencer, S., ... Turan, M. C. (2010). Diagnosis of vulvovaginitis: Comparison of clinical and microbiological diagnosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 282, 515–519. <https://doi.org/10.1007/s00404-010-1498-x>
- EUCAST. (2019). New definitions of S, I and R from 2019. Retrieved January 22, 2022, from <https://www.eucast.org/newsiandr/>
- Euroimmun. (n.d.). *Instruções de teste EUROLINE AMA Profile (IgGM)*.
- Euroimmun. (2016a). *Instruções de teste EUROLINE Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag et cN-1A (IgG)*.
- Euroimmun. (2016b). *Instruções de teste EUROLINE Autoimmune Liver Diseases (IgG)*.
- Euroimmun. (2017a). *Instruções de teste EUROLINE ANA Perfil 23 (IgG)*.
- Euroimmun. (2017b). *Instruções de teste EUROLINE Neuronal Antigens Profile 2*.
- Euroimmun. (2017c). *Instruções de teste EUROLINE Systemic sclerosis (Nucleoli) profile (IgG)*.
- Euroimmun. (2019). *ANA diagnostics using indirect immunofluorescence*.
- EUROIMMUN. (2022). *EUROIMMUN Product Catalogue*.

- Fonseca, A., Sebastião, C., Martins, F., Ribeiro, M., Calheiros, I., Lito, L. M., ... Bento, R. (2004). Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. In *Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge*.
- Ford, J. (2013). Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*, 35(3), 351–357. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12082>
- Gounden, V., Bhatt, H., & Jialal, I. (2021). Renal Function Tests. Retrieved November 2, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507821/>
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V, Math, A. A. K., & Vernekar, S. N. (2010). Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(4), 170–173.
- Hageman, S. M., & Sharma, S. (2021). Low HDL Cholesterol. Retrieved November 3, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560749/>
- Herold, N. C., & Mitra, P. (2021). Immunophenotyping. Retrieved January 17, 2022, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558927/>
- Holesh, J. E., Aslam, S., & Martin, A. (2021). Physiology, Carbohydrates. Retrieved November 1, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459280/>
- Huff, T., Boyd, B., & Jialal, I. (2021). Physiology, Cholesterol. Retrieved November 2, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470561/?report=classic>
- Humphries, R. M., & Linscott, J. (2015). Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 3–31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-14>
- Kalakonda, A., Jenkins, B. A., & John, S. (2021). Physiology, Bilirubin. Retrieved October 30, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470290/>
- Kamal, A. H., Tefferi, A., & Pruthi, R. K. (2007). How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(7), 864–873. <https://doi.org/10.4065/82.7.864>
- Kasarala, G., & Tillmann, H. L. (2016). Standard liver tests. *Clinical Liver Disease*, 8(1), 13–18. <https://doi.org/10.1002/cld.562>
- Khan, Y. S., & Farhana, A. (2021). Histology, Thyroid Gland. Retrieved December 27, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551659/>
- Korniluk, A., Koper-Lenkiewicz, O. M., Kamińska, J., Kemon, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2019). Mean platelet volume (MPV): New perspectives for an old marker in the course and prognosis of inflammatory conditions. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9213074>

- Lala, V., Goyal, A., Bansal, P., & Minter, D. A. (2021). Liver Function Tests. Retrieved November 2, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/>
- Leader, A., Pereg, D., & Lishner, M. (2012). Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Annals of Medicine*, 44(8), 805–816. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.653391>
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. J., Giske, C. G., Heisig, P., Macgowan, A. P., ... Kahlmeter, G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 141–160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
- Lowe, D., Sanvictores, T., & John, S. (2021). Alkaline Phosphatase. Retrieved November 2, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/>
- Maesa, J. M., Fernández-Riejós, P., Mora, C. S., de Toro, M., Valladares, P. M., & González-Rodríguez, C. (2016). Evaluation of Bio-Rad D-100 HbA1c analyzer against Tosoh G8 and Menarini HA-8180V. *Practical Laboratory Medicine*, 5, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2016.05.002>
- Marrack, P., Kappler, J., & Kotzin, B. L. (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature Medicine*, 7, 899–905. <https://doi.org/10.1038/90935>
- Martinez, R. M., & Wolk, D. M. (2016). Bloodstream Infections. *Microbiol Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016>
- Martins, D. M., & Gagliani, L. H. (2008). Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. *Revista UNILUS - Ensino e Pesquisa*, 5(8), 5–24.
- Meintker, L., Ringwald, J., Rauh, M., & Krause, S. W. (2013). Comparison of automated differential blood cell counts from abbot sapphire, siemens advia 120, beckman coulter DxH 800, and sysmex XE-2100 in normal and pathologic samples. *American Journal of Clinical Pathology*, 139(5), 641–650. <https://doi.org/10.1309/AJCP7D8ECZRXXGWCG>
- Minnesota Department of Health. (2018). About Antibiograms. Retrieved December 7, 2021, from [www.health.state.mn.us](http://www.health.state.mn.us)
- Moman, R. N., Gupta, N., & Varacallo, M. (2022). Physiology, Albumin. Retrieved January 10, 2022, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
- Murdoch, D. R., Werno, A. M., & Jennings, L. C. (2019). Microbiological diagnosis of respiratory illness: Recent advances. In *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children* (9th ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44887-1.00022-5>
- Nagao, T., & Hirokawa, M. (2017). Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *Journal of General and Family Medicine*, 18(5), 200–204. <https://doi.org/10.1002/jgf2.31>
- O'Connell, T. X., Horita, T. J., & Kasravi, B. (2005). Understanding and interpreting

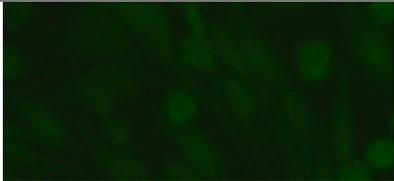
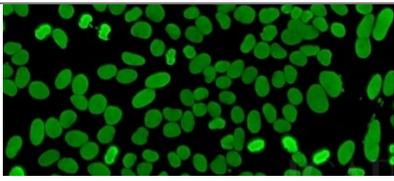
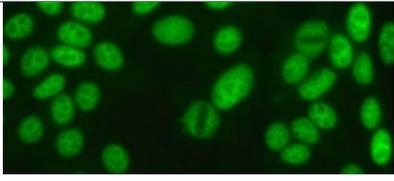
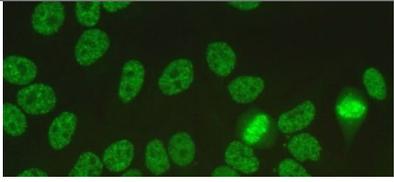
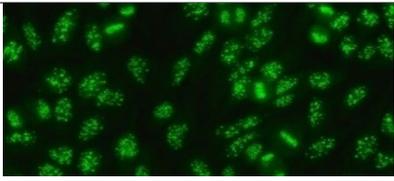
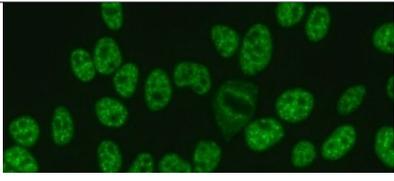
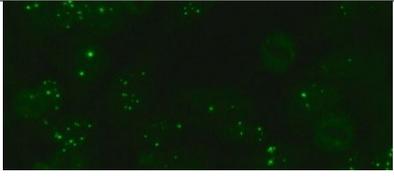
- serum protein electrophoresis. *American Family Physician*, 71(1), 105–112.
- Pirahanchi, Y., & Sharma, S. (2021). Biochemistry, Lipase. Retrieved November 1, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537346/>
- Pirahanchi, Y., Sinawe, H., & Dimri, M. (2021). Biochemistry, LDL Cholesterol. Retrieved November 3, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519561/>
- Rifai, N., Horvath, A. R., & Wittwer, C. T. (2018). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (6th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Riley, L. K., & Rupert, J. (2015). Evaluation of patients with leukocytosis. *American Family Physician*, 92(11), 1004–1011.
- Rompianesi, G., Hann, A., Komolafe, O., Pereira, S. P., Davidson, B. R., & Gurusamy, K. S. (2017). Serum amylase and lipase and urinary trypsinogen and amylase for diagnosis of acute pancreatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012010.pub2>
- Sayed, S. A. El, & Mukherjee, S. (2021). Physiology, Pancreas. Retrieved November 3, 2020, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
- Sebia. (2013). *CAPILLARYS PROTEIN (E) 6*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2013). *Instruções Multicalibrador TP*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2014). *Instruções Protein S Ac*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2017a). *Instruções Berichrom® Proteína C*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2017b). *Instruções Factor VIII cromogénico*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2017c). *Instruções INNOVANCE® D-Dimer*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2017d). *Instruções Reagente de Rastreio LA1 e Reagente de Confirmação LA2*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2018a). *Instruções Berichrom® Antitrombina III (A)*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2018b). *Instruções Multifibren® U*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2018c). *Instruções Plasma com deficiência de factor de coagulação V*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2018d). *Instruções Thromborel® S*.
- Siemens Healthcare Diagnostics. (2019). *Instruções Dade® Actin® FS Reagente para a determinação do APTT*.
- Siemens Healthineers. (2017). Aspartato Aminotransferase (Ast). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2018). *Albumina (Alb). 2*.
- Siemens Healthineers. (2019a). *Ácido Úrico (UA). 3, 1–14*.
- Siemens Healthineers. (2019b). *Alanina Aminotransferase (ALT). 4*.

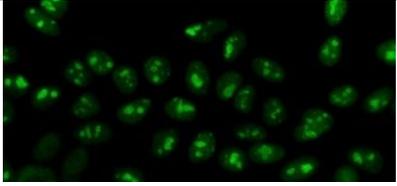
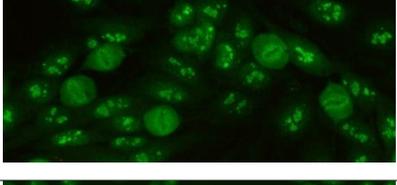
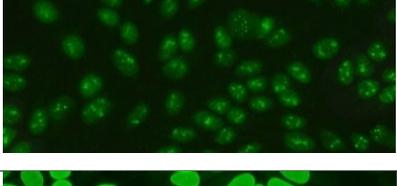
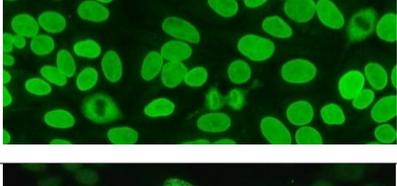
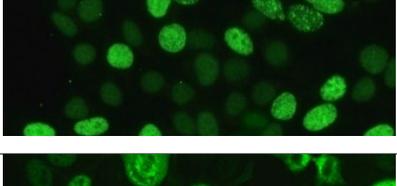
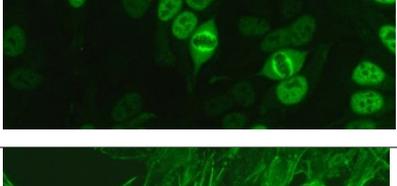
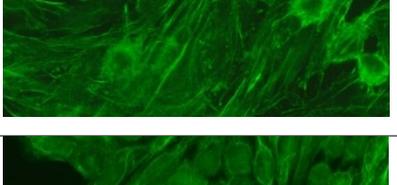
- Siemens Healthineers. (2019c). Amilase pancreática (PAmy). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019d). Capacidade total de ligação de ferro (TIBC). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019e). Colesterol LDL Direto (DLDL). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019f). Creatinina\_2 (Crea\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019g). *Ferritina (Fer)*. 3, 1–20.
- Siemens Healthineers. (2019h). Ferro\_2 (Iron\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019i). Fosfatase alcalina, concentrada (ALP\_2c). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019j). Gama-glutamil transferase (GGT). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019k). Hepatite C (aHCV). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019l). Lactato desidrogenase L-P (LDLP). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019m). Lipase (Lip). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019n). Microalbumina\_2 ( $\mu$ ALB\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019o). Resumo e explicação Princípios do procedimento: Multissensor Integrado A-LYTE (IMT Na K Cl). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019p). Transferrina (Trf). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2019q). Troponina I de Alta Sensibilidade (TnIH). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020a). Bilirrubina direta 2 (DBil\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020b). Bilirrubina total\_2 (TBil\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020c). Colesterol\_2 (Chol\_2). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020d). Colesterol HDL Direto (D-HDL). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020e). Glicose hexoquinase\_3 (GluH\_3). *Atellica CH Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020f). HAV Total (aHAVT). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020g). hCG OUS Total (ThCG). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020h). HIV Ag/Ab Combo (CHIV). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020i). Hormona folículo-estimulante (FSH). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020j). Progesterona (PRGE). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020k). Prolactina (PRL). *Atellica IM Analyzer*.

- Siemens Healthineers. (2020l). Testosterona II (TSTII). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020m). Tiroxina Livre (FT4). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020n). Tiroxina Total (T4). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020o). Triiodotironina Livre (FT3). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2020p). *Triiodotironina Total (T3)*. 3, 1–20.
- Siemens Healthineers. (2021a). Hormona Estimulante da Tireoide 3-Ultra (TSH3-UL). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2021b). Hormona luteinizante (LH). *Atellica IM Analyzer*.
- Siemens Healthineers. (2021c). Triglicérideos (concentrado) (Trig). *Atellica CH Analyzer*.
- Silva, R. O. de P. e, Lopes, A. de F., & Faria, R. M. D. de. (2008). Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*, 18(2), 116–122.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6(791). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Sousa, F., Sousa, S., Vaz, S., & Abecasis, F. (2021). Accuracy of gasometry in electrolyte evaluation. *Revista Da Sociedade Portuguesa de Anestesiologia*, 30(2), 62–67. <https://doi.org/10.25751/rspa.23929>
- Stamm, W. E. (1992). Criteria for the diagnosis of urinary tract infection and for the assessment of therapeutic effectiveness. *Infection*, 20(Suppl. 3), 151–154. <https://doi.org/10.1007/BF01704358>
- Tefferi, A., Hanson, C. A., & Inwards, D. J. (2005). How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(7), 923–936. <https://doi.org/10.4065/80.7.923>
- ThermoFisher. (n.d.-a). Laboratory testing for pernicious anemia. Retrieved October 4, 2021, from <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions/elia-autoimmunity-solutions/pernicious-anemia.html>
- ThermoFisher. (n.d.-b). Laboratory Testing for Rheumatoid Arthritis. Retrieved November 9, 2021, from <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions/elia-autoimmunity-solutions/rheumatoid-arthritis.html>
- ThermoFisher. (2011).  *$\beta$ 2-Glycoprotein I IgG*. *Instruções de utilização*.
- ThermoFisher. (2012). *Gliadin IgG*. *Instruções de utilização*.
- ThermoFisher. (2015a). *Cardiolipin IgA*. *Instruções de Utilização*.
- ThermoFisher. (2015b). *RF IgA*. *Instruções de utilização*.
- ThermoFisher. (2016). *anti-TPO*. *Instruções de utilização*.
- ThermoFisher. (2017a). *anti-TSH-R*. *Instruções de utilização*.
- ThermoFisher. (2017b). *ASCA IgG*. *Instruções de utilização*.

- ThermoFisher. (2020a). *anti-TG. Instruções de utilização.*
- ThermoFisher. (2020b). *CCP. Instruções de utilização.*
- ThermoFisher. (2020c). *EliA Celikey IgG. Instruções de utilização.*
- ThermoFisher. (2020d). *ImmunoCAP Allergen. Instruções de utilização.*
- Tille, P. M. (2017). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (14th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Tishkowsky, K., & Gupta, V. (2021). Erythrocyte Sedimentation Rate. Retrieved November 8, 2021, from Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/?report=classic>
- Toulon, P. (2016). Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(Suppl. 1), 66–77. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12531>
- Valente, C., Faria, M. J., Trindade, L., Barros, M. S. J., Vieira, A. A., Albuquerque, I., & Rodrigues, R. (1993). Diagnóstico serológico de algumas doenças infecciosas. *Acta Médica Portuguesa*, 6, 605–612.
- Viana, D. R., Veloso, N. M., Neto, O. C., Papacosta, N. G., Nunes, G. M., & Guedes, V. R. (2017). Hepatite B e C: diagnóstico e tratamento. *Revista de Patologia Do Tocantins*, 4(3), 73–79. <https://doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2017v4n3p73>
- Viscoli, C. (2016). Bloodstream infections: The peak of the iceberg. *Virulence*, 7(3), 248–251. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1152440>
- Voigt, J., Krause, C., Rohwäder, E., Saschenbrecker, S., Hahn, M., Danckwardt, M., ... Stöcker, W. (2012). Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/651058>
- Washington, J. A. (1996). Principles of Diagnosis. In Baron S (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- WHO. (2011). Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Retrieved October 1, 2021, from Vitamin and Mineral Nutrition Information System website: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>
- Wilson, M. L., & Gaido, L. (2004). Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clinical Infectious Diseases*, 38(8), 1150–1158. <https://doi.org/10.1086/383029>

ANEXO – Padrões de imunofluorescência indireta de ANA (*International Consensus on ANA Patterns*)

Padrão	Antigénios associados	Observação
Negativo		
Nuclear homogéneo	dsDNA, nucleossomas e histonas	
Nuclear finogranular	SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, TIF1 $\gamma$ , TIF1 $\beta$ , Ku	
Nuclear finogranular denso	DFS70/LEDGF	
Centrómero	CENP-A, CENP-B	
Nuclear mosqueado	hnRNP, U1RNP, Sm, RNA polimerase III	
Múltiplos pontos nucleares	Sp-100, proteínas PML, MJ/NXP-2	
Raros pontos nucleares	p80-coilina, SMN	

Nucleolar homogéneo	PM/Sc1-75, PM/Sc1-100, Th/To, B23/nucleofosmina, nucleolina, No55/SC65	
Nucleolar grumoso	U3-snoRNP/fibrilarina	
Nucleolar pontilhado	RNA polimerase I, hUBF/NOR-90	
Membrana nuclear	Laminas A, B, C ou proteínas associadas às laminas	
Nuclear pontilhado pleomórfico	PCNA	
CENP-F-like	CENP-F	
Citoplasmático filamentoso linear	Actina, miosina não muscular	
Citoplasmático filamentoso fibrilar	Vimentina, citoqueratina, tropomiosina	