

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS EM PATOLOGIA CLÍNICA**

CAROLINA DAS NEVES ROSÁRIO SEBASTIÃO

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR RENATO DANTON SAMPAIO RIBEIRO DE ABREU -
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, julho de 2022

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS EM PATOLOGIA CLÍNICA**

CAROLINA DAS NEVES ROSÁRIO SEBASTIÃO

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR RENATO DANTON SAMPAIO RIBEIRO DE ABREU -
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA (ESTeSL)

Júri:

Presidente: Doutora Edna Ribeiro – ESTeSL

Arguente: Doutor Rui Raposo – Universidade do Algarve (UAlg)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, julho de 2022

Direitos de Cópia

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor.

Copyright© 2022 - Carolina das Neves Rosário Sebastião

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa - Instituto Politécnico de Lisboa, por me receber durante os últimos 2 anos e por tornar possível a realização deste estágio.

Um especial agradecimento ao meu orientador, o professor Renato Abreu, por aceitar este desafio. Agradeço-lhe pela disponibilidade, pela ajuda e por todos os conselhos que foram essenciais para eu chegar ao fim desta aventura.

Gostaria igualmente de agradecer ao Grupo Clara Saúde, em particular ao Labocentro, por me receberem de braços abertos durante toda esta experiência. Um especial obrigada à Dr.^a Sónia Reimão por supervisionar o meu percurso no laboratório.

Agradeço à Susana Curado, à Ana Hipólito, à Andreia Moura e à Milva Rodrigues pela paciência, por todo o conhecimento que me transmitiram, por me incentivarem a dar o meu melhor e pela confiança que depositaram em mim.

Um especial agradecimento à Ana Batista por estar sempre disposta a ajudar, principalmente nos momentos mais frustrantes e stressantes. Agradeço-lhe por todo o apoio, pelas palavras de motivação e por acreditar em mim.

Gostaria de deixar uma palavra de carinho a todos os meus colegas de laboratório, que me acompanharam ao longo destes meses, sempre dispostos a ajudar. Obrigada pela disposição e por animarem os meus dias. Um especial agradecimento ao Iuri, por partilhar toda esta experiência comigo. Obrigada por melhor do que ninguém, entenderes os momentos de frustração e desespero. Obrigada pelos conselhos, pelas brincadeiras e gargalhadas. Conseguimos!

Um grande agradecimento a todos os meus amigos e à minha família, especialmente a ti, mãe, por estares do meu lado e me apoiares em todas as aventuras, pela paciência quando o cansaço era muito, pela confiança, por acreditares em mim e tornares tudo isto possível.

A ti, Diogo, pelo apoio incondicional, por toda a ajuda, pela paciência, pelos planos que foram adiados, pelos dias passados em frente ao computador, por me acompanhares durante todo este percurso, por me incentivares a dar o meu melhor, por tudo, um especial obrigada.

Sem vocês, nada disto seria possível.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O presente relatório de estágio surge no âmbito da unidade curricular Projeto/Tese/Estágio do 2º ano do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. O estágio de natureza profissional foi realizado no Labocentro, entre setembro de 2021 e fevereiro de 2022, enquadrando-se na área das análises clínicas, um dos mais importantes meios complementares de diagnóstico e terapêutica.

Durante o período de estágio foram desenvolvidas as atividades de rotina do laboratório nas áreas de Hematologia e Imunologia, com o objetivo de compreender as etapas do processo laboratorial e o funcionamento dos equipamentos utilizados nessas secções, bem como entender a importância clínica dos parâmetros hematológicos e imunológicos avaliados. Nesse sentido, foram utilizadas metodologias de quimioluminescência, imunocromatografia, citometria de fluxo e espectrofotometria de absorção, entre outras.

As tarefas realizadas durante o estágio permitiram a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do 1º ano do Mestrado, bem como a aquisição de competências ao nível da importância clínica dos parâmetros em estudo e das metodologias utilizadas na sua determinação, cumprindo assim os objetivos estabelecidos. Esta experiência enriquecedora possibilitou ainda a aquisição de competências práticas na área das análises clínicas, o que representa uma mais-valia para o futuro e para a vida profissional.

Palavras-chave: Análises clínicas, Hematologia, Imunologia.

Abstract

The internship herein reported arose from the curricular unit Project/Thesis/Internship from the 2nd year of the master's degree in Clinical-Laboratory Technologies from Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. The internship of professional nature was performed in Labocentro, between September 2021 and February 2022, in the area of clinical analysis, one of the complementary means of diagnosis and therapeutics.

During the internship, the routine activities in the area of Hematology and Immunology were performed. The main goal was to learn the steps in the laboratory process and how the equipment function in these sections, as well as understand the clinical importance of the hematological and immunological parameters evaluated. For this, methodologies such as chemiluminescence, immunochromatography, flow cytometry and absorption spectrophotometry, among others, were used.

The activities performed during the internship allowed not only the consolidation of the theoretical knowledge acquired during the 1st year of the master's but also to learn about the clinical importance of the parameters evaluated and the methodologies used for their determination, thus accomplishing the established objectives. Furthermore, with this enriching experience, it was possible to gain practical skills in the clinical analysis field, which represents a big added value for the professional life and future career path.

Keywords: Clinical analysis, Hematology, Immunology.

Índice Geral

1. Introdução.....	- 1 -
2. Laboratório Labocentro – Grupo Clara Saúde.....	- 3 -
3. Fase pré-analítica.....	- 5 -
4. Fase analítica.....	- 7 -
4.1. Área de Imunologia.....	- 7 -
4.1.1. Sistema <i>Alinity ci-series</i>	- 8 -
4.1.2. Sistema <i>Immulite® 2000</i>	- 11 -
4.1.3. Parâmetros imunológicos analisados.....	- 11 -
4.1.3.1. Serologia infecciosa.....	- 11 -
4.1.3.2. Endocrinologia.....	- 23 -
4.1.3.3. Alergologia.....	- 34 -
4.1.3.4. Marcadores tumorais.....	- 35 -
4.1.3.5. Doenças autoimunes.....	- 36 -
4.1.3.6. Marcadores de doença cardiovascular.....	- 37 -
4.1.3.7. Marcadores de anemia.....	- 38 -
4.2. Área de Hematologia.....	- 39 -
4.2.1. Hemograma.....	- 40 -
4.2.1.1. Sistema <i>Cell-Dyn 3700®</i>	- 43 -
4.2.1.2. Sistema <i>Cell-Dyn Sapphire</i>	- 45 -
4.2.2. Esfregaços de sangue periférico e coloração.....	- 46 -
4.2.3. Velocidade de sedimentação eritrocitária.....	- 47 -
4.2.3.1. Sistema <i>Ves-Matic Cube 80</i>	- 48 -
4.2.4. Doseamento de hemoglobina glicosilada.....	- 48 -
4.2.4.1. Sistema <i>Hb9210™ Premier</i>	- 49 -
4.2.4.2. Sistema <i>Adams™ A_{1C} HA-8180T</i>	- 50 -
4.2.5. Grupo sanguíneo e reação de Coombs.....	- 52 -
4.2.5.1. Sistema <i>WADiana® Compact</i>	- 53 -
4.2.6. Ensaio de hemostase.....	- 55 -
4.2.6.1. Sistema <i>BCS®XP</i>	- 57 -
5. Fase pós-analítica.....	- 61 -
6. Casos Laboratoriais.....	- 63 -
6.1. Hematologia.....	- 63 -
6.2. Imunologia.....	- 66 -

7. Limitações e resolução de problemas.....	- 71 -
8. Conclusão.....	- 73 -
9. Linha de investigação.....	- 75 -
9.1. Introdução.....	- 75 -
9.2. Objetivos.....	- 80 -
9.3. Metodologias.....	- 81 -
9.3.1. Desenho do estudo.....	- 82 -
9.4. Resultados esperados.....	- 84 -
9.5. Limitações.....	- 85 -
9.6. Considerações éticas.....	- 85 -
9.7. Instituições e colaborações.....	- 85 -
9.8. Considerações finais.....	- 86 -
9.9. Cronograma.....	- 86 -
10. Referências.....	- 87 -
11. Anexos.....	- 95 -

Índice de Tabelas

- Tabela 4.1:** Parâmetros detetados na área de serologia infecciosa do Labocentro e respetiva doença em estudo. Tabela do autor. - 23 -
- Tabela 4.2:** Parâmetros detetados na secção de endocrinologia do Labocentro e respetiva área em estudo. Tabela do autor. - 34 -
- Tabela Suplementar 1:** Parâmetros avaliados na secção de imunologia do Labocentro, no equipamento *Alinity ci-series*. Tabela do autor. - 95 -
- Tabela Suplementar 2:** Moléculas detetadas no sistema *Alinity ci series* através de imunoensaios *CMIA* quantitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor. - 91 -
- Tabela Suplementar 3:** Moléculas detetadas em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci series* através de imunoensaios *CMIA* qualitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor. - 94 -
- Tabela Suplementar 4:** Moléculas detetadas no sistema *Immulinite® 2000* através de imunoensaios quimioluminescentes quantitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor. - 96 -
- Tabela Suplementar 5:** Anticorpos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaios *CMIA* de 2 passos por relação direta. Tabela do autor. - 97 -
- Tabela Suplementar 6:** Parâmetros detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaios *CMIA* de 1 passo por relação direta. Tabela do autor. - 98 -
- Tabela Suplementar 7:** Parâmetros imunológicos (excluindo anticorpos) detetados no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaios *CMIA* de 2 passos por relação direta. Tabela do autor. - 99 -
- Tabela Suplementar 8:** Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação inversa. Tabela do autor. - 100 -
- Tabela Suplementar 9:** Parâmetros imunológicos detetados no sistema *Immulinite® 2000* através de imunoensaios quimioluminescentes quantitativos do tipo *sandwich*. Tabela do autor. - 100 -

Tabela Suplementar 10: Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaios *CMIA* de 1 passo por relação inversa. Tabela do autor.....- 101 -

Tabela Suplementar 11: Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro no sistema *Immulinite® 2000* através de imunoensaios quimioluminescentes quantitativos competitivos. Tabela do autor.....- 101 -

Tabela Suplementar 12: Estimativa de ensaios realizados, durante o período de estágio, na determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo. Tabela do autor.....- 102 -

Índice de Figuras

Figura 2.1: Laboratório de análises clínicas Labocentro. À esquerda observa-se a vista da fachada (figura do autor). À direita encontra-se a vista de satélite do laboratório, situado na Rua Gago Coutinho e Sacadura Cabral, nº 136 – 138, no Pinhal Novo, distrito de Setúbal (Google maps, Google, Estados Unidos). - 4 -

Figura 4.1: Atividades realizadas diariamente na secção de imunologia do Labocentro. De manhã, foi efetuada a manutenção dos equipamentos *Alinity ci-series* e *Immulite® 2000*, a verificação de reagentes e consumíveis, o controlo de qualidade e calibração e o processamento das amostras com análises em falta. À tarde, as amostras colhidas no próprio dia foram triadas e processadas. Quando solicitado, realizou-se o teste respiratório para determinação de infeção por *H. pylori* e a deteção de *hCG* em amostras de urina. Ao final do dia, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C. Figura do autor. - 9 -

Figura 4.2: Deteção de anticorpos através de um imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação direta. No 1º passo, os anticorpos presentes na amostra ligam-se aos antígenos nas micropartículas paramagnéticas. No 2º passo é adicionado anticorpo (**A**) ou antígeno (**B**) conjugado a acridina, que se liga ao complexo formado. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora, existe uma relação direta entre a quantidade de anticorpo na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 13 -

Figura 4.3: Imunoensaio *CMIA* de 1 passo por relação direta. A amostra é combinada com anticorpo conjugado a acridina e com as micropartículas revestidas com anticorpos contra a molécula a detetar. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora, existe uma relação direta entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 14 -

Figura 4.4: Deteção de parâmetros imunológicos (excluindo anticorpos) através de um imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação direta. No 1º passo, a molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos nas micropartículas. No 2º passo, o anticorpo secundário conjugado a acridina liga-se a esse complexo. Existe uma relação direta entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 14 -

Figura 4.5: A: Deteção qualitativa de anticorpos anti-VIH-1 e anti-VIH-2 por imunocromatografia. A membrana contém antígenos do VIH na área de teste (bandas 1 a 6) e a proteína A na linha de controlo. A proteína A conjugada liga-se às imunoglobulinas IgG presentes na amostra. Se estas forem anti-VIH, reagem contra os antígenos imobilizados na área de teste, formando uma linha colorida. O conjugado ligado a imunoglobulinas IgG (excepto IgG anti-VIH) continuará a migrar ao longo da

membrana até reagir com a proteína A na linha de controlo. **B:** Resultado positivo. **C:** Resultado negativo. Adaptado de *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*¹⁹ - 16 -

Figura 4.6: Imunoensaio *CMIA* de 2 passos para deteção de anti-Toxo IgM. No 1º passo, as imunoglobulinas IgM presentes na amostra ligam-se aos anticorpos anti-IgM humana que revestem as micropartículas. No 2º passo, o complexo anticorpo anti-p30 de *T. gondii* – lisado de *T. gondii* conjugado a acridina liga-se às imunoglobulinas anti-Toxo IgM. Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-Toxo IgM na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 19 -

Figura 4.7: Imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação inversa. No 1º passo, a amostra é combinada com as micropartículas revestidas com moléculas de ligação ao parâmetro a detetar. Caso este esteja presente na amostra, liga-se às micropartículas. No 2º passo, a molécula conjugada a acridina liga-se às moléculas disponíveis que revestem as micropartículas. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora à mistura de reação, existe uma relação inversa entre a quantidade de antigénio na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 25 -

Figura 4.8: Deteção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulinite® 2000* através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo do tipo *sandwich* de 2 passos. No 1º passo, a molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos nas micropartículas. No 2º passo, o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina liga-se ao complexo formado. A reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor. - 26 -

Figura 4.9: Imunoensaio *CMIA* de 1 passo por relação inversa. A molécula conjugada a acridina compete com a molécula na amostra pela ligação aos anticorpos que revestem as micropartículas. Existe uma relação inversa entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor. - 27 -

Figura 4.10: Deteção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulinite® 2000* através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo do tipo *sandwich* de 1 passo. A molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos que revestem as micropartículas e ao anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina formando um complexo. Após a adição do substrato quimioluminescente, a reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor. - 29 -

Figura 4.11: Deteção qualitativa de *hCG* em amostras de urina por imunocromatografia. O teste contém uma fase estacionária (anticorpos nas linhas de teste e de controlo) e uma fase móvel (anticorpos anti-*hCG* conjugados a partículas coloidais de ouro) (A). A amostra migra pela membrana e, na presença de *hCG*, forma-se o complexo conjugado-*hCG*. Este segue até à linha de teste, onde reage com os anticorpos anti-*hCG*, formando uma linha colorida (B). Caso não exista *hCG* na amostra, esta linha não aparecerá (C).

O conjugado em excesso reage com os anticorpos anti-conjugado na linha de controlo, formando uma linha colorida. Na sua presença, o resultado será positivo (presença da linha de teste) ou negativo (ausência da linha de teste), enquanto na sua ausência, o teste será inválido e deverá ser realizado novamente (D). Adaptado de *hCG Pregnancy Rapid Test Strip MonlabTest*^{® 49}. - 30 -

Figura 4.12: Detecção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulite*^{® 2000} através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo competitivo de 1 passo. A molécula conjugada a fosfatase alcalina compete com a molécula na amostra pela ligação aos anticorpos que revestem as micropartículas paramagnéticas. Após a adição do substrato quimioluminescente, a reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor. - 32 -

Figura 4.13: Detecção de IgE através de um imunoensaio quimioluminescente de 2 passos. No 1º passo, as IgE na amostra ligam-se aos alérgenos marcados com ligando que, por sua vez, se ligam ao anti-ligando presente nas esferas. No 2º passo, o anticorpo anti-IgE humana conjugado a fosfatase alcalina liga-se à IgE imobilizada. Após a adição do substrato quimioluminescente, o sinal gerado é proporcional à quantidade de IgE na amostra. Adaptado de *Make allergy testing routine: Information for laboratorians*⁶¹. - 35 -

Figura 4.14: Atividades realizadas diariamente na secção de Hematologia do Labocentro. De manhã, realizou-se a inicialização e manutenção dos equipamentos, a verificação de reagentes e consumíveis, o controlo de qualidade e calibração, e o processamento das amostras. À tarde, as amostras foram triadas e processadas. Quando solicitado, realizaram-se os esfregaços de sangue periférico e respetiva coloração e/ou o teste de solubilidade da hemoglobina S. Ao final do dia, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C. Figura do autor. - 42 -

Figura 4.15: Esfregaços de sangue periférico realizados manualmente a partir de amostras de sangue total anticoaguladas com *EDTA K₃* antes (**A**) e após (**B**) a coloração de May-Grünwald-Giemsa. Figura do autor. - 47 -

Figura 4.16: Teste de solubilidade da HbS. A hemólise dos eritrócitos leva à libertação de hemoglobina que é reduzida pelo hidrossulfito de sódio. A HbS reduzida torna-se cristalóide, conferindo um aspeto turvo à solução. Num resultado negativo, as linhas de visualização são claramente visíveis através do tubo. Num resultado positivo, tal como acontece na imagem, as linhas não são observáveis. Figura do autor. - 51 -

Figura 4.17: Determinação do grupo sanguíneo no sistema *WADiana*^{® Compact}. Se os antígenos eritrocitários da amostra reagirem com os anticorpos (anti-A, anti-B e anti-D) nos microtubos, ocorre aglutinação. O microtubo Ctl serve de controlo, não possuindo anticorpos. Num resultado positivo, os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel, enquanto num resultado negativo os eritrócitos formam um sedimento. Na figura encontram-se os cartões *DG Gel Confirm* após o fim da reação, com os seguintes

resultados: grupo 0⁺ (amostra 1), grupo AB⁻ (amostra 2), grupo AB⁺ (amostra 3), grupo 0⁻ (amostras 4 e 5), grupo B⁻ (amostra 6), grupo B⁺ (amostra 7), grupo A⁺ (amostras 8 e 9) e grupo A⁻ (amostra 10). Figura do autor. - 54 -

Figura 4.18: Reação de Coombs direta e PAI no sistema *WADiana*[®] *Compact*. Na reação de Coombs direta, os eritrócitos sensibilizados por anticorpos humanos IgG ou frações do complemento na amostra reagem com os anticorpos na coluna de gel, ocorrendo aglutinação. Na PAI, a aglutinação ocorre se a amostra apresentar anticorpos contra os antígenos eritrocitários dos reagentes. Num resultado positivo, os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel, enquanto num resultado negativo os eritrócitos formam um sedimento. **A:** Resultado negativo (poços 1-4 e 6-8) e positivo (poço 5). **B:** Resultado negativo (poços 1-4, 7 e 8) e positivo (poços 5 e 6). **C:** Resultado negativo (poços 1 e 2), positivo (poços 3 e 4) e os poços 5-8 estão por utilizar. Figura do autor. - 55 -

Figura 4.19: Representação das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação. Adaptado de *Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis e Physiology, Coagulation Pathways*^{120,121} - 57 -

Figura 6.1: Resultados obtidos após realização do hemograma e da VSE de uma senhora de 42 anos. Figura do autor. - 63 -

Figura 6.2: Resultados obtidos no hemograma de um senhor de 83 anos. Figura do autor. - 64 -

Figura 6.3: Resultados obtidos no hemograma de um senhor de 61 anos. Figura do autor. - 65 -

Figura 6.4: Resultados obtidos no hemograma de uma senhora de 75 anos. Figura do autor. - 66 -

Figura 6.5: Resultados obtidos para a confirmação da infecção pelo VIH de um senhor de 53 anos. Figura do autor. - 67 -

Figura 6.6: Resultados obtidos para o doseamento de marcadores tumorais de um senhor de 61 anos. Figura do autor. - 68 -

Figura 6.7: Resultados da avaliação da função da tiroide de uma senhora de 71 anos. Figura do autor. - 69 -

Figura 6.8: Resultados do doseamento de marcadores tumorais de uma senhora de 75 anos. Figura do autor. - 69 -

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AFP	Alfafetoproteína
aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
AR	Artrite reumatoide
ATLL	Linfoma de células T do adulto
AU	Unidade arbitrária
BNP	Péptido natriurético do tipo B
CA	Antigénio carboidrato
CCP	Péptido citrulinado cíclico
CEA	Antigénio carcinoembrionário
Ci	Unidade <i>Curie</i>
CMIA	Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes
CMV	Citomegalovírus
COVID-19	Doença do coronavírus
DHEA-SO₄	Sulfato de deidroepiandrosterona
DIT	Diiodotirosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Vírus Epstein Barr
EDTA K₃	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
fL	Femtolitro
FSH	Hormona folículo-estimulante
GH	Hormona de crescimento
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HAM/TSP	Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao <i>HTLV-I</i>
HBeAg	Antigénio e do vírus da hepatite B
HBsAg	Antigénio de superfície da hepatite B
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HCT	Hematócrito

Hb	Hemoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HTLV	Vírus linfotrópico-T humano
HV	Vírus da hepatite
IgE	Imunoglobulinas específicas
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
INR	Razão normalizada internacional
IRF	Fração de reticulócitos imaturos
IU	Unidade internacional
LH	Hormona luteinizante
MCH	Hemoglobina globular média
MCHC	Concentração de hemoglobina globular média
MCV	Volume globular médio
MI	Infarto do miocárdio
MIT	Monoiodotirosina
MPV	Volume plaquetário médio
nm	Nanómetro
NRBC	Glóbulos vermelhos nucleados
NT-proBNP	N-terminal-pro-BNP
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	Peso/volume
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
PAPP-A	Proteína plasmática associada à gravidez
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	Plaquetócrito
PDW	Peso de distribuição de plaquetas
PLT	Número total de plaquetas
PSA	Antigénio específico da próstata
PT	Tempo de protrombina
PTH	Hormona da paratiroide
RBC	Número total de eritrócitos

RDW	Peso de distribuição dos glóbulos vermelhos
RLUs	Unidades relativas de luz
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SHBG	Globulina de ligação da hormona sexual
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
T₃	Triiodotironina
T₄	Tiroxina
Tg	Tiroglobulina
TPO	Peroxidase da tiroide
TSH	Hormona estimulante da tiroide
TSHR	Recetor da <i>TSH</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VSE	Velocidade de sedimentação eritrocitária
WBC	Número total de leucócitos
WIC	Contagem dos leucócitos por impedância
WOC	Contagem ótica dos leucócitos
WVF	Fração viável de glóbulos brancos

1. Introdução

O presente relatório de estágio surge no âmbito da unidade curricular Projeto/Tese/Estágio do 2º ano do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL). O estágio de natureza profissional foi realizado no laboratório de análises clínicas Labocentro, segundo a orientação do professor Renato Abreu, entre setembro de 2021 e fevereiro de 2022, contabilizando um total de 622 horas de estágio realizadas ao longo de 90 dias.

O estágio enquadra-se na área das análises clínicas, um dos mais importantes meios complementares de diagnóstico e terapêutica. Esta área consiste num conjunto de exames efetuados em produtos biológicos em contexto laboratorial¹. A sua grande importância passa pelo auxílio do diagnóstico, prognóstico, monitorização terapêutica e prevenção de diversas doenças, contribuindo, dessa forma, para uma medicina cada vez mais personalizada². Visto que a decisão do clínico depende, frequentemente, dos resultados obtidos nos ensaios laboratoriais, é de extrema importância que todo o processo laboratorial seja realizado com o máximo rigor, uma vez que a ocorrência de erros pode contribuir, por exemplo, para um diagnóstico ou prognóstico incorretos. Considerando que a área das análises clínicas representa um papel central na prestação de cuidados de saúde, a realização de um estágio nesta área é de grande relevância não só para a compreensão do funcionamento e rigor de um laboratório de análises clínicas, mas também para a aquisição de competências ao nível da execução e validação das técnicas laboratoriais e interpretação dos resultados obtidos.

O estágio tinha como objetivos:

- Acompanhar e descrever as etapas do processo laboratorial (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica) no Labocentro;
- Realizar as atividades desenvolvidas nas áreas de Hematologia e Imunologia e descrevê-las de forma detalhada;
- Compreender a importância clínica dos parâmetros hematológicos e imunológicos analisados, correlacionando-os com diferentes patologias.

Nesse sentido, durante o período de estágio foram desenvolvidas as atividades de rotina do laboratório nas áreas de Imunologia e Hematologia, contabilizando, respetivamente, um total de 354 e 268 horas de estágio em cada secção. As atividades realizadas incluíram a manutenção dos equipamentos, verificação de reagentes e consumíveis, controlo de qualidade e calibração, triagem e processamento das amostras. Na área de Imunologia realizaram-se essencialmente metodologias de quimioluminescência e de imunocromatografia, enquanto na secção de Hematologia

foram vários os métodos utilizados. Entre eles, destacam-se as metodologias de citometria de fluxo, espectrofotometria de absorção, cromatografia líquida de alto desempenho (*HPLC*) de afinidade borónica e de troca catiónica em fase inversa, esfregaços de sangue periférico e respetiva coloração, e testes coagulométricos e imunoquímicos nos ensaios de hemostase. Estas atividades contribuíram para a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do 1º ano do Mestrado, bem como para a aquisição de competências teóricas e práticas na área das análises clínicas, incluindo a capacidade de interpretação de resultados nas áreas em estudo.

Neste relatório será realizada uma breve caracterização do Labocentro, seguindo-se uma descrição detalhada das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica do processo laboratorial. Relativamente à fase analítica serão descritas as atividades efetuadas nas áreas de Hematologia e Imunologia, os equipamentos utilizados e a importância clínica dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo. No final, serão discutidos alguns casos laboratoriais e será apresentada uma possível linha de investigação com base nas atividades realizadas.

2. Laboratório Labocentro – Grupo Clara Saúde

O laboratório de análises clínicas Labocentro pertence ao Grupo Clara Saúde. O Grupo foi fundado em 2010 pelo Dr. Carlos Clara e, atualmente, conta com dezenas de unidades dedicadas à prestação de cuidados de saúde nas áreas Médica e de Diagnóstico. Destas, destacam-se o Labocentro, o Anatomik - Laboratório de Anatomia Patológica e o Ceraque - Centro de Diagnóstico por Imagem.

O Grupo Clara Saúde tem como missão “(...) prestar aos seus utentes os melhores, mais rápidos e mais úteis serviços de saúde e diagnóstico, assim como satisfazer pessoal e profissionalmente os membros da sua equipa e contribuir para o crescimento dos seus parceiros”³.

O Grupo conta com uma equipa de profissionais qualificados cujo objetivo é fornecer serviços de qualidade e com o máximo rigor aos utentes. Para isso, aposta de forma contínua nos avanços científicos e tecnológicos, acompanhando a inovação e as mais recentes técnicas de diagnóstico nas suas áreas de atividade. O investimento em tecnologia de ponta para aplicação nas técnicas de diagnóstico visa satisfazer as necessidades dos utentes e clínicos ao melhorar a eficiência e eficácia dos serviços prestados.

A principal unidade laboratorial do Grupo é o Labocentro, situado na freguesia de Pinhal Novo, no distrito de Setúbal (Figura 2.1). A sua atividade teve início em 1979 na zona de Portela de Sacavém e, em 2010, o laboratório foi transferido para a localidade do Pinhal Novo. O Labocentro é o laboratório central de um conjunto de laboratórios na área da grande Lisboa, distrito de Setúbal e Alentejo, sendo atualmente o maior laboratório de análises clínicas a Sul do rio Tejo⁴.

Indo de encontro à aposta contínua em inovação do Grupo Clara Saúde, o Labocentro é um dos laboratórios tecnologicamente mais avançados do país, sendo hoje em dia um laboratório de referência para um número cada vez maior de laboratórios nacionais e internacionais⁴. O acompanhamento do desenvolvimento científico e tecnológico por parte de uma equipa de profissionais qualificada e empenhada visa garantir a qualidade de todo o processo laboratorial desde a fase pré-analítica à pós-analítica. Assim, tendo em vista a satisfação das necessidades dos utentes, pretende-se produzir, em tempo útil e com uma boa razão custo/efetividade, resultados corretos, com precisão, exatidão e confiança, num formato compreensível para o clínico. O Laboratório encontra-se certificado de acordo com a norma ISO 9001:2015.

O Labocentro está aberto ao público das 07:00 horas às 19:00 horas de segunda-feira a sexta-feira e das 08:00 horas às 17:00 horas ao sábado, sob a supervisão do diretor científico Dr. André Santos e sob a coordenação técnica da Dr.^a Sónia Reimão.

Na sua maioria, o laboratório encontra-se automatizado e informatizado, dividindo-se nas seguintes secções: zona de triagem, bioquímica e imunologia, hematologia, microbiologia, biologia molecular, autoimunidade, secção de radioimunoensaio e zona dos especialistas de análises clínicas. Para além disso, o Labocentro possui ainda duas salas de colheitas. A maior parte das análises são realizadas nos serviços de imunologia e de bioquímica, que constituem o *core* laboratorial.

O presente relatório centrar-se-á nas áreas de Hematologia e Imunologia, seguindo-se uma descrição detalhada das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica do Labocentro.

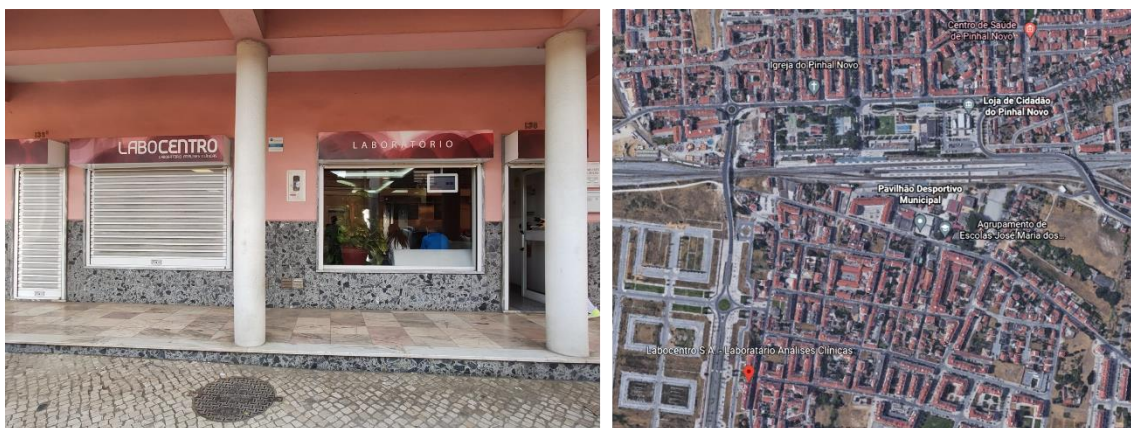


Figura 2.1: Laboratório de análises clínicas Labocentro. À esquerda observa-se a vista da fachada (figura do autor). À direita encontra-se a vista de satélite do laboratório, situado na Rua Gago Coutinho e Sacadura Cabral, nº 136 – 138, no Pinhal Novo, distrito de Setúbal (Google maps, Google, Estados Unidos).

3. Fase pré-analítica

O processo laboratorial envolve 3 fases, a fase pré-analítica, a analítica e a pós-analítica. A fase pré-analítica é aquela que antecede o processamento das amostras e está sujeita a maior intervenção humana estando, por isso, associada à maioria dos erros laboratoriais⁵. Ainda assim, estes podem ocorrer durante todo o processo laboratorial sendo, desta forma, essencial que todo o procedimento seja realizado com o máximo rigor, de modo a minimizar a ocorrência de erros⁵.

No Labocentro, o processo laboratorial tem início no atendimento dos utentes na receção, seguindo-se a colheita e respetiva identificação das amostras biológicas na sala de colheitas. Estas seguem, posteriormente, para a zona de triagem, onde se juntam às amostras provenientes dos postos de colheitas. Aí, as amostras são separadas consoante a secção a que se destinam: microbiologia (urina, exsudados vaginais/uretrais, fezes, etc), bioquímica e imunologia (sangue em tubo sem anticoagulante (tubo seco), amostras respiratórias para deteção da infeção por *Helicobacter pylori* e amostras de urina para o diagnóstico imunológico da gravidez), biologia molecular (exsudados nasais/nasofaríngeos) e hematologia (amostras de sangue total anticoaguladas com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (*EDTA K₃*) ou citrato de sódio).

Durante o período de estágio, as amostras de sangue em tubo seco foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm) na centrífuga 3-16P (Sigma Laborzentrifugen, Alemanha), para obtenção do soro. Depois, foram triadas no sistema Indexor (Maksense, Portugal), recorrendo à leitura do código de barras. Nesta etapa, consoante o tipo de análise solicitado, as amostras de soro foram encaminhadas para a secção de bioquímica e imunologia, autoimunidade, radioimunoensaio ou, no caso em que os testes pedidos não eram efetuados no laboratório, o soro foi separado e enviado para os laboratórios externos. Nos dias em que as análises solicitadas não foram efetuadas, foram separadas alíquotas de soro e congeladas entre -18°C e -25°C.

Quanto à triagem das amostras destinadas à secção de hematologia, em primeiro lugar, as amostras em tubo de citrato de sódio foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm. Depois, foi dada a entrada de colheitas no programa eDeiaLab (Slice, Lda., Portugal), procedendo-se à sua separação consoante o tipo de análise solicitado. As amostras em *EDTA K₃* foram separadas mediante a requisição de hemograma, pesquisa de hemoglobinopatias, hemoglobina glicosilada, velocidade de sedimentação eritrocitária, grupo sanguíneo, reação de *Coombs* direta ou pesquisa de anticorpos irregulares. Nos casos em que análise solicitada era realizada noutra secção do

laboratório, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C (biologia molecular) ou centrifugadas (10 minutos a 4000 rpm) para separação de alíquotas de plasma (bioquímica e imunologia, autoimunidade e radioimunoensaio). Nestes casos, quando a análise solicitada não se realizava no próprio dia, as alíquotas foram congeladas entre -18°C e -25°C. Relativamente às amostras anticoaguladas com citrato de sódio, estas destinavam-se aos ensaios de hemostase (tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de protrombina, determinação de d-dímeros e de fibrinogénio) e, sempre que as análises solicitadas não foram realizadas no próprio dia, separaram-se e congelaram-se (entre -18°C e -25°C) as alíquotas de plasma. Independentemente da amostra (anticoagulada com *EDTA K₃* ou com citrato de sódio), sempre que as análises pedidas não eram realizadas no laboratório, foram enviadas alíquotas de plasma ou de sangue total para os laboratórios externos.

Na etapa da triagem é importante ter atenção à qualidade das amostras, tendo o cuidado de verificar se a amostra é adequada para a realização das análises solicitadas. Durante o estágio, na presença de amostras que não se encontrassem em condições de serem processadas (ex.: hemólise, amostra insuficiente, presença de coágulo ou colheita efetuada para um tubo incorreto) foi efetuado o pedido para repetição de colheita.

No Labocentro, após o atendimento dos utentes e da colheita, identificação, transporte e triagem das amostras biológicas na fase pré-analítica, as amostras são encaminhadas para as diversas secções do laboratório, de modo a serem processadas durante a fase analítica do processo laboratorial.

4. Fase analítica

Na fase analítica do processo laboratorial é realizado o processamento das amostras biológicas. Esta etapa é maioritariamente automatizada, contudo, é necessária a intervenção humana para garantir o funcionamento dos equipamentos e realizar a verificação de reagentes e consumíveis, a calibração, o controlo de qualidade e a validação técnica dos resultados. Os valores de referência de cada parâmetro são tidos em consideração na etapa de validação dos resultados, contudo, estes valores não serão indicados no relatório, uma vez que dependem de diversos fatores e do parâmetro em questão. De seguida, é feita uma descrição dos procedimentos realizados na fase analítica das secções de hematologia e de imunologia no Labocentro.

4.1. Área de Imunologia

No Labocentro, os serviços de imunologia e de bioquímica situam-se na mesma secção, constituindo o *core* laboratorial. Contudo, neste relatório, apenas serão abordados os parâmetros que foram avaliados através de ensaios imunológicos.

As moléculas avaliadas durante o período de estágio enquadram-se nas seguintes áreas: serologia infecciosa, endocrinologia, alergologia, marcadores tumorais, doenças autoimunes, marcadores de doença cardiovascular e marcadores de anemia. Na serologia infecciosa avaliou-se a resposta do hospedeiro a diversos agentes patogénicos, através da determinação qualitativa e/ou quantitativa de anticorpos e antigénios, contribuindo para o diagnóstico e monitorização de doenças associadas ao sistema imunitário. Na endocrinologia foram determinados parâmetros associados à avaliação da função tiroideia e paratiroideia, às hormonas de fertilidade, hormonas de função adrenal, hormonas gastrointestinais e ao rastreio pré-natal. Na alergologia foram avaliadas as imunoglobulinas específicas envolvidas nas reações alérgicas, auxiliando a identificação do(s) alérgeno(s) para o(s) qual(uais) o utente se encontra sensibilizado. Na determinação de marcadores tumorais foram analisadas moléculas produzidas pelas células neoplásicas ou pela resposta do organismo ao tumor, auxiliando o diagnóstico e a monitorização de alguns tipos de neoplasias. Na área das doenças autoimunes apenas foi avaliado um parâmetro associado à artrite reumatoide. No doseamento de marcadores de doença cardiovascular foram analisados parâmetros associados a distúrbios que afetam o coração ou os vasos sanguíneos. Por último, na determinação de marcadores de anemia realizou-se o doseamento de moléculas essenciais à hematopoiese, cuja deficiência é comumente observada em situações de anemia.

A principal amostra utilizada nesta secção foi o soro, sendo também processadas amostras de plasma e de urina. Estas amostras foram analisadas essencialmente em 2 equipamentos, no *Alinity ci-series* (Abbott, Estados Unidos) e no *Immulite® 2000* (Siemens Healthineers, Alemanha). Para além disso, também se efetuaram ensaios rápidos de imunocromatografia para a deteção qualitativa da gonadotrofina coriónica humana (hCG) em amostras de urina e testes respiratórios não invasivos com ureia marcada com ^{14}C para diagnóstico de infeção do trato gastrointestinal por *Helicobacter pylori*.

No laboratório, as amostras foram arquivadas entre 2°C e 8°C. As amostras com resultados reativos na serologia infecciosa e/ou provenientes de grávidas foram armazenadas numa seroteca. A seroteca consiste no armazenamento das amostras de soro, possibilitando, sempre que necessário, a confirmação de resultados e/ou o estudo da evolução patológica de determinadas doenças. Nesse sentido, foi separada uma alíquota de soro e congelada (entre -18°C e -25°C). À exceção das amostras da seroteca que são armazenadas durante 1 ano, as restantes foram eliminadas após 10 dias, desde que as análises estivessem completas.

Durante o período de estágio, as tarefas realizadas diariamente enquanto estagiária na área de imunologia foram as seguintes: ligar os equipamentos *Alinity ci-series* e *Immulite® 2000* e efetuar a sua manutenção, a verificação de reagentes e consumíveis, a calibração e o controlo de qualidade, o processamento das amostras arquivadas para realização das análises em falta, a seroteca, a triagem das amostras colhidas no Labocentro e das amostras que chegam dos postos de colheita após o soro ser obtido por centrifugação, o processamento dessas amostras, incluindo a realização do teste respiratório com ureia marcada com ^{14}C para determinação de infeção por *H. pylori* e a deteção qualitativa de hCG em amostras de urina e o arquivo das amostras entre 2°C e 8°C, de acordo com a Figura 4.1.

De seguida, é abordado o funcionamento de cada equipamento, as diferentes áreas em estudo, a relevância clínica de cada parâmetro avaliado e o seu princípio de deteção.

4.1.1. Sistema *Alinity ci-series*

A maioria das amostras analisadas durante o período de estágio foi processada no equipamento *Alinity ci-series*. Este dispositivo automatizado integra os ensaios de química clínica e de imunologia, sendo que apenas os segundos serão abordados neste relatório. No Labocentro existem 2 destes equipamentos destinados à determinação de parâmetros distintos. Ambos têm capacidade para 300 amostras e 117 reagentes,

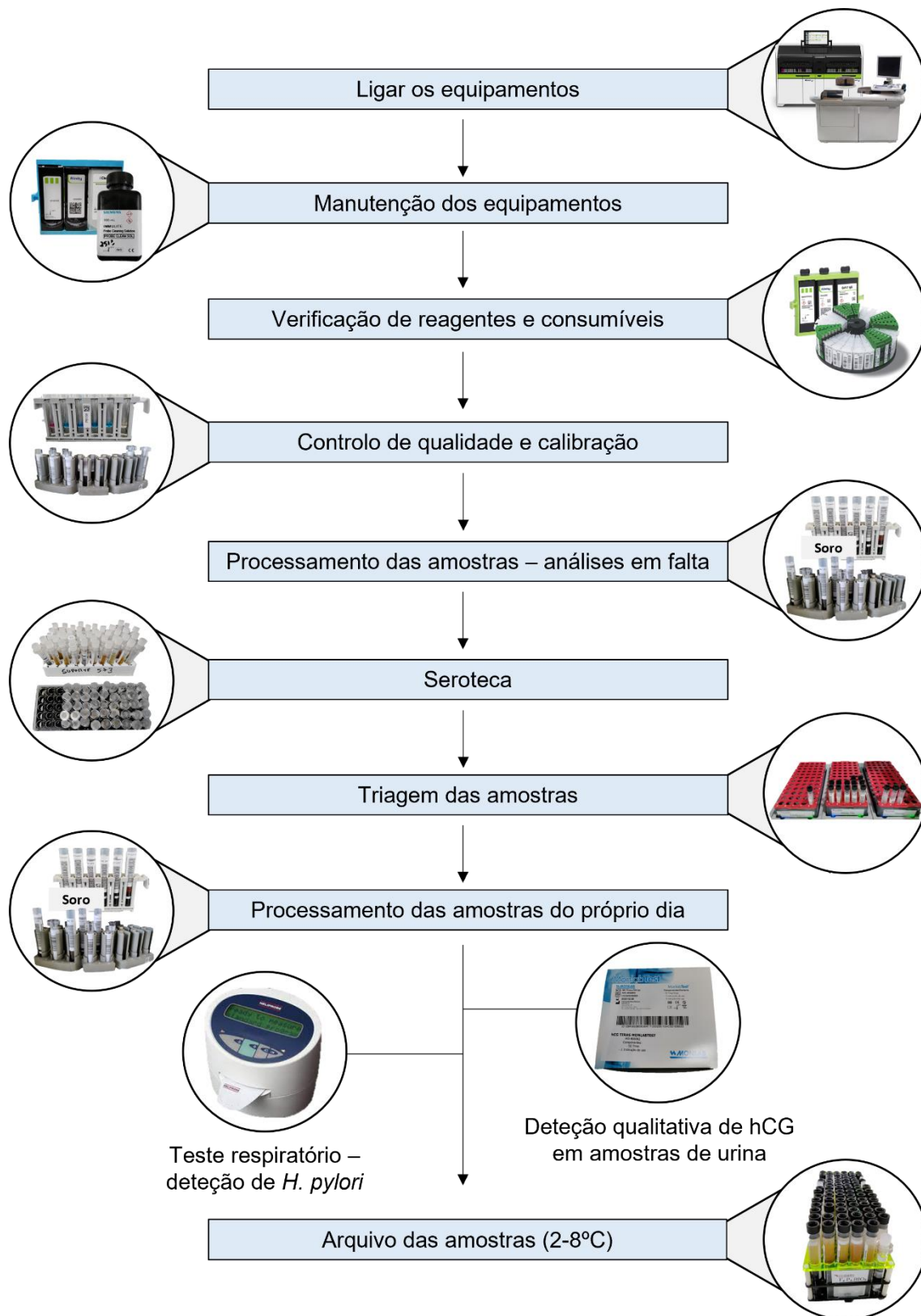


Figura 4.1: Atividades realizadas diariamente na secção de imunologia do Labocentro. De manhã, foi efetuada a manutenção dos equipamentos *Alinity ci-series* e *Immulite® 2000*, a verificação de reagentes e consumíveis, o controlo de qualidade e calibração e o processamento das amostras com análises em falta. À tarde, as amostras colhidas no próprio dia foram triadas e processadas. Quando solicitado, realizou-se o teste respiratório para determinação de infeção por *H. pylori* e a deteção de *hCG* em amostras de urina. Ao final do dia, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C. Figura do autor.

apresentando um rendimento máximo de até 1550 testes/hora⁶.

Durante o estágio, após a manutenção diária, foi feita a verificação de reagentes e consumíveis. No geral, os reagentes foram armazenados entre 2°C e 8°C, contudo, dentro do equipamento, apenas apresentavam 30 dias de estabilidade. Para efetuar a calibração e o controlo de qualidade utilizaram-se controlos e calibradores individuais, multicalibradores ou multicontrolos, de acordo com os parâmetros em questão. Dependendo do parâmetro, a análise foi realizada todos os dias; às segundas, quartas e sextas-feiras; às terças e quintas-feiras; ou apenas consoante a data de saída, como descrito na Tabela Suplementar 1.

A metodologia utilizada para determinação dos parâmetros imunológicos avaliados foi o imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (*CMIA*) de 1 passo ou de 2 passos, que utiliza uma fase sólida composta por micropartículas paramagnéticas revestidas com moléculas de ligação ao parâmetro a detetar⁷. No **imunoensaio de 1 passo**, a amostra, as micropartículas e a molécula conjugada a acridina são incubadas criando uma mistura de reação⁷. Após a lavagem, adicionam-se as soluções pré-ativadora e ativadora e a reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (*RLUs*)⁷. No **imunoensaio de 2 passos** existe um 1º passo de incubação da amostra com as micropartículas e, caso o parâmetro a detetar esteja presente na amostra, liga-se às moléculas que as revestem⁷. Após a lavagem, no 2º passo, é adicionada a molécula conjugada a acridina, seguindo-se, posteriormente, a adição das soluções pré-ativadora e ativadora⁷. A reação quimioluminescente é medida em *RLUs*, de acordo com as instruções do fabricante (Abbott, Estados Unidos)⁷.

Independentemente da metodologia utilizada, a relação entre a quantidade de molécula detetada na amostra e os *RLUs* detetados pelo sistema ótico *Alinity i* poderá ser direta ou indireta, dependendo do parâmetro⁷. Nos ensaios qualitativos, a presença ou ausência da molécula em estudo na amostra é determinada por comparação do sinal quimioluminescente com o *cutoff*. O *cutoff* é definido pela entidade que desenvolveu e comercializa o ensaio e diz respeito ao valor que separa um resultado positivo/reactivo de um resultado negativo/não reativo. O resultado obtido é calculado automaticamente da seguinte maneira: $\text{resultado} = \text{RLU}_{\text{amostra}} / \text{RLU}_{\text{cutoff}}$. No caso dos ensaios quantitativos, o tipo de ensaio, a amostra utilizada, as unidades, a sensibilidade do ensaio, as condições de armazenamento das amostras e o valor acima do qual se recomenda a diluição da amostra encontram-se indicados na Tabela Suplementar 2, segundo as instruções do fabricante (Abbott, Estados Unidos). No caso dos ensaios qualitativos, o tipo de ensaio, a interpretação de resultados e as condições de armazenamento das

amostras encontram-se na Tabela Suplementar 3, de acordo com as instruções do fabricante (Abbott, Estados Unidos).

4.1.2. Sistema *Immulite*[®] 2000

O sistema de imunoensaio *Immulite*[®] 2000 é um equipamento automatizado utilizado, no Labocentro, para a determinação de parâmetros na área da endocrinologia e alergologia recorrendo a quimioluminescência. O equipamento é ligado à terça-feira e à sexta-feira.

O imunoensaio utiliza uma fase sólida composta por esferas de poliestireno revestidas com anticorpos e pode ser do tipo *sandwich* ou competitivo⁸. No **imunoensaio do tipo *sandwich***, a amostra é incubada com as esferas revestidas e, caso o parâmetro a detetar esteja presente na amostra, liga-se aos anticorpos⁸. Após a lavagem, é adicionado o anticorpo conjugado a fosfatase alcalina, seguindo-se outro período de incubação⁸. Posteriormente, é adicionado o substrato quimioluminescente e o sinal obtido é diretamente proporcional à quantidade de molécula presente na amostra⁸. No **imunoensaio competitivo**, a amostra é incubada, num só passo, com as esferas revestidas e com o antigénio conjugado a fosfatase alcalina⁸. A molécula a detetar presente na amostra compete com o antigénio conjugado à enzima, pela ligação aos anticorpos nas esferas. Após a adição do substrato, o sinal quimioluminescente é inversamente proporcional à quantidade de molécula na amostra⁸. As principais características destes ensaios encontram-se na Tabela Suplementar 4, de acordo com as instruções do fabricante (Siemens Healthineers, Alemanha).

4.1.3. Parâmetros imunológicos analisados

4.1.3.1. Serologia infecciosa

As moléculas avaliadas nesta área, durante o período de estágio, encontram-se na Tabela 4.1. Segue-se uma breve explicação sobre cada doença em estudo, bem como os respetivos parâmetros analisados e o princípio do teste de deteção de cada um. É necessário ter em atenção que, em Portugal, as seguintes doenças são de declaração obrigatória: Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Infeção pelo SARS-CoV-2, Rubéola, Rubéola Congénita, Sífilis, Sífilis Congénita, Toxoplasmose Congénita e Infeção pelo VIH, pelo que os casos reativos foram reportados⁹.

Hepatite A

A hepatite A é uma doença infecciosa do fígado causada pelo vírus da hepatite A (*HAV*). Na maioria dos casos, ocorre de forma ligeira, podendo manifestar-se de forma assintomática. O *HAV*, identificado em 1973¹⁰, replica-se principalmente nos hepatócitos e é eliminado nas fezes¹¹. Desta forma, a sua transmissão ocorre, sobretudo, pela via oral-fecal através do consumo de água ou alimentos contaminados, sendo o risco de transmissão superior nos países em desenvolvimento^{11,12}. A prevenção da infeção passa pela vacinação e adoção de boas práticas de saneamento e higiene^{12,13}.

Clinicamente, a hepatite A pode ser indistinguível das infeções pelos vírus da hepatite B ou C, pelo que o diagnóstico é obtido com recurso aos testes serológicos¹³. A deteção de anticorpos IgM contra as proteínas da cápside do *HAV* (anti-*HAV* IgM), detetáveis entre 5 e 10 dias antes do início dos sintomas e indetetáveis até 6 meses após a infeção, permite confirmar o diagnóstico de infeção aguda¹³. Já os anticorpos IgG (anti-*HAV* IgG) aparecem no decurso da infeção e permanecem detetáveis ao longo da vida¹³.

Determinação qualitativa de anti-*HAV* IgG e anti-*HAV* IgM no soro e plasma: As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo os imunoensaios de 2 passos *Alinity i HAVAb IgG* (G74582R04, Abbott, Estados Unidos) e *Alinity i HAVAb IgM* (G74583R05, Abbott, Estados Unidos), através de tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Hepatite B

A hepatite B é uma infeção do fígado causada pelo vírus da hepatite B (*HBV*). Inicialmente, os sintomas são leves, agravando-se com o decurso da doença até progredir, em alguns casos, para um estado crónico¹⁴. A transmissão viral ocorre através do contacto com fluidos corporais (sangue, sémen, secreções vaginais, saliva) infetados ou a partir da transmissão perinatal do *HBV* da mãe para o filho¹⁴. A vacina contra a hepatite B é a principal forma de prevenção desta doença e, em Portugal, faz parte do programa nacional de vacinação¹⁵.

Os testes serológicos servem de auxílio ao diagnóstico, existindo 6 marcadores comumente avaliados: o antigénio de superfície da hepatite B (*HBsAg*), os anticorpos contra o *HbsAg* (anti-*HBs*), o antigénio e do vírus da hepatite B (*HBeAg*), os anticorpos contra o *HBeAg* (anti-*HBe*) e os anticorpos contra o antigénio *core* do vírus da hepatite B (anti-*HBc* e anti-*HBc* IgM)¹⁶. O *HBsAg*, responsável pela ligação do vírus aos hepatócitos, é a estrutura alvo dos anticorpos neutralizantes e é o primeiro a ser detetado, indicando uma infeção aguda¹⁴. A deteção deste parâmetro por um período superior a 6 meses após a infeção sugere uma doença crónica^{14,16}. Já a deteção de anti-*HBs* indica a recuperação de uma infeção ou imunidade por vacinação. Com a

destruição imunomediada da nucleocápside viral, é exposto o *HBeAg*¹⁴. A sua presença indica replicação viral ativa e um elevado risco de transmissão, contudo, a deteção por um período superior a 3 meses após a infeção sugere a progressão para doença crónica¹⁶. Já a sua ausência pode indicar uma infeção aguda ou convalescença precoces, distinguidas através do ensaio de deteção de anti-HBe. No período entre o desaparecimento de *HBsAg* e o aparecimento de anti-HBs, o único marcador positivo é o anti-HBc IgM, normalmente detetável entre 4-6 meses¹⁶. Ao longo da infeção, os anti-HBc IgM vão sendo substituídos pelos anticorpos IgG, detetados no ensaio anti-HBc¹⁶.

Determinação quantitativa de anti-HBs no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Anti-HBs* (G74612R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio de 2 passos que utiliza tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-B; Tabela Suplementar 5).

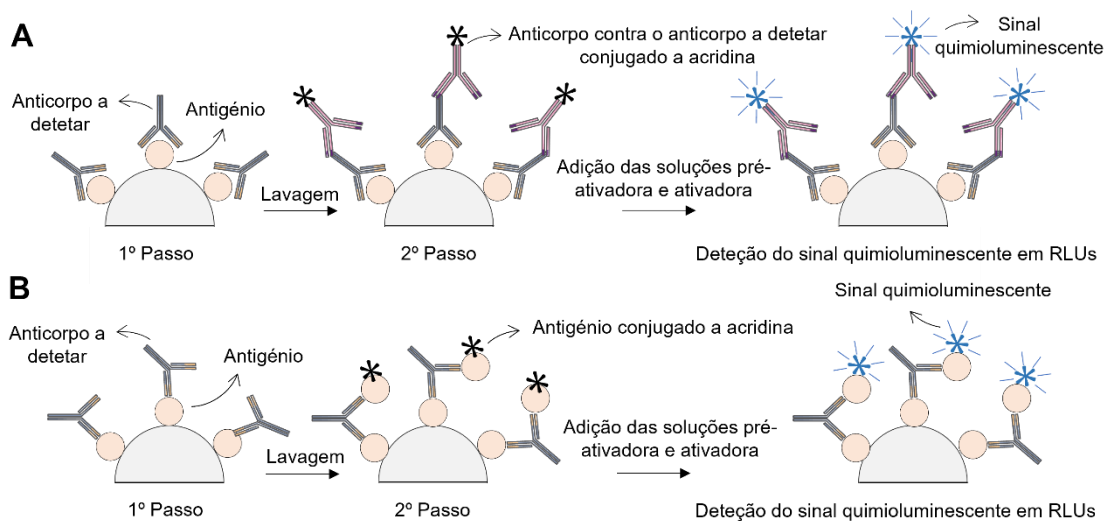


Figura 4.2: Deteção de anticorpos através de um imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação direta. No 1º passo, os anticorpos presentes na amostra ligam-se aos antígenos nas micropartículas paramagnéticas. No 2º passo é adicionado anticorpo (A) ou antígeno (B) conjugado a acridina, que se liga ao complexo formado. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora, existe uma relação direta entre a quantidade de anticorpo na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

Determinação qualitativa de *HBsAg* no soro e plasma: Realizou-se segundo o *Alinity i HBsAg Qualitative II* (G74585R05, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 1 passo (Figura 4.3; Tabela Suplementar 6). Perante amostras repetidamente reativas, realizou-se o *Alinity i HBsAg Qualitative II Confirmatory* (G74580R03, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7), que deteta *HBsAg* no soro e plasma por neutralização por anticorpos específicos.

Determinação qualitativa de anti-HBc IgM e anti-HBc no soro e plasma: As determinações realizaram-se, respetivamente, segundo o *Alinity i Anti-HBc IgM* (G74462R05, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i Anti-HBc II* (G74484R04, Abbott,

Estados Unidos), ambos imunoenaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.2-A - ensaio anti-HBc; Tabela Suplementar 5). No ensaio anti-HBc IgM, o princípio de detecção encontra-se na Figura 4.2-B, mas as moléculas que revestem as micropartículas são anticorpos.

Determinação qualitativa de HBeAg no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i HBeAg* (G74577R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

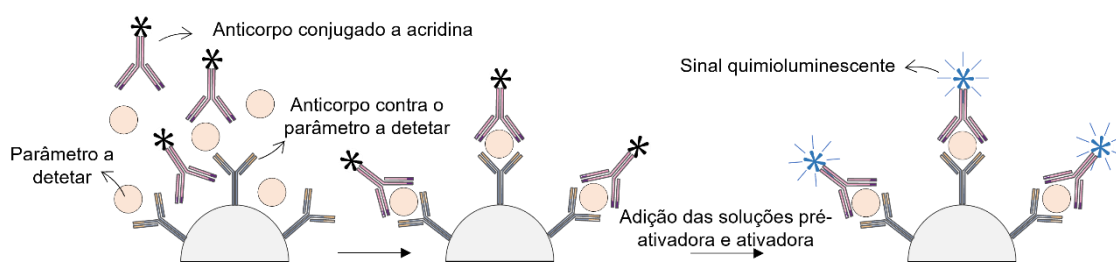


Figura 4.3: Imunoensaio *CMIA* de 1 passo por relação direta. A amostra é combinada com anticorpo conjugado a acridina e com as micropartículas revestidas com anticorpos contra a molécula a detetar. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora, existe uma relação direta entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

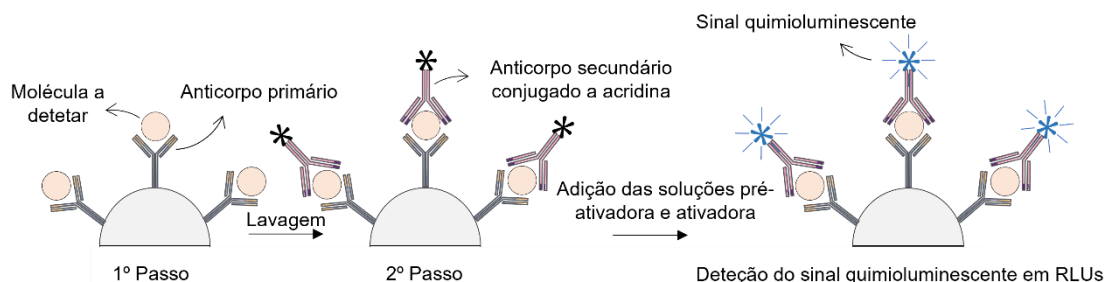


Figura 4.4: Detecção de parâmetros imunológicos (excluindo anticorpos) através de um imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação direta. No 1º passo, a molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos nas micropartículas. No 2º passo, o anticorpo secundário conjugado a acridina liga-se a esse complexo. Existe uma relação direta entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

Determinação qualitativa de anti-HBe no soro e plasma: Foi realizada de acordo com o *Alinity i Anti-HBe* (G74461R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio competitivo *CMIA* de 2 passos (Tabela Suplementar 8). O princípio de ensaio encontra-se na Figura 4.4, contudo, a molécula a detetar não se encontra na amostra, mas sim no reagente neutralizante. Desta forma, existe uma relação inversa entre a quantidade de anti-HBe na amostra e os *RLUs* detetados.

Hepatite C

A hepatite C é uma infeção do fígado provocada pelo vírus da hepatite C (*HCV*). Cerca de 80% a 85% dos indivíduos infetados evolui para um estado de hepatite crónica e, conseqüentemente, de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular^{17,18}. A transmissão viral

ocorre principalmente por via sanguínea e, menos frequentemente, por contacto sexual¹⁷. O diagnóstico da doença consiste em ensaios de deteção de anticorpos contra o HCV (anti-HCV) e de RNA viral¹⁷. Atualmente, a vacinação ainda não está disponível, mas o aparecimento dos antivirais de ação direta, em 2011, veio revolucionar o tratamento, permitindo a erradicação da infeção de forma permanente^{17,18}.

Determinação qualitativa de anti-HCV no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Anti-HCV* (H07801R03, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio CMIA de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH)

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) pode ser de 2 tipos: VIH-1 e VIH-2, sendo o primeiro o mais prevalente e patogénico¹⁹. O vírus infeta principalmente os linfócitos T CD4⁺, mas também os monócitos, macrófagos e células dendríticas, comprometendo o sistema imunitário do hospedeiro¹⁹. A longo prazo, a infeção leva a imunodeficiência e inflamação crónica, contribuindo para a ocorrência da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)¹⁹. A transmissão viral ocorre através do contacto com fluidos corporais infetados devido essencialmente a práticas sexuais desprotegidas, partilha de agulhas/seringas e transmissão da mãe para o filho. Segundo as *European guidelines for HIV testing*, é recomendado realizar ensaios de deteção simultânea do antigénio p24 e de anticorpos IgM e IgG contra o VIH-1 e VIH-2 (anti-VIH-1/2)²⁰. Os resultados positivos devem ser confirmados por um ensaio que permita a distinção entre infeções por VIH-1 e/ou VIH-2²⁰. O tratamento atual consiste na terapia antirretroviral, contudo não é uma cura, pois apesar de inibir o ciclo de vida viral, não elimina o ácido desoxirribonucleico (DNA) proviral e, por isso, o vírus permanece em estado latente.

Determinação qualitativa do antigénio p24 do VIH e de anticorpos anti-VIH-1/2 no soro e plasma: Baseou-se no imunoensaio CMIA de 2 passos (Figuras 4.2-B e 4.4; Tabela Suplementar 5) *Alinity i HIV Ag/Ab Combo* (G74460R05, Abbott, Estados Unidos). Perante amostras repetidamente reativas, realizou-se o *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay* (72460, Bio-Rad, Estados Unidos), um ensaio imunocromatográfico que permite confirmar a infeção e distinguir entre a presença de anti-VIH-1 e anti-VIH-2 em amostras de sangue total, soro ou plasma²¹. O teste utiliza uma membrana de nitrocelulose com uma fase estacionária constituída por antigénios do VIH-1 (p31, gp160, p24, gp41) e VIH-2 (gp36, gp140) na área de teste e pela proteína A na linha de controlo (Figura 4.5-A)²¹. A fase móvel é composta pela proteína A conjugada a partículas coloidais de ouro²¹. Na realização do ensaio, a amostra é aplicada na área

“amostra + tampão” e, após a migração até à área de teste, é colocado tampão adicional na região “tampão”, de modo a facilitar o fluxo lateral²¹. A proteína A conjugada liga-se às imunoglobulinas IgG na amostra que, caso sejam contra o VIH, reagem com os antígenos imobilizados na linha de teste, formando uma banda colorida (Figura 4.5-B)²¹. Na ausência de anti-VIH na amostra, esta linha não aparecerá (Figura 4.5-C)²¹. O conjugado ligado a imunoglobulinas IgG (exceto IgG anti-VIH) continua a migrar ao longo da membrana até reagir com a proteína A na linha de controlo, formando uma banda que deverá estar sempre presente, indicando que a aplicação e migração do reagente e da amostra foram corretas²¹. Os resultados devem ser lidos entre 20 e 30 minutos, sendo possível obter: 2 bandas na região VIH-2 (positivo para anti-VIH-2), 2 ou mais bandas na região VIH-1, sendo pelo menos 1 delas na região gp160 ou gp41 (positivo para anti-VIH-1), ausência de bandas (negativo) ou ausência da linha de controlo (inválido)²¹. Qualquer outro resultado é indeterminado²¹.

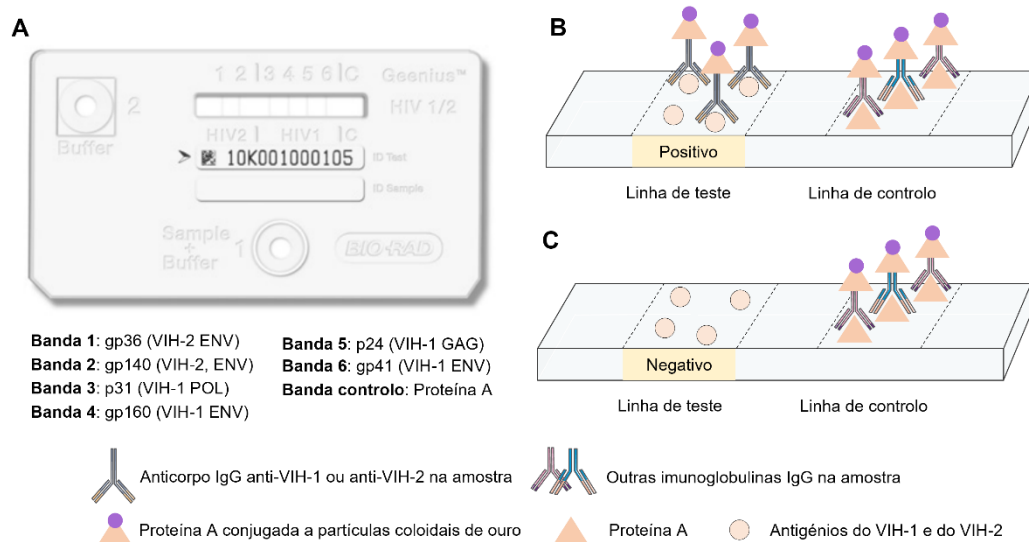


Figura 4.5: A: Detecção qualitativa de anticorpos anti-VIH-1 e anti-VIH-2 por imunocromatografia. A membrana contém antígenos do VIH na área de teste (bandas 1 a 6) e a proteína A na linha de controlo. A proteína A conjugada liga-se às imunoglobulinas IgG presentes na amostra. Se estas forem anti-VIH, reagem contra os antígenos imobilizados na área de teste, formando uma linha colorida. O conjugado ligado a imunoglobulinas IgG (excepto IgG anti-VIH) continuará a migrar ao longo da membrana até reagir com a proteína A na linha de controlo. **B:** Resultado positivo. **C:** Resultado negativo. Adaptado de *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*²¹.

Sífilis

A sífilis é uma infeção causada pela bactéria *Treponema pallidum*. A transmissão pode ocorrer através de contacto sexual ou pela via transplacentária, originando sífilis congénita²². A sífilis apresenta 3 fases: primária, secundária e terciária, havendo um período de latência entre elas, caracterizado pela ausência de manifestações clínicas, mas testes serológicos positivos²².

O diagnóstico baseia-se em microscopia de campo escuro para observação da bactéria e ensaios de deteção de anticorpos contra *T. pallidum* (anti-TP)²². Estes ensaios classificam-se em não treponémicos e treponémicos. Os testes não treponémicos detetam anticorpos inespecíficos, enquanto os testes treponémicos detetam anticorpos específicos contra o *T. pallidum*²². No Labocentro, sempre que é solicitado um ensaio não treponémico, em primeiro lugar, é realizado o ensaio treponémico de deteção de anticorpos contra o *T. pallidum* por metodologia CMIA. Caso o resultado seja reativo procede-se à realização do ensaio não treponémico.

Determinação qualitativa de anti-TP no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Syphilis TP* (G74507R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio CMIA de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Rubéola

A Rubéola é uma infeção viral, geralmente, leve e autolimitada causada pelo vírus da Rubéola. A transmissão pós-natal ocorre através do contacto com secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas, sendo mais frequente em crianças e jovens adultos²³. Neste caso, a infeção manifesta-se de forma assintomática em cerca de 25% a 50% dos doentes e, na presença de sintomas, é comum existir febre, linfadenopatia e erupção cutânea²³. O vírus pode ainda ser transmitido por via transplacentária, sendo que o risco de defeitos congénitos varia consoante a idade gestacional. A infeção nas primeiras 10 semanas da gravidez pode resultar na síndrome da rubéola congénita, levando a aborto espontâneo, morte fetal ou defeitos congénitos graves²³.

O diagnóstico é obtido através da deteção de anticorpos IgM (anti-Rubéola IgM) e IgG (anti-Rubéola IgG) anti-vírus da Rubéola. Os primeiros são normalmente detetáveis cerca de 4 dias após o início da erupção cutânea, indicando uma infeção aguda²³. Num caso de reinfeção, verifica-se um aumento de cerca de 4 vezes no título de anticorpos IgG²³. A determinação de anti-Rubéola IgG deve ser realizada sempre que uma pessoa grávida for exposta a um caso suspeito de Rubéola²³. Caso o resultado seja reativo, é provável que a pessoa esteja imune e possa ser tranquilizada, contudo, perante um ensaio não reativo, deverá testar-se para anti-Rubéola IgM e IgG num período de 3 semanas para excluir uma infeção primária²³. Em Portugal, a vacina faz parte do programa nacional de vacinação e é a principal forma de prevenção da doença¹⁵.

Determinação qualitativa e quantitativa de anti-Rubéola IgG no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Rubella IgG* (G74591R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio CMIA de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Determinação qualitativa de anti-Rubéola IgM no soro e plasma: Baseou-se no imunoensaio *CMIA Alinity i Rubella IgM* (G74581R04, Abbott, Estados Unidos) de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório. Normalmente, a doença manifesta-se de forma assintomática, contudo, alguns dos sintomas mais comuns são: mal-estar, febre, dores musculares, aumento dos gânglios linfáticos e hepatoesplenomegalia. A transmissão ocorre através da ingestão de alimentos crus ou mal cozinhados contaminados com a forma inativa do protozoário (oocistos), por contacto com terra contaminada, pela via transplacentária, transplante de órgãos ou transfusão sanguínea²⁴. Os oocistos são produzidos no hospedeiro definitivo (família *Felidae*), sendo eliminados nas suas fezes²⁴. Se ingeridos, desenvolvem-se em taquizoítos, que se multiplicam e destroem as células do hospedeiro. Nos tecidos, convertem-se em bradizoítos, que se estabelecem na forma de cistos, permanecendo na forma latente²⁴. Quando os cistos são ingeridos através de carne crua ou mal cozinhada, os bradizoítos são convertidos a taquizoítos, continuando o ciclo de vida deste protozoário²⁴.

Os testes serológicos de deteção de anticorpos IgM (anti-Toxo IgM) e/ou IgG (anti-Toxo IgG) contra *T. gondii* são a primeira abordagem para identificar esta infecção. Os anti-Toxo IgM são detetados em caso de infecção recente, mas podem persistir até 18 meses após a infecção²⁵. A presença de anti-Toxo IgG indica que a infecção ocorreu, mas não distingue entre infecção recente ou uma recuperação. Para fazer essa distinção, deve-se testar a avidéz dos anticorpos anti-Toxo IgG. Um alto índice de avidéz é uma forte indicação de que a infecção ocorreu há mais de 4 meses, contudo, uma baixa avidéz não serve para o diagnóstico de infecção aguda²⁵.

Determinação qualitativa de anti-Toxo IgM no soro e plasma: Baseou-se no *Alinity i Toxo IgM* (G74584R07, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.6; Tabela Suplementar 5).

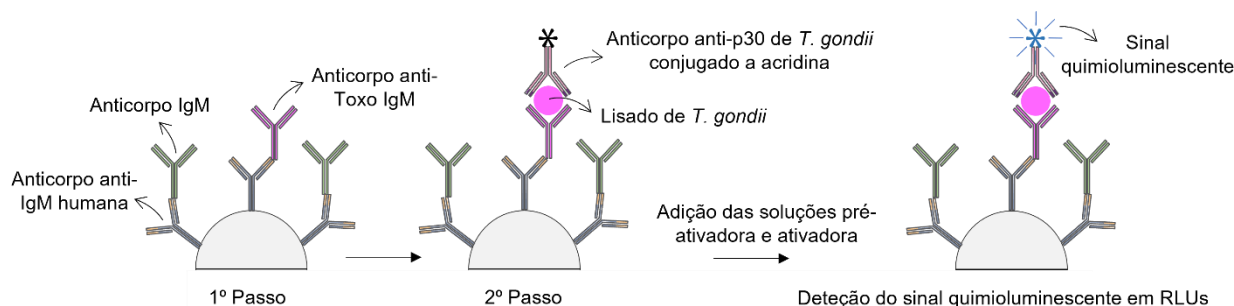


Figura 4.6: Imunoensaio *CMIA* de 2 passos para detecção de anti-Toxo IgM. No 1º passo, as imunoglobulinas IgM presentes na amostra ligam-se aos anticorpos anti-IgM humana que revestem as micropartículas. No 2º passo, o complexo anticorpo anti-p30 de *T. gondii* – lisado de *T. gondii* conjugado a acridina liga-se às imunoglobulinas anti-Toxo IgM. Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-Toxo IgM na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

Determinação quantitativa de anti-Toxo IgG no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Toxo IgG* (G74600R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio de 2 passos que utiliza tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Infeção por citomegalovírus

A infeção por citomegalovírus (CMV) é, geralmente, assintomática e autolimitada em indivíduos saudáveis, contudo, em hospedeiros imunocomprometidos e em caso de infeção congénita, pode ser fatal²⁶. Os bebés podem ser infetados através da via transplacentária, durante o parto ou por ingestão de leite materno infetado. Para além disso, a transmissão viral pode ocorrer por contacto com fluidos corporais infetados, transplante de órgãos ou transfusão sanguínea²⁶. Após a infeção, o CMV permanece em estado latente no hospedeiro, podendo haver reativação viral²⁶.

Os testes serológicos auxiliam o diagnóstico da infeção e baseiam-se na detecção de anticorpos IgM (anti-CMV IgM) e IgG (anti-CMV IgG) contra o CMV. O ensaio anti-CMV IgM é comumente utilizado como indicador de infeção primária, contudo, estes anticorpos podem ser detetados em caso de reinfeção ou reativação viral²⁷. Para distinguir entre infeção primária e recuperação, deve-se avaliar a avidéz de anticorpos anti-CMV IgG²⁷. Uma avidéz elevada indica uma infeção anterior²⁷. Um resultado anti-CMV IgM reativo, com um resultado de baixa avidéz anti-CMV IgG, é um forte indicador de infeção primária nos últimos 4 meses²⁷. Um aumento substancial de anti-CMV IgG com a presença de anti-CMV IgM, pode indicar uma infeção ativa.

Determinação qualitativa e semi-quantitativa de anti-CMV IgG no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i CMV IgG* (G74494R06, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Determinação qualitativa de anti-CMV IgM no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i CMV IgM* (G74493R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Infeção pelo vírus Epstein Barr

O vírus Epstein Barr (*EBV*) é o principal agente causador de mononucleose infecciosa, uma doença que afeta principalmente crianças e jovens²⁸. Nas crianças, a

infecção é normalmente assintomática. Ainda assim, algumas manifestações clínicas comuns são: linfadenopatia, cefaleia, mal-estar, febre e dor de garganta^{28,29}. A nível laboratorial, é comum observar linfocitose e linfócitos atípicos²⁹. A transmissão do *EBV* ocorre principalmente através do beijo, da tosse ou da partilha de alimentos²⁸. Após a transmissão, o vírus infeta as células epiteliais e os linfócitos B da orofaringe, começando a replicar-se e a disseminar para o resto do organismo^{28,29}. Como auxílio ao diagnóstico, realiza-se um teste de deteção de anticorpos heterófilos contra o *EBV*, designado *Monospot test*, juntamente com os ensaios de deteção de anticorpos IgM (anti-VCA IgM) e IgG (anti-VCA IgG) contra o antígeno da cápside do *EBV* (VCA)²⁸. A presença de anti-VCA IgM indica uma infecção aguda, enquanto a presença de anti-VCA IgG sugere uma infecção crónica ou uma recuperação²⁹.

Determinação qualitativa de anti-VCA IgG e anti-VCA IgM no soro e plasma: As determinações basearam-se, respetivamente, nos imunoensaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5) *Alinity i EBV VCA IgG* (G74678R04, Abbott, Estados Unidos) e *Alinity i EBV VCA IgM* (G74684R01, Abbott, Estados Unidos).

Infeção pelo vírus linfotrópico-T humano do tipo 1 (*HTLV-I*) e do tipo 2 (*HTLV-II*):

Atualmente, já foram identificados 4 tipos de vírus linfotrópicos-T humanos (*HTLV*): *HTLV-I*, *HTLV-II*, *HTLV-III* e *HTLV-IV*. O *HTLV-I* é clinicamente mais significativo, seguindo-se o *HTLV-II*³⁰. Estima-se que o *HTLV-I* infete entre 10 e 20 milhões de pessoas no mundo³⁰. Como estes vírus infetam os linfócitos T humanos, a transmissão ocorre a partir do contacto com linfócitos infetados, através de transmissão vertical da mãe para o filho, práticas sexuais desprotegidas e transfusões sanguíneas³⁰. Normalmente, a infecção inicial é assintomática, mas pode levar a um linfoma de células T do adulto (*ATLL*) ou a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao *HTLV-I* (*HAM/TSP*)³⁰. A *ATLL* caracteriza-se pela expansão clonal neoplásica de células T-CD4⁺ infetadas, enquanto a *HAM/TSP* é caracterizada por uma paraparesia lenta progressiva com espasticidade associada³⁰. O *HTLV-I* está ainda associado a doenças neurológicas, dermatológicas, oftalmológicas, reumatológicas e pulmonares³⁰. Os testes serológicos de deteção de anticorpos contra o *HTLV-I* e/ou *HTLV-II* servem de auxílio ao diagnóstico, contudo, apenas os ensaios de *polymerase chain reaction* (*PCR*) permitem quantificar a carga viral e distinguir entre uma infecção pelo *HTLV-I* ou *HTLV-II*³⁰.

Determinação qualitativa de anti-HTLV-I/II no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i rHTLV-I/II* (G74570R05, Abbott, Estados Unidos), um imunoenensaio de 2 passos que recorre a tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-B; Tabela Suplementar 5).

Doença do coronavírus (COVID-19)

A doença do coronavírus (COVID-19) é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2. Os primeiros casos foram descritos em dezembro de 2019, em Wuhan, China³¹. No dia 11 de março de 2020, a COVID-19 foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma pandemia³². A maioria dos indivíduos infetados desenvolve doença leve a moderada, recuperando sem necessidade de hospitalização. A transmissão ocorre essencialmente através da exposição a gotículas respiratórias que transportam o vírus³¹. A prevenção passa pela adoção de medidas de saúde pública (uso de máscara, etiqueta respiratória, distanciamento social, higienização frequente) e pela vacinação. A vacinação veio reduzir o risco de infeção por SARS-CoV-2 e a evolução para doença grave e morte por COVID-19. Os testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos representam o método de referência para o diagnóstico e rastreio da infeção por SARS-CoV-2³¹. Em Portugal, são ainda realizados testes rápidos de antigénio de uso profissional e em modalidade de autoteste, de modo a se obter um resultado rápido e se proceder à implementação das medidas necessárias. Para além disso, são realizados testes serológicos para avaliar a resposta imunológica à infeção. No Labocentro, realizam-se ensaios de deteção de anticorpos IgM contra a proteína *spike* do SARS-CoV-2 (anti-SARS-CoV-2 IgM), anticorpos IgG contra o domínio de ligação do recetor da subunidade S1 da proteína *spike* do SARS-CoV-2 (anti-*spike* SARS-CoV-2 IgG) e anticorpos IgG contra a proteína da nucleocápside do SARS-CoV-2 (anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG).

Determinação qualitativa de anti-SARS-CoV-2 IgM e anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG no soro e plasma: As determinações realizaram-se, respetivamente, segundo o *SARS-CoV-2 IgM* (H13155R03, Abbott, Estados Unidos) e o *SARS-CoV-2 IgG* (H08536R03, Abbott, Estados Unidos), ensaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Determinação qualitativa e quantitativa de anti-*spike* SARS-CoV-2 IgG no soro e plasma: Foi realizada segundo o imunoenensaio de 2 passos *SARS-CoV-2 IgG II Quant* (H13949R02, Abbott, Estados Unidos), que recorre a tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Infeção por *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma patologia de elevada prevalência causada por uma bactéria que cresce no trato gastrointestinal³³. A sua transmissão ocorre através do contacto direto com saliva, vômito ou matéria fecal³³. Geralmente, a doença é assintomática, contudo, pode dar origem a gastrite, úlceras pépticas e até mesmo a neoplasias malignas do estômago³³. O diagnóstico é realizado através de um teste respiratório de ureia marcada com ¹⁴C, da pesquisa de antigénio de *H. pylori* em amostras fecais ou através de endoscopia e biópsia³³. Os dois primeiros devem ser realizados para confirmação da erradicação da infecção, cerca de 4 semanas após o fim do tratamento.

Determinação qualitativa de infecção por *Helicobacter pylori*: Realizou-se no analisador *Heliprobe*[®] (Kibion AB, Suécia) através de um teste respiratório não invasivo com ureia marcada com ¹⁴C, que tem por base a produção de urease pela bactéria *H. pylori*. Esta enzima catalisa a hidrólise de ureia marcada com ¹⁴C em ¹⁴CO₂ e NH₃, sendo o ¹⁴CO₂ expelido no ar expirado, enquanto o NH₃ e a ureia marcada com ¹⁴C em excesso são excretados na urina³⁴. Em indivíduos saudáveis, na ausência de *H. pylori*, a ureia ¹⁴C não é hidrolisada e o ¹⁴CO₂ não é detetado no ar expirado, contrariamente ao que acontece em indivíduos infetados³⁴. O ensaio começa com a ingestão de uma cápsula *HeliCap* com ureia ¹⁴C (1 µCi). Após cerca de 10 minutos, o indivíduo deverá expirar para o *BreathCard*[™] *Heliprobe* para colheita da amostra e adsorção de CO₂ pelos filtros de reatividade. A expiração deverá ser realizada até o indicador mudar de cor laranja para amarela (1-4 minutos). De seguida, o *BreathCard* é analisado no sistema *Heliprobe*. Cada ciclo de medição tem uma duração de 250 segundos e baseia-se na medição da radiação β emitida pelo ¹⁴CO₂³⁴. Os resultados são expressos como: *Heliprobe* 0 (ausência de infecção), *Heliprobe* 1 (limiar de infecção) e *Heliprobe* 2 (presença de infecção)³⁴.

Tabela 4.1: Parâmetros detetados na área de serologia infecciosa do Labocentro e respetiva doença em estudo. Tabela do autor.

Doença	Parâmetro analisado
Hepatite A	Anti- <i>HAV</i> IgG Anti- <i>HAV</i> IgM
Hepatite B	<i>HBsAg</i> Anti- <i>HBs</i> Anti- <i>HBc</i> IgM Anti- <i>HBc</i> <i>HBeAg</i> Anti- <i>HBe</i>
Hepatite C	Anti- <i>HCV</i>
Sífilis	Anti-TP
Infeção pelo VIH	Antigénio p24 do VIH e anti-VIH-1/2
Rubéola	Anti-Rubéola IgG Anti-Rubéola IgM
Toxoplasmose	Anti-Toxo IgG Anti-Toxo IgM
Infeção por Citomegalovírus	Anti-CMV IgG Anti-CMV IgM
Infeção pelo <i>EBV</i>	Anti- <i>VCA</i> IgG Anti- <i>VCA</i> IgM
Infeção por <i>HTLV</i>	Anti- <i>HTLV-I/II</i>
COVID-19	Anti-SARS-CoV-2 IgM Anti- <i>spike</i> SARS-CoV-2 IgG Anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG
Infeção por <i>Helicobacter pylori</i>	¹⁴ CO ₂ no ar expirado

4.1.3.2. Endocrinologia

As moléculas avaliadas nesta área, durante o período de estágio, encontram-se na Tabela 4.2. Abaixo, encontra-se uma breve explicação sobre cada parâmetro em estudo e o seu princípio de deteção.

Avaliação da função tiroideia:

A tiroide é uma glândula endócrina responsável pela produção de triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), através de mecanismos de *feedback* negativo e positivo. Por um lado, perante a diminuição dos níveis sanguíneos destas hormonas, os neurónios do

hipotálamo secretam a hormona libertadora de tirotropina, que estimula as células trofóicas da pituitária anterior a secretarem a hormona estimulante da tiroide (*TSH*)³⁵. A *TSH* atua nas células foliculares da tiroide, estimulando a produção de T_3 e T_4 ^{36,37}. Por outro lado, níveis elevados de T_3 e T_4 levam à inibição da produção de *TSH*³⁷.

Na síntese de T_3 e T_4 , o iodeto que se encontra em circulação é captado para os foliculos da tiroide, onde está armazenada a tiroglobulina (*Tg*), uma proteína precursora^{35,38}. O iodeto é oxidado a iodo pela peroxidase da tiroide (*TPO*) e posteriormente ligado aos resíduos de tirosina da *Tg*, formando monoiodotirosina (*MIT*) e diiodotirosina (*DIT*)^{35,38}. A ligação de um *MIT* e um *DIT* origina T_3 , enquanto a ligação de dois *DIT* origina T_4 ^{35,38}. A T_3 e T_4 mantêm-se ligadas à *Tg* enquanto se encontram armazenadas no lúmen. Posteriormente, a *Tg* sofre uma degradação lisossomal, havendo a libertação de T_3 (20%) e T_4 (80%) para a corrente sanguínea, sendo que a T_4 em circulação pode ser convertida em T_3 através de um processo de desiodação^{35,38}. A concentração de T_3 e T_4 livre, ou seja, que não circula ligada a proteínas de transporte, é a que está fisiologicamente disponível e é biologicamente ativa. Estas hormonas entram nas células, ligando-se aos recetores no núcleo e contribuindo para a ativação de genes³⁵. Desta forma, regulam diversos processos bioquímicos, essenciais para a atividade metabólica e neurológica normal. Para além disto, têm ainda impacto no sistema cardiovascular, nos ossos, no trato gastrointestinal e no sistema reprodutivo^{35,38}.

Falhas na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-tiroide resultam na subprodução (hipotiroidismo) ou sobreprodução (hipertiroidismo) de T_3 e/ou T_4 . Falhas ao nível da tiroide originam doença primária, enquanto distúrbios hipofisários ou hipotalâmicos originam doença secundária ou terciária, respetivamente. Nos casos de hipotiroidismo primário detetam-se níveis elevados de *TSH*, contrariamente ao hipotiroidismo secundário, onde existe uma diminuição dos níveis desta molécula³⁷. Já no hipertiroidismo primário, os níveis de *TSH* são baixos ou indetetáveis, enquanto no secundário se encontram elevados³⁷. A produção inadequada de T_3 e T_4 pode ainda ter origem na deficiência de iodo, uma situação revertida pela adição do iodo à dieta³⁵.

As doenças autoimunes da tiroide são bastante frequentes na população, sendo comum detetarem-se anticorpos contra a peroxidase da tiroide (anti-*TPO*), anticorpos contra a tiroglobulina (anti-*Tg*) e anticorpos contra o recetor da *TSH* (anti-*TSHR*)³⁹. Ainda que os anti-*TPO* sejam mais comuns e maiores indicadores de doença da tiroide do que os anti-*Tg*, normalmente, detetam-se em conjunto³⁹. Relativamente aos anti-*TSHR*, estes podem estimular o recetor da *TSH*, aumentando a produção de hormonas da

tiroide, ou podem ter um efeito inibitório contribuindo para o hipotireoidismo³⁹. Os anticorpos anti-*TSHR* com efeito estimulador têm uma prevalência mais elevada³⁹.

Determinação quantitativa de *TSH* no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i TSH* (G74505R02, Abbott, Estados Unidos), um imunoenensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de T_3 total, T_3 livre, T_4 total e T_4 livre no soro e plasma: As determinações foram realizadas, respectivamente, segundo o *Alinity i Total T_3* (G74628R06, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i Free T_3* (G74623R04, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i Total T_4* (G74495R03, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i Free T_4* (G74438R03, Abbott, Estados Unidos), todos imunoenensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.7; Tabela Suplementar 8).

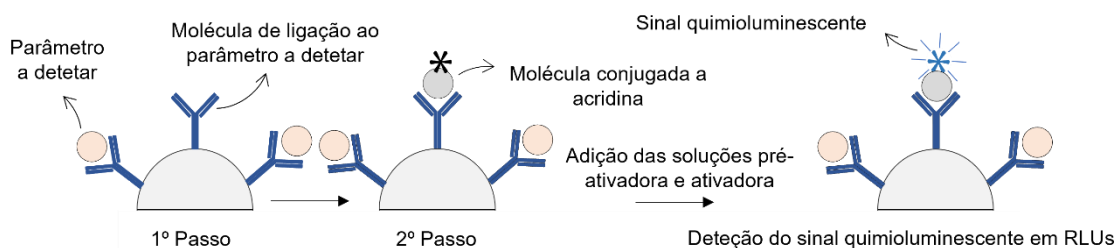


Figura 4.7: Imunoenensaio *CMIA* de 2 passos por relação inversa. No 1º passo, a amostra é combinada com as micropartículas revestidas com moléculas de ligação ao parâmetro a detetar. Caso este esteja presente na amostra, liga-se às micropartículas. No 2º passo, a molécula conjugada a acridina liga-se às moléculas disponíveis que revestem as micropartículas. Após a adição das soluções pré-ativadora e ativadora à mistura de reação, existe uma relação inversa entre a quantidade de antigénio na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

Determinação quantitativa de tiroglobulina no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Thyroglobulin* (H08530R01, Abbott, Estados Unidos), um imunoenensaio de 2 passos que usa tecnologia *CMIA* (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de anti-*TSHR* estimuladores da tiroide no soro ou plasma: Baseou-se no imunoenensaio quimioluminescente de 2 passos (Figura 4.8; Tabela Suplementar 9) *Immulite® 2000 TSI* (PIL2KTSI-12, Siemens Healthineers, Alemanha). Neste caso, a molécula conjugada a fosfatase alcalina é o recetor *hTSHR* quimera.

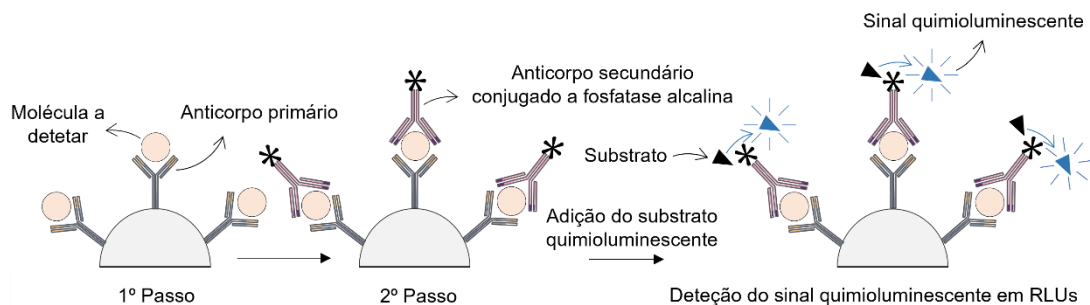


Figura 4.8: Detecção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulite*[®] 2000 através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo do tipo *sandwich* de 2 passos. No 1º passo, a molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos nas micropartículas. No 2º passo, o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina liga-se ao complexo formado. A reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor.

Determinação quantitativa de anti-TPO e anti-Tg no soro e plasma: Foram realizadas, respetivamente, segundo o *Alinity i Anti TPO* (G74659R03, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i Anti Tg* (G74658R04, Abbott, Estados Unidos), dois imunoensaios de 2 passos usam tecnologia *CMIA* (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

Avaliação da função paratiroide:

As glândulas paratiroides são responsáveis pela produção da hormona da paratiroide (*PTH*) em resposta à diminuição da concentração plasmática de Ca^{2+} . Enquanto a deficiência deste ião exerce um *feedback* positivo e estimula a secreção de *PTH*, o seu aumento inibe a produção dessa hormona⁴⁰. A *PTH* exerce várias ações que aumentam a concentração extracelular de Ca^{2+} , nomeadamente: estimula a reabsorção de Ca^{2+} nos rins, diminuindo a sua excreção na urina; estimula a reabsorção de osso pelos osteoclastos, com conseqüente libertação de Ca^{2+} para o fluido extracelular; e estimula a produção da forma ativa da vitamina D nos rins⁴⁰. A vitamina D (D_2 ou D_3) é metabolizada, em primeiro lugar, no fígado pela enzima 25-hidrolase, originando 25-hidroxitamina D, e depois nos rins pela enzima 1- α -hidroxilase, originando 1,25-dihidroxitamina D, a sua forma ativa⁴⁰. Este 2º passo está dependente da *PTH*, que estimula a atividade enzimática⁴⁰. Como a principal ação da 1,25-dihidroxitamina D é estimular a absorção de Ca^{2+} no intestino, uma deficiência em vitamina D resulta na diminuição da absorção de Ca^{2+} e, conseqüentemente, na diminuição da sua concentração no sangue⁴⁰.

A determinação de *PTH*, juntamente com os níveis séricos de Ca^{2+} , serve de auxílio ao diagnóstico de hipercalcemia (níveis elevados de Ca^{2+} no sangue), hipocalcemia (níveis baixos de Ca^{2+} no sangue) e distúrbios da paratiroide. A causa mais comum de hipercalcemia é o hiperparatiroidismo primário, normalmente devido a um adenoma numa das quatro glândulas paratiroides, mas também o excesso de ingestão de vitamina D pode contribuir para esta condição⁴⁰. Já a hipocalcemia pode ter origem na perda de função das glândulas paratiroides (hipoparatiroidismo primário) ou numa deficiência na absorção de vitamina D (hiperparatiroidismo secundário)⁴⁰.

Determinação quantitativa de PTH intacta no soro e plasma: Baseou-se no imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7) *Alinity i Intact PTH* (G84934R01, Abbott, Estados Unidos).

Determinação quantitativa de 25-hidroxivitamina D no soro e plasma: Baseou-se no imunoensaio *CMIA* de 1 passo (Figura 4.9; Tabela Suplementar 10) *Alinity i 25-OH Vitamin D* (G74483R02, Abbott, Estados Unidos).

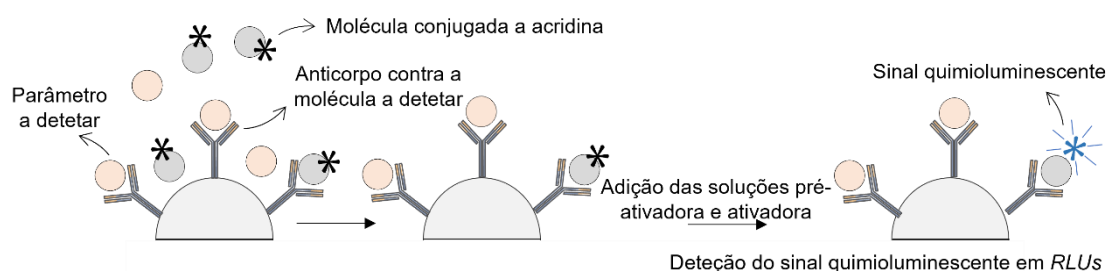


Figura 4.9: Imunoensaio *CMIA* de 1 passo por relação inversa. A molécula conjugada a acridina compete com a molécula na amostra pela ligação aos anticorpos que revestem as micropartículas. Existe uma relação inversa entre a quantidade de molécula na amostra e os *RLUs* detetados. Figura do autor.

Hormonas de fertilidade

A secreção das hormonas de fertilidade é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónada, sendo que a secreção da hormona libertadora de gonadotrofina (*GnRH*) pelo hipotálamo, estimula a secreção das hormonas folículo-estimulante (*FSH*) e luteinizante (*LH*) pela pituitária anterior⁴¹. Nas mulheres, estas duas hormonas estimulam o crescimento e maturação foliculares, contribuindo para a produção de estrogénios⁴¹. O estradiol é o estrogénio mais abundante durante a idade reprodutiva da mulher, sendo maioritariamente produzido nos ovários, na ausência de gravidez⁴². O aumento dos níveis de estrogénios durante a fase folicular exerce um efeito de *feedback* negativo na secreção de *FSH* e *LH*, contudo, na fase folicular tardia, o efeito começa a ser de *feedback* positivo, aumentando rapidamente os níveis destas hormonas e resultando no pico de *LH* que precede a ovulação⁴¹. Na ausência de fertilização, o corpo lúteo degenera e a produção de estrogénios e progesterona diminui, ocorrendo a menstruação. Em caso de fertilização, o trofoblasto inicia a secreção da gonadotrofina coriónica humana (*hCG*), impedindo a degeneração do corpo lúteo⁴¹. Desta forma, mantém-se a produção de estrogénios e progesterona, essenciais ao espessamento do endométrio para implantação do embrião. Após a formação da placenta, esta torna-se a principal produtora de estrogénios e progesterona e o corpo lúteo degenera⁴¹. Na menopausa, ou após ovariectomia, as concentrações de estrogénios atingem níveis

baixos, deixando de existir o *feedback* negativo na secreção de *LH* e *FSH*⁴¹. Assim, a concentração destas hormonas aumenta.

O aumento dos níveis séricos de β -*hCG* é um bom marcador de confirmação precoce e monitorização da gravidez. Ainda que apenas a *hCG* intacta tenha atividade biológica, as suas subunidades α e β podem apresentar-se na forma livre⁴³. A determinação de β -*hCG* livre serve de auxílio ao diagnóstico e monitorização de doenças trofoblásticas e de determinados tumores testiculares, nos quais os níveis de β -*hCG* livre comparativamente à *hCG* intacta são mais elevados⁴³.

Em resposta ao aumento de estrogénios, mas também ao *stress*, à amamentação e ao aumento da hormona libertadora de tirotropina, de oxitocina ou de neurotensina, é sintetizada prolactina, nos lactotrofos, na pituitária anterior^{44,45}. As principais funções desta molécula são o desenvolvimento das glândulas mamárias e o início e manutenção da lactação^{44,45}. Por um lado, o défice de prolactina pode comprometer a capacidade de lactação das mulheres⁴⁵. Por outro lado, a hiperprolactinemia pode causar infertilidade e ainda galactorreia em homens ou mulheres que não amamentam⁴⁵. Para além disso, também poderá ocorrer amenorreia nas mulheres⁴⁵. O aumento dos níveis de prolactina pode também estar relacionado com o uso de medicamentos antipsicóticos ou com a existência de neoplasias, como o prolactinoma⁴⁵.

Nos homens, a *LH* atua nas células de Leydig, aumentando a produção e secreção de testosterona, essencial ao desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários⁴¹. Esta molécula exerce um efeito de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a hipófise, diminuindo a secreção de *LH* e de *FSH*⁴¹. A *FSH* atua nas células de Sertoli, estimulando a espermatogénese⁴¹. A testosterona, tal como o estradiol, é transportada no sangue ligada à globulina de ligação da hormona sexual (*SHBG*) ou à albumina^{46,47}.

O doseamento das hormonas de fertilidade é essencial para a avaliação da infertilidade e para o diagnóstico de distúrbios hipofisários e gonadais. Uma deficiência de gonadotrofinas é, geralmente, uma indicação precoce de pan-hipopituitarismo, uma condição que se caracteriza pela ausência ou produção inadequada das hormonas produzidas pela pituitária anterior^{48,49}. Esta condição pode dever-se à ausência de resposta da hipófise ao *GnRH* ou à diminuição da secreção de *GnRH* pelo hipotálamo⁴⁸. Já o aumento da concentração dessas hormonas poderá estar associado ao desenvolvimento de tumores secretores de gonadotrofinas⁴⁹. Níveis elevados de *LH* e *FSH*, com concentrações baixas de hormonas esteroides gonadais são sugestivas de insuficiência gonadal⁴⁸. Em caso de distúrbios de ovulação, os níveis de progesterona são anormalmente baixos durante a fase luteínica⁵⁰. Uma concentração de progesterona

insuficiente para manter o desenvolvimento do endométrio está associada a infertilidade e aborto espontâneo⁵⁰. Níveis diminuídos de progesterona na presença de quantidades detetáveis de *hCG* sugerem a possibilidade de aborto ou de gravidez ectópica⁵⁰.

Determinação quantitativa de *hCG* no soro: Realizada segundo o imunoensaio quimioluminescente de 1 passo (Figura 4.10; Tabela Suplementar 9) *Immulite*[®] 2000 *HCG* (PIL2KCG-36, Siemens Healthineers, Alemanha).

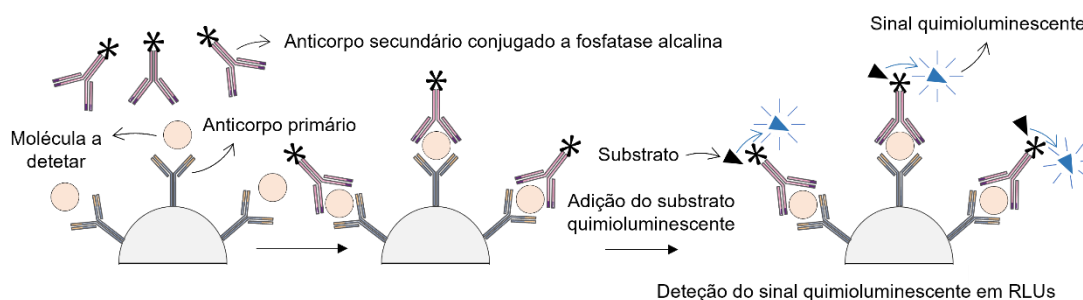


Figura 4.10: Detecção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulite*[®] 2000 através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo do tipo *sandwich* de 1 passo. A molécula a detetar presente na amostra liga-se aos anticorpos que revestem as micropartículas e ao anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina formando um complexo. Após a adição do substrato quimioluminescente, a reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor.

Determinação quantitativa de *LH*, *FSH*, prolactina e *SHBG* no soro e plasma: As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo o *Alinity i LH* (G84845R02, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i FSH* (G74689R02, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i Prolactin* (G74466R03, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i SHBG* (G84815R02, Abbott, Estados Unidos), todos imunoensaios de 2 passos que usam tecnologia *CMIA* (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação qualitativa de *hCG* em amostra de urina: Utilizou-se o *hCG Pregnancy Rapid Test Strip MonlabTest*[®] (MO-806002, Monlab, Espanha), um ensaio rápido de imunocromatografia (Figura 4.11-A-C). O teste utiliza uma membrana com uma fase estacionária (anticorpos na linha de teste e na linha de controlo) e uma fase móvel (anticorpos anti-*hCG* conjugados a partículas coloidais de ouro)⁵¹. Na realização do ensaio, deve-se imergir a tira de teste na amostra de urina durante, pelo menos, 15 segundos⁵¹. A amostra migra por ação capilar ao longo da membrana e, na presença de *hCG*, esta liga-se ao anticorpo conjugado⁵¹. O complexo conjugado-*hCG* segue até à linha de teste reagindo com os anticorpos monoclonais anti-*hCG* aí presentes, formando uma banda colorida⁵¹. Caso não exista *hCG* na amostra, a banda não aparecerá. O conjugado em excesso continuará a migrar ao longo da membrana até reagir com os anticorpos policlonais anti-conjugado presentes na linha de controlo, formando uma linha colorida⁵¹. Esta linha deverá aparecer sempre que o teste for

realizado, indicado que foi adicionado um volume adequado de amostra e que esta foi absorvida pela membrana⁵¹. O resultado deverá ser lido ao fim de 3 minutos⁵¹. Os resultados possíveis e a sua interpretação encontram-se na Figura 4.11-D.

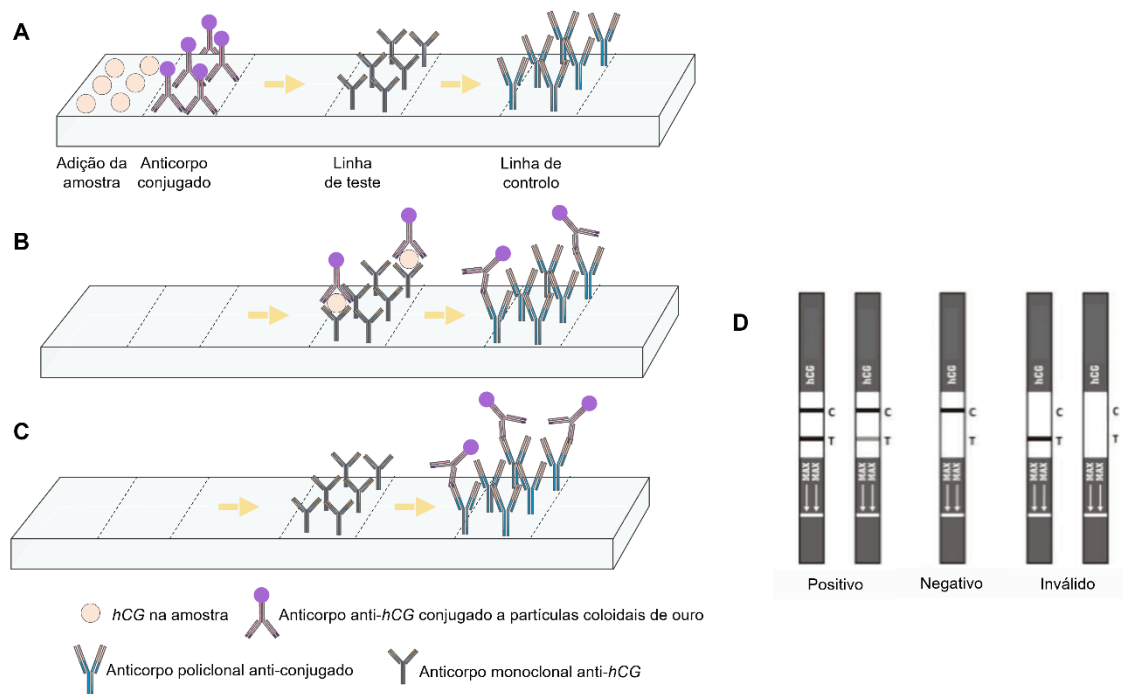


Figura 4.11: Detecção qualitativa de *hCG* em amostras de urina por imunocromatografia. O teste contém uma fase estacionária (anticorpos nas linhas de teste e de controlo) e uma fase móvel (anticorpos anti-*hCG* conjugados a partículas coloidais de ouro) (A). A amostra migra pela membrana e, na presença de *hCG*, forma-se o complexo conjugado-*hCG*. Este segue até à linha de teste, onde reage com os anticorpos anti-*hCG*, formando uma linha colorida (B). Caso não exista *hCG* na amostra, esta linha não aparecerá (C). O conjugado em excesso reage com os anticorpos anti-conjugado na linha de controlo, formando uma linha colorida. Na sua presença, o resultado será positivo (presença da linha de teste) ou negativo (ausência da linha de teste), enquanto na sua ausência, o teste será inválido e deverá ser realizado novamente (D). Adaptado de *hCG Pregnancy Rapid Test Strip MonlabTest*⁵¹.

Determinação quantitativa de testosterona e progesterona no soro e plasma:

As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo o *Alinity i 2nd Generation Testosterone* (G74632R03A, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i Progesterone* (G84854R03, Abbott, Estados Unidos), imunoensaios *CMIA* de 1 passo (Figura 4.9; Tabela Suplementar 10).

Determinação quantitativa de estradiol no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Estradiol* (G74631R06, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.7; Tabela Suplementar 8).

Determinação qualitativa e quantitativa de β -*hCG* total no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Total β -hCG* (G74437R02, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de β -hCG livre no soro: Foi realizada segundo o imunoensaio de 2 passos *Immulite® 2000 Free Beta HCG* (PIL2KFB-24, Siemens Healthineers, Alemanha), por quimioluminescência (Figura 4.8; Tabela Suplementar 9).

Hormonas de função adrenal

No córtex das glândulas adrenais são produzidos glucocorticoides (ex.: cortisol), mineralocorticoides (ex.: aldosterona) e androgénios adrenais (ex.: sulfato de deidroepiandrosterona - $DHEA-SO_4$), enquanto na medula são produzidas as catecolaminas. A insuficiência adrenal caracteriza-se por um défice na produção ou ação das hormonas produzidas pelo córtex adrenal, tendo origem em distúrbios que afetam o próprio córtex (primária), a glândula pituitária anterior (secundária) ou o hipotálamo (terciária)^{52,53}. A produção de glucocorticoides e de androgénios está dependente da secreção da hormona adrenocorticotrófica (*ACTH*) pela pituitária anterior^{52,53}. Concentrações elevadas de cortisol exercem *feedback* negativo na produção desta hormona^{52,53}. Em circulação, a maioria do cortisol encontra-se ligada a proteínas e a quantidade excretada na urina diz respeito à percentagem livre em circulação⁵⁴. O doseamento deste parâmetro na urina permite determinar uma situação de hiperfunção adrenocortical⁵⁴. O $DHEA-SO_4$ é a hormona esteroide mais abundante em circulação⁵⁵. A sua produção está dependente da secreção de *ACTH* e a sua concentração diminui com a idade⁵⁵.

Na insuficiência adrenal primária verifica-se a diminuição da concentração de aldosterona, $DHEA-SO_4$ e cortisol^{53,55}. Consequentemente, com a diminuição do *feedback* negativo exercido na produção de *ACTH*, a concentração desta hormona aumenta⁵². Na insuficiência adrenal secundária e terciária, a concentração de *ACTH* diminui e, consequentemente, diminui a concentração de cortisol e androgénios adrenais⁵². Neste caso, a produção de mineralocorticoides permanece normal, já que não depende desta hormona⁵². O diagnóstico de insuficiência adrenal passa pela determinação dos níveis de cortisol sérico e *ACTH*, sendo que, normalmente, se determinam ainda os níveis de $DHEA-SO_4$, cortisol na urina, renina e aldosterona⁵².

Determinação quantitativa de $DHEA-SO_4$ no soro: Baseou-se no imunoensaio competitivo quimioluminescente (Figura 4.12; Tabela Suplementar 11) *Immulite® 2000 DHEA-SO₄* (PIL2KDS-22, Siemens Healthineers, Alemanha).

Determinação quantitativa de *ACTH* no plasma: Foi realizada segundo o imunoensaio de 2 passos *Immulite® 2000 ACTH* (PIL2KAC-19, Siemens Healthineers, Alemanha), por tecnologia quimioluminescente (Figura 4.8; Tabela Suplementar 9).

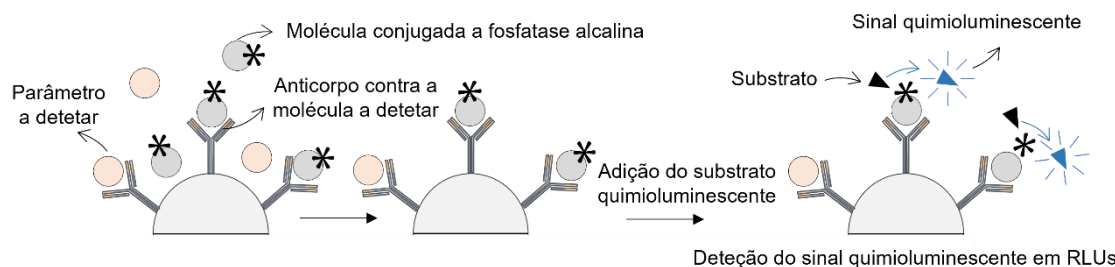


Figura 4.12: Detecção de parâmetros imunológicos no sistema *Immulite*[®] 2000 através de um imunoensaio quimioluminescente quantitativo competitivo de 1 passo. A molécula conjugada a fosfatase alcalina compete com a molécula na amostra pela ligação aos anticorpos que revestem as micropartículas paramagnéticas. Após a adição do substrato quimioluminescente, a reação quimioluminescente é medida em *RLUs* e o sinal é obtido em proporção à quantidade de enzima ligada. Figura do autor.

Determinação quantitativa de cortisol no soro, plasma e urina: Foi realizada segundo o *Alinity i Cortisol* (G74517R06, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio de 1 passo que usa tecnologia *CMIA* (Figura 4.9; Tabela Suplementar 10).

Hormonas gastrointestinais

As hormonas gastrointestinais avaliadas no Labocentro são a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina I (*IGF-I*), ambas hormonas peptídicas. A insulina é secretada pelas células β do pâncreas e é responsável por manter os níveis normais de glucose no sangue⁵⁶. Esta molécula é essencial para o transporte intracelular de glucose para os músculos e tecido adiposo⁵⁶. Para além disso, regula o metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas e, através dos seus efeitos mitogénicos, promove a divisão e crescimento celular⁵⁶. Defeitos na secreção de insulina e/ou na sua ação contribuem para a ocorrência de diabetes mellitus, uma doença metabólica crónica caracterizada pela existência de hiperglicemia⁵⁷. Esta tem origem na destruição autoimune das células β do pâncreas (tipo 1) e consequente incapacidade de produção de insulina, ou na resistência do organismo à insulina (tipo 2), a causa mais frequente⁵⁷.

O *IGF-I*, estruturalmente homólogo à insulina, é produzido no fígado e, tal como a insulina, atua na diminuição dos níveis de glucose no sangue⁵⁶. Contudo, a sua principal função é a estimulação do crescimento. No diagnóstico de distúrbios de crescimento, a deteção de *IGF-I* é um indicador útil da secreção da hormona de crescimento (*GH*)⁵⁸. Níveis baixos ou normais de *IGF-I* no plasma ou soro são indicativos de presença ou ausência de deficiência de *GH*, respetivamente⁵⁸. No primeiro caso, devem ser realizados testes adicionais para determinar se a secreção de *GH* se encontra abaixo do normal⁵⁸.

Determinação quantitativa de *IGF-I* no soro ou plasma: Foi realizada segundo o imunoensaio de 1 passo *Immulite*[®] 2000 *IGF-I* (PIL2KIGF-4, Siemens Healthineers, Alemanha), por tecnologia quimioluminescente (Figura 4.10; Tabela Suplementar 9).

Determinação quantitativa de insulina no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Insulin* (G84818R02, Abbott, Estados Unidos), um imunoenensaio de 1 passo que usa tecnologia *CMIA* (Figura 4.3; Tabela Suplementar 6).

Rastreo pré-natal:

As malformações congénitas representam a principal causa de morte de recém-nascidos, bebés e crianças⁵⁹. O rastreio pré-natal tem o objetivo de determinar o risco de um embrião ou feto ser portador de uma anomalia congénita, nomeadamente: trissomia 21 (Síndrome de Down), trissomia 18 (Síndrome de Edwards) e trissomia 13 (Síndrome de Patau). No Labocentro, quando esta análise é solicitada, a utente entrega o relatório da ecografia e preenche um questionário referindo a idade materna, os antecedentes obstétricos, o peso, a etnia, os hábitos tabágicos e se é, ou não, insulino-dependente. Isto, porque os resultados obtidos variam consoante esses fatores⁵⁹. No rastreio do 1º trimestre realiza-se o doseamento de β -*hCG* livre e da proteína plasmática associada à gravidez (*PAPP-A*), produzida pelo trofoblasto^{59,60}. No 2º trimestre realiza-se o doseamento de *hCG*, alfafetoproteína (*AFP*) e estriol livre. A *AFP* é produzida pelo fígado do feto e atravessa a placenta entrando na corrente sanguínea da mãe. Um rastreio positivo não é um diagnóstico, apenas indica uma elevada probabilidade de malformação congénita e um rastreio negativo não exclui a possibilidade de ocorrência de doença. Abaixo encontram-se os princípios de deteção destes parâmetros, à exceção dos ensaios de β -*hCG* livre e *hCG*, já mencionados.

Determinação quantitativa de AFP: Foi realizada segundo o imunoenensaio de 2 passos *Immulite® 2000 AFP* (PIL2KAP-25, Siemens Healthineers, Alemanha), através de tecnologia quimioluminescente (Figura 4.8; Tabela Suplementar 9).

Determinação quantitativa de PAPP-A em soro ou plasma: Foi realizada segundo o imunoenensaio quimioluminescente de 1 passo (Figura 4.10; Tabela Suplementar 9) *Immulite® 2000 PAPP-A* (PIL2KPC-33, Siemens Healthineers, Alemanha).

Determinação quantitativa de estriol livre no soro: Baseou-se no imunoenensaio quimioluminescente competitivo (Figura 4.12; Tabela Suplementar 11) *Immulite® 2000 Unconjugated Estriol* (PIL2KUE3-8, Siemens Healthineers, Alemanha).

Tabela 4.2: Parâmetros detetados na secção de endocrinologia do Labocentro e respetiva área em estudo. Tabela do autor.

Área	Parâmetro analisado
Função Tiroideia	<i>TSH</i>
	T ₃ total e livre
	T ₄ total e livre
	Tg e anti-Tg
	Anti- <i>TPO</i>
Função paratiroideia	Anti- <i>TSHR</i>
	<i>PTH</i> intacta
	25-hidroxivitamina D
Hormonas de fertilidade	<i>LH</i>
	<i>FSH</i>
	Testosterona
	Progesterona
	β - <i>hCG</i> total e livre
	<i>hCG</i>
	Prolactina
	Estradiol
	<i>SHBG</i>
	Hormonas de função adrenal
Cortisol	
<i>DHEA-SO₄</i>	
Hormonas gastrointestinais	Insulina
	<i>IGF-I</i>
Rastreio pré-natal	<i>PAPP-A</i>
	AFP
	Estriol livre
	β - <i>hCG</i> livre
	<i>hCG</i>

4.1.3.3. Alergologia

Nesta área foram detetadas as imunoglobulinas específicas (IgE) para auxiliar o diagnóstico diferencial de atopia. A atopia, descrita em 1923, consiste na predisposição hereditária para determinadas reações alérgicas⁶¹. Indivíduos com doenças alérgicas, entre as quais, dermatite atópica (eczema), rinite alérgica, alergia alimentar ou asma alérgica, podem apresentar sintomas imediatamente após a exposição a alérgenos específicos⁶². O desenvolvimento de sintomas e manifestações clínicas agudas deve-se principalmente à ação das IgE e dos mastócitos⁶².

Nas alergias, a resposta imune inicia com a sensibilização. Assim que os alérgenos são inalados, as células apresentadoras de antígeno no epitélio das vias aéreas apresentam-nos aos linfócitos T⁶². Isto estimula os linfócitos B a diferenciarem-se em plasmócitos, produzindo IgE que se ligam à superfície dos mastócitos, fazendo a ligação entre estas células e os alérgenos⁶². Cada IgE é específica do alérgeno que estimulou

a sua produção. Após uma reexposição ao alérgico, a sua ligação às IgE desencadeia um processo de sinalização celular que leva à desgranulação dos mastócitos, com libertação de mediadores inflamatórios que levam às manifestações características de uma reação alérgica⁶²:

A avaliação de IgE *in vitro*, juntamente com outros sinais clínicos e laboratoriais, poderá ajudar na identificação do(s) alérgico(s) para o(s) qual(uais) o indivíduo se encontra sensibilizado. No Labocentro, durante o período de estágio, realizou-se a determinação qualitativa e quantitativa de IgE a alérgicos inalantes em amostras de soro. A determinação quantitativa baseou-se no imunoensaio *Immulite® 2000 3gAllergy™ – Specific IgE Universal Kit* (PIL2KUN-30, Siemens Healthineers, Alemanha), enquanto a qualitativa teve por base o imunoensaio *Immulite® 2000 AlaTOP Allergy Screen* (PIL2KAT-17, Siemens Healthineers, Alemanha). Ambos usam metodologia quimioluminescente baseada em tecnologia de fase líquida (Figura 4.13).

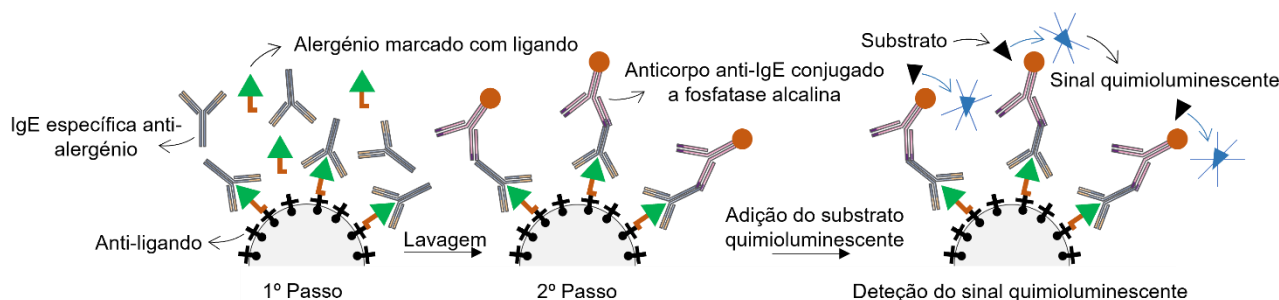


Figura 4.13: Deteção de IgE através de um imunoensaio quimioluminescente de 2 passos. No 1º passo, as IgE na amostra ligam-se aos alérgicos marcados com ligando que, por sua vez, se ligam ao anti-ligando presente nas esferas. No 2º passo, o anticorpo anti-IgE humana conjugado a fosfatase alcalina liga-se à IgE imobilizada. Após a adição do substrato quimioluminescente, o sinal gerado é proporcional à quantidade de IgE na amostra. Adaptado de *Make allergy testing routine: Information for laboratorians*⁶³.

4.1.3.4. Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas detetadas no soro, urina ou outros fluidos orgânicos, sintetizadas e excretadas pelos tecidos tumorais, libertadas pela desintegração do tumor ou produzidas pela reação do organismo ao tumor⁶⁴. No Labocentro, durante o período de estágio, realizou-se o doseamento do antígeno carcinoembrionário (CEA), da alfafetoproteína (AFP), dos antígenos carboidratos CA 15-3, CA 19-9 e CA 125 e do antígeno específico da próstata (PSA). O CEA e a AFP são duas glicoproteínas oncofetais⁶⁴. A primeira é produzida pelo tecido embrionário do intestino, pâncreas e fígado, e a segunda constitui a principal proteína no soro fetal. O CEA surge, geralmente, aumentado em adenocarcinomas (colorretal, mama, pulmão) enquanto a AFP se encontra elevada nos doentes com carcinoma hepatocelular,

tumores de células germinativas testiculares ou do ovário, carcinoma pancreático, entre outros⁶⁴. O CA 15-3, o CA 19-9 e o CA 125 são glicoproteínas associadas a carcinoma da mama (CA 15-3), carcinoma do pâncreas, colorretal e gástrico (CA 19-9), e carcinoma do ovário e do colo do útero (CA 125). O PSA está associado ao carcinoma da próstata⁶⁴. Ainda que estes marcadores correspondam a indicadores bioquímicos da presença de um tumor, muitas das vezes sofrem aumentos inespecíficos associados a patologias benignas, gravidez ou hábitos tabágicos⁶⁴. Desta forma, a avaliação dos marcadores tumorais deve ser realizada juntamente com outros métodos clínicos, não servindo para o diagnóstico de doença maligna, que apenas é obtido pela anatomia patológica. A principal função da avaliação destes parâmetros consiste na monitorização da doença⁶⁴. O princípio de deteção de cada parâmetro em estudo encontra-se abaixo, à exceção do ensaio da AFP, já descrito anteriormente.

Determinação quantitativa de CEA, CA 15-3, CA 19-9 e CA 125 no soro e plasma:

As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo o *Alinity i CEA* (G74528R04, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i CA 15-3* (G74550R03, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i CA 19-9XR* (G74552R03, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i CA 125 II* (G74549R04, Abbott, Estados Unidos), imunoensaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de PSA total (PSA livre e PSA complexado com α -1-antiquimotripsina) e de PSA livre no soro: As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo os imunoensaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7) *Alinity i Total PSA* (G74647R05, Abbott, Estados Unidos) e *Alinity i Free PSA* (G74459R05, Abbott, Estados Unidos).

4.1.3.5. Doenças autoimunes

Nesta área, realizou-se a determinação de autoanticorpos IgG específicos contra o péptido citrulinado cíclico (*CCP*) como auxílio ao diagnóstico de artrite reumatoide.

Artrite reumatoide:

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crónica autoimune, que afeta cerca de 0,5% a 1% da população⁶⁵. Ainda que a sua etiologia seja desconhecida, a interação entre os fatores genéticos e ambientais contribui para a sua ocorrência⁶⁵. Esta doença é caracterizada pela inflamação crónica do líquido sinovial, levando à destruição progressiva da articulação e, na maioria dos casos, a incapacidade progressiva. Os indivíduos com AR contêm autoanticorpos no soro, sendo o fator reumatoide o mais

conhecido. Este autoanticorpo é dirigido contra a região Fc das imunoglobulinas IgG. Contudo, este parâmetro não é específico de AR, já que pode ser detetado no soro de indivíduos com outras doenças reumáticas ou inflamatórias e até mesmo em indivíduos saudáveis⁶⁶. Em 2007, a *European League against Rheumatism* incluiu os autoanticorpos contra o péptido citrulinado cíclico (anti-CCP) como marcadores sorológicos para o diagnóstico de artrite reumatoide⁶⁷. Estes autoanticorpos são dirigidos contra péptidos com citrulina, um aminoácido produzido através da deaminação de um resíduo de arginina, presentes no líquido sinovial de indivíduos com AR⁶⁵. A ciclização de um péptido citrulinado contribui para melhor exposição dos seus epítomos e, por isso, a sensibilidade é superior comparativamente aos péptidos lineares.

Determinação semi-quantitativa de anti-CCP no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Anti CCP* (G84829R02, Abbott, Estados Unidos), um imunoenensaio de 2 passos que usa tecnologia CMIA (Figura 4.2-A; Tabela Suplementar 5).

4.1.3.6. Marcadores de doença cardiovascular

As doenças cardiovasculares afetam o coração e/ou os vasos sanguíneos. Os marcadores de doença cardíaca são substâncias endógenas libertadas na corrente sanguínea quando existe *stress*, lesão ou morte dos cardiomiócitos⁶⁸. A mioglobina e a troponina-I são exemplos de marcadores de necrose miocárdica e são úteis ao diagnóstico de infarto do miocárdio (*MI*)⁶⁸. A mioglobina é uma proteína dos músculos esquelético e cardíaco, libertada na circulação cerca de 1 hora após o *MI*, sendo por isso, um marcador precoce de *MI* agudo⁶⁸. Contudo, a sua especificidade clínica é baixa devido aos seus níveis elevados no músculo esquelético⁶⁸. A troponina faz parte de um complexo regulatório localizado no miocárdio constituído por 3 subunidades proteicas: troponina-C (ligação ao cálcio), troponina-T (ligação à tropomiosina) e troponina-I (inibidor)⁶⁹. Após uma lesão do miocárdio, a troponina cardíaca T e I citosólica (menor quantidade) são libertadas para a circulação e após dano adicional, é libertada a troponina armazenada no sarcómero (maior quantidade)⁶⁸.

Os marcadores de *stress* do miocárdio auxiliam no diagnóstico e prognóstico de síndrome coronária aguda⁶⁸. Entre eles, destacam-se o péptido natriurético do tipo B (*BNP*) e o N-terminal-pro-BNP (NT-proBNP). Em resposta ao *stress* causado pela expansão de volume e sobrecarga de pressão do coração, os cardiomiócitos secretam proBNP, uma molécula rapidamente clivada em 2 fragmentos circulantes: *BNP* (biologicamente ativo) e NT-proBNP (biologicamente inativo)⁶⁸. O *BNP* é eliminado da

circulação em primeiro lugar, sendo a concentração de NT-proBNP mais elevada⁶⁸. Para além disso, o NT-proBNP é mais estável que o *BNP*⁶⁸.

A homocisteína é um marcador associado a doenças que afetam os vasos sanguíneos⁷⁰. Consiste num aminoácido com grupo SH, resultante do metabolismo da metionina, que se encontra na forma livre (20% a 30%) ou associada a proteínas plasmáticas (70% a 80%)⁷⁰. Este parâmetro pode ser remetilado a metionina ou convertido em cisteína⁷⁰. A desregulação destes processos leva a hiper-homocisteinémia (aumento de homocisteína no plasma ou soro), um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, já que a homocisteína causa lesão e disfunção endotelial, com consequente ativação plaquetária e formação de coágulos⁷⁰.

Determinação quantitativa de mioglobina, NT-proBNP e troponina-I cardíaca no soro e plasma: As determinações foram realizadas, respetivamente, segundo o *Alinity i STAT Myoglobin* (G84984R01, Abbott, Estados Unidos), o *Alinity i Alere NT-proBNP* (G84883R03, Abbott, Estados Unidos) e o *Alinity i STAT High Sensitive Troponin-I* (G84896R02, Abbott, Estados Unidos), imunoensaios *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de *BNP* no plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i BNP* (G74545R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7)

Determinação quantitativa de L-homocisteína total no soro e plasma: Foi realizada segundo o *Alinity i Homocysteine* (G74695R02, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 1 passo (Figura 4.9; Tabela Suplementar 10).

4.1.3.7. Marcadores de anemia

Segundo a OMS, a anemia é caracterizada pelo défice da concentração de hemoglobina⁷¹. Geralmente, deve-se a deficiências nutricionais (ferro, ácido fólico e vitamina B12), hemoglobinopatias ou doenças infecciosas⁷¹. A ferritina, o ácido fólico e a vitamina B12 foram os marcadores de anemia avaliados, durante o período de estágio, na área de imunologia do Labocentro. A ferritina é responsável pelo armazenamento de ferro (Fe^{3+}) no organismo. A diminuição ou o aumento da sua concentração estão associados, respetivamente, ao défice e ao aumento das reservas de ferro⁷². Nesse sentido, a diminuição dos níveis de ferritina sérica está associada à anemia por deficiência de ferro (anemia ferropénica)⁷². Contudo, em casos de doenças inflamatórias ou infeções existe um aumento desproporcional dos níveis de ferritina face às reservas

de ferro⁷². Assim, pacientes com anemia ferropénica podem apresentar níveis normais ou elevados de ferritina⁷².

A forma biologicamente ativa do ácido fólico (5-metil-tetrahidrofolato) e a vitamina B12 são essenciais para a síntese de *DNA*⁷³. O 5-metil-tetrahidrofolato tem como principal função a doação de grupos metil, sendo a vitamina B12 o cofator dessa reação⁷³. Um défice destas moléculas resulta em defeitos na síntese de *DNA* e, conseqüentemente, na ocorrência de anemia megaloblástica⁷³, caracterizada pela formação de megaloblastos na medula óssea e libertação de eritrócitos macrocíticos no sangue periférico. Perante um défice prolongado de ácido fólico e/ou vitamina B12, ocorre a apoptose das células hematopoiéticas precursoras na medula óssea, levando a leucopenia e trombocitopenia.

Determinação quantitativa de ferritina no soro e plasma: Baseou-se no *Alinity i Ferritin* (G74504R04, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.4; Tabela Suplementar 7).

Determinação quantitativa de ácido fólico no soro, plasma e eritrócitos: Foi realizada segundo o *Alinity i Folate* (G84837R01, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio de 2 passos que usa tecnologia *CMIA* (Figura 4.7; Tabela Suplementar 8).

Determinação quantitativa de vitamina B12 no soro e plasma: Baseou-se no *Alinity i B12* (G84863R01, Abbott, Estados Unidos), um imunoensaio *CMIA* de 2 passos (Figura 4.7; Tabela Suplementar 8).

4.2. Área de Hematologia

A hematologia estuda as doenças relacionadas com os elementos figurados do sangue e com as proteínas da coagulação⁷⁴. Nesta secção é feita a análise quantitativa e qualitativa dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas e a avaliação da hemostase, de modo a identificar alterações que contribuem para o diagnóstico e monitorização terapêutica de doenças hematológicas e distúrbios na coagulação. Nesse sentido, durante o período de estágio, realizou-se o hemograma, a velocidade de sedimentação eritrocitária, o doseamento de hemoglobina glicosilada, a pesquisa de hemoglobinopatias e ensaios de hemostase. Para além disso, também se realizou a determinação do grupo sanguíneo, a reação de *Coombs* direta e a pesquisa de anticorpos irregulares, metodologias que se enquadram na área da imunohemoterapia.

A esta secção destinaram-se as amostras anticoaguladas com *EDTA K₃* ou citrato de sódio. As amostras em citrato de sódio foram utilizadas, após centrifugação, nos ensaios de hemostase, enquanto as amostras de sangue total anticoaguladas com *EDTA K₃* se

destinaram aos restantes ensaios. Após a avaliação de todos os parâmetros, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C durante 4 dias, período após o qual foram eliminadas.

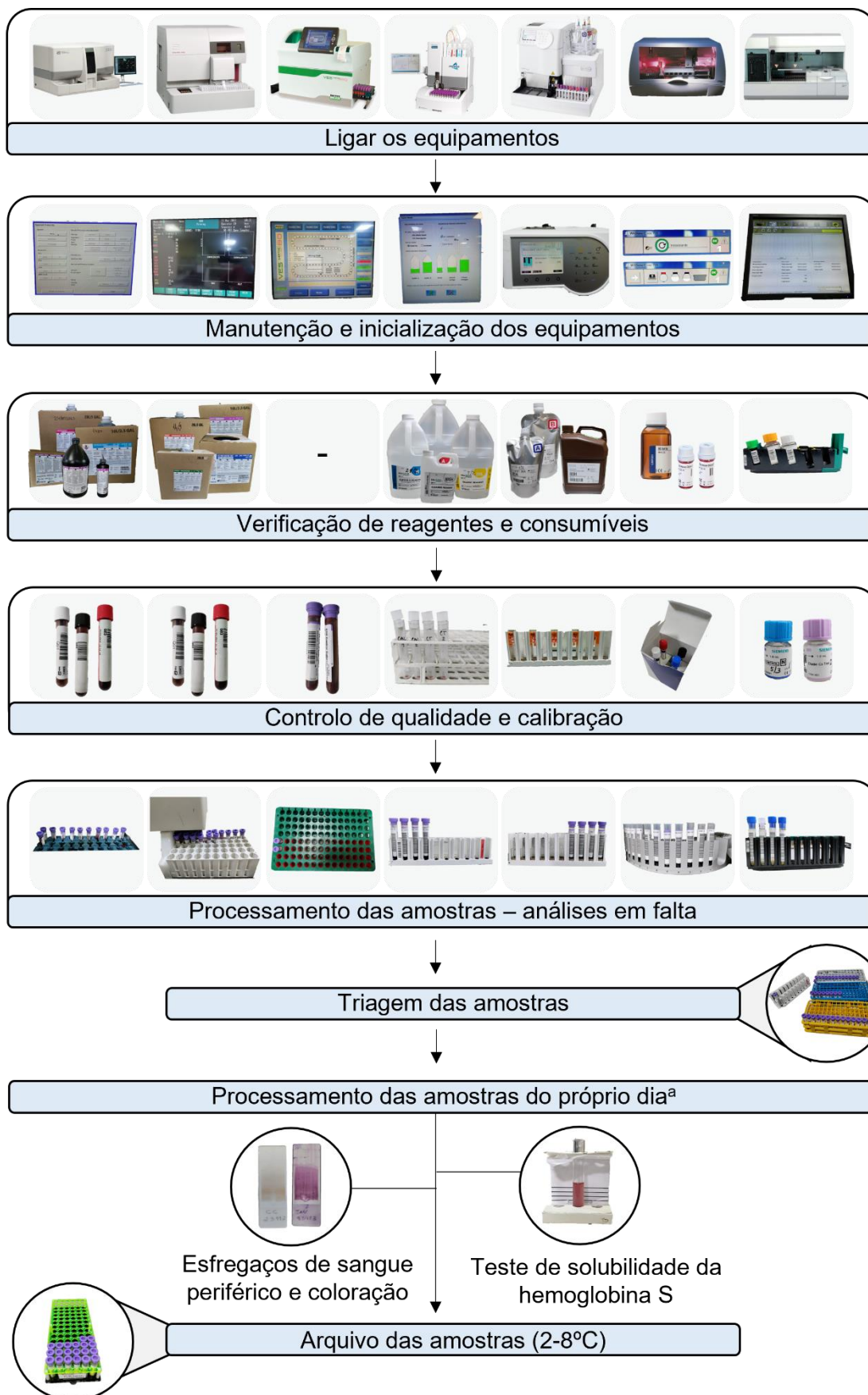
Durante o período de estágio, as tarefas realizadas diariamente enquanto estagiária na secção de hematologia foram as seguintes: ligar os equipamentos *Cell-Dyn 3700*[®], *Cell-Dyn Sapphire*, *Ves-Matic Cube 80*, *Hb9210TM Premier*, *AdamsTM A_{1C} HA-8180T*, *WADiana[®] Compact* e *BCS[®]XP*, efetuar a sua manutenção e inicialização, a verificação de reagentes e consumíveis, o controlo de qualidade e calibração, o processamento das amostras arquivadas para realização das análises em falta, a triagem das amostras, o processamento das amostras nos equipamentos mencionados, a realização de esfregaços de sangue periférico e respetiva coloração, a realização do teste de solubilidade da hemoglobina S e o arquivo das amostras entre 2°C e 8°C, de acordo com a Figura 4.14.

Abaixo, são abordados os parâmetros avaliados nesta área e os métodos utilizados na sua deteção.

4.2.1. Hemograma

O hemograma consiste na avaliação quantitativa dos elementos figurados do sangue, sendo composto pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma⁷⁵.

O eritrograma avalia os seguintes parâmetros associados aos eritrócitos: número total de eritrócitos (*RBC*), hemoglobina (*Hb*), hematócrito (*HCT*), peso de distribuição dos glóbulos vermelhos (*RDW*) e os índices hematimétricos, ou seja, o volume globular médio (*MCV*), a hemoglobina globular média (*MCH*) e a concentração de hemoglobina globular média (*MCHC*)⁷⁶. A hemoglobina é composta por 4 subunidades, cada uma constituída por uma cadeia polipeptídica ligada a um grupo hemo⁷⁷. Este grupo contém um átomo de ferro no interior, responsável essencialmente pela ligação ao O₂ e CO₂⁷⁷. O valor deste parâmetro varia consoante a idade, altitude, género e gravidez, sendo que, como já mencionado, um défice da concentração de hemoglobina caracteriza uma situação de anemia⁷¹. O hematócrito representa a percentagem de volume de sangue total ocupada pelos eritrócitos⁷⁸. Por um lado, valores baixos estão associados a situações de anemia⁷⁸. Por outro lado, valores elevados podem estar relacionados com uma situação de poliglobulia (aumento exagerado de glóbulos vermelhos no sangue) ou de diminuição do volume plasmático (perdas hídricas por desidratação, queimaduras, choque), por exemplo^{76,78}. Os índices hematimétricos permitem fazer a classificação morfológica da anemia^{76,79}. O *MCV* consiste no volume médio dos glóbulos vermelhos



^aComo ilustrado na etapa "Processamento das amostras – análises em falta".

Figura 4.14: Atividades realizadas diariamente na seção de Hematologia do Labocentro. De manhã, realizou-se a inicialização e manutenção dos equipamentos, a verificação de reagentes e consumíveis, o controle de qualidade e calibração, e o processamento das amostras. À tarde, as amostras foram triadas e processadas. Quando solicitado, realizaram-se os esfregaços de sangue periférico e respectiva coloração e/ou o teste de solubilidade da hemoglobina S. Ao final do dia, as amostras foram armazenadas entre 2°C e 8°C. Figura do autor.

individuais, permitindo classificá-los de acordo com o seu tamanho em: microcíticos (abaixo do limite inferior de referência), normocíticos (dentro do intervalo de referência) ou macrocíticos (acima do limite superior de referência)^{78,79}. O *MCH* é o valor médio da hemoglobina contida em cada eritrócito^{78,79}. Este parâmetro avalia a cor dos glóbulos vermelhos, classificando-os em: hipocrômicos (abaixo do limite inferior de referência) ou normocrômicos (dentro do intervalo de referência)^{78,79}. Apenas em condições específicas, como é o caso da esferocitose hereditária, se considera a existência de hiperchromia⁷⁸. O *MCHC* também avalia a cor dos eritrócitos e corresponde à taxa do peso da hemoglobina em relação ao volume médio dos glóbulos vermelhos⁷⁹. Contudo, é necessário ter em atenção que não é fisiologicamente possível obter um *MCHC* superior a 37%⁷⁸. Quando isso se verifica, poderá dever-se, por exemplo, a esferocitose hereditária ou à presença de aglutininas frias⁷⁹. O *RDW* é uma medida da heterogeneidade da população de eritrócitos, sendo que um valor superior a 14% é indicativo de anisocitose eritrocitária⁷⁶. Para além destes parâmetros, por vezes, são também avaliados os reticulócitos, que consistem em glóbulos vermelhos imaturos libertados para o sangue periférico⁸⁰. Numa situação de anemia, o aumento de reticulócitos indica que a medula óssea está a responder com o aumento da produção de eritrócitos^{76,80}. A ausência do aumento de reticulócitos poderá dever-se ao tempo insuficiente para a compensação da anemia ou a uma deficiência nutricional (ácido fólico, vitamina B12), por exemplo⁸⁰.

No leucograma é determinado o número total de leucócitos (*WBC*) e a contagem diferencial ou fórmula leucocitária⁷⁶. Nesta, os leucócitos são classificados nas 5 subpopulações: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, sendo calculada a sua concentração absoluta e percentagem⁷⁶.

O plaquetograma avalia parâmetros relacionados com as plaquetas, nomeadamente: número total de plaquetas (*PLT*), plaquetócrito (*PCT*), volume plaquetário médio (*MPV*) e peso de distribuição de plaquetas (*PDW*)⁸¹. O plaquetócrito representa a percentagem de volume de sangue total ocupado pelas plaquetas⁸¹. O *MPV* representa o volume médio das plaquetas individuais, permitindo classificá-las de acordo com o tamanho em: microtrombocitos (abaixo do limite inferior de referência), normotrombocitos (dentro do intervalo de referência) ou macrotrombocitos (acima do limite superior de referência)⁸².

O *PDW* representa a heterogeneidade da população plaquetária e um valor elevado sugere anisocitose plaquetária⁸¹.

Durante o período de estágio, os hemogramas foram realizados em dois equipamentos: *Cell-Dyn 3700*[®] (Abbott, Estados Unidos) e *Cell-Dyn Sapphire* (Abbott, Estados Unidos).

4.2.1.1. Sistema *Cell-Dyn 3700*[®]

O sistema *Cell-Dyn 3700*[®] é um analisador hematológico automático utilizado para avaliar os seguintes parâmetros: *WBC*, *WBC* por impedância e por contagem ótica, fórmula leucocitária, *RBC*, Hb, HCT, *MCV*, *MCH*, *MCHC*, *RDW*, *PLT*, *MPV*, *PCT* e *PDW* em amostras de sangue total anticoaguladas com *EDTA K₃*⁸².

Durante o estágio, em primeiro lugar, foi realizado o ciclo de arranque automático do equipamento, que prepara o sistema de fluxo e verifica as contagens de *background*⁸³. As contagens de *background* confirmam o desempenho de base do sistema na ausência de aspiração de amostra⁸⁴. Os valores obtidos representam constituintes com origem em reagentes isentos de sangue e/ou “ruído” eletrônico⁸⁴. De seguida, procedeu-se à verificação diária do controlo de qualidade, utilizando 1 dos 3 níveis de controlo *Cell-Dyn 29 Plus Control (with Retic)* (Abbott, Estados Unidos): controlo baixo/reticulócitos elevados, controlo normal/reticulócitos intermédios e controlo alto/reticulócitos baixos⁸⁵. Os controlos foram armazenados entre 2°C e 8°C, sendo que depois de abertos apenas apresentavam 7 dias de estabilidade. As amostras foram analisadas automaticamente em modo fechado (com tampa), à exceção dos tubos pediátricos que foram processados manualmente em modo aberto (sem tampa). No processamento das amostras, os parâmetros foram obtidos por 3 métodos: impedância elétrica, medições no canal de fluxo ótico e espectrofotometria de absorção⁸². Os 2 primeiros obedecem aos princípios da citometria de fluxo⁸².

A **citometria de fluxo** é um processo no qual as células individuais ou outras partículas biológicas passam uniformemente num fluxo por um sensor ou sensores que medem as suas características físicas ou químicas⁸⁶. Isso acontece através de um processo designado por focagem hidrodinâmica, no qual a amostra em suspensão é injetada para um fluxo de líquido rápido isento de células⁸⁴. Os dois líquidos são transferidos a diferentes velocidades, não se misturando, mas levando a que as células e/ou partículas se juntem num único fluxo⁸⁴. Através de **medições no canal de fluxo ótico**, este método é usado na contagem ótica dos leucócitos (*WOC*) e na fórmula leucocitária⁸². Para isso, a amostra é diluída com reagente leucoprotetor (Abbott,

Estados Unidos), que permite que os leucócitos mantenham a integridade celular, e introduzida numa câmara de fluxo com uma pequena abertura na extremidade⁸². As células são alinhadas num único fluxo, que quando chega à zona ótica, intersesta um raio *laser* (632,8 nm)⁸². A luz difundida pelas células é medida em 4 ângulos de dispersão distintos, permitindo obter informações sobre o tamanho, estrutura interna, granulosidade e morfologia celular⁸². Os dados são representados em diagramas de dispersão, distinguindo os leucócitos nas 5 subpopulações: neutrófilos (amarelo), linfócitos (azul), monócitos (púrpura), eosinófilos (verde) e basófilos (branco)⁸².

A **impedância elétrica** corresponde à capacidade de uma partícula se opor ao movimento da carga elétrica⁸⁴. Quando uma célula suspensa num líquido condutor passa por uma abertura de dimensões conhecidas, existe uma modificação na corrente elétrica⁸². O número de células é proporcional ao número de impulsos gerados e a amplitude do impulso é proporcional ao volume da célula que o produziu⁸². Este método é utilizado para a contagem dos leucócitos por impedância (*WIC*), de *RBC* e *PLT*⁸². Na contagem *WIC*, a amostra é adicionada ao diluente (Abbott, Estados Unidos) e ao reagente *CN-Free Hb/WBC Lyse* (Abbott, Estados Unidos), que leva à separação do citoplasma dos leucócitos, sem alterar a membrana nuclear⁸². A diluição segue para a abertura por vácuo, onde os núcleos dos leucócitos são contados⁸². Na contagem *RBC* e *PLT*, a amostra é adicionada ao diluente e segue para a abertura por vácuo, onde as partículas são contadas⁸². Os impulsos entre 1 e 35 fL são incluídos nos dados das *PLT* e os impulsos superiores a 35 fL, nos dos *RBC*⁸².

A **espectrofotometria de absorção** baseia-se na relação linear entre a quantidade de luz absorvida por uma amostra, homogeneizada e sem fluidez, numa determinada banda de absorção e a concentração da entidade de absorção nessa amostra (lei de Lambert-Beer)⁸⁷. Este princípio é utilizado na determinação da concentração de hemoglobina através de um método de hidroxilamina-hemoglobina modificado⁸². Para isso, a amostra é adicionada ao diluente e ao reagente *CN-Free Hb/WBC Lyse*, que lisa os *RBC* e converte a hemoglobina libertada num cromogénio estável (complexo de hidroxilamina-hemoglobina), com pico de absorção a 544 nm⁸². A diluição segue para a célula de fluxo, onde incide a fonte de luz (540 nm), e a luz transmitida é detetada pelo fotodetector⁸². São efetuadas 5 leituras para cada amostra, eliminando-se a mais baixa e a mais elevada, sendo depois efetuada a média das restantes⁸². O mesmo procedimento é realizado com detergente (Abbott, Estados Unidos)⁸². As leituras do branco e da amostra são comparadas e o resultado é expresso em g/dL⁸².

4.2.1.2. Sistema *Cell-Dyn Sapphire*

O sistema *Cell-Dyn Sapphire* é um analisador automático de hematologia que, para além dos parâmetros avaliados pelo equipamento anterior, determina ainda o número total de reticulócitos, a sua percentagem, a fração de reticulócitos imaturos (*IRF*), o total de glóbulos vermelhos nucleados (*NRBC*) e a fração viável de WBC (*WVF*), em amostras de sangue em *EDTA K₃*⁸⁴.

Durante o estágio, em primeiro lugar, o analisador foi iniciado e foi realizado o *priming*. O *priming* consiste na purga do sistema, necessária antes da análise das amostras, e termina com uma contagem de *background* automática⁸⁴. De seguida, procedeu-se à verificação diária do controlo de qualidade, utilizando 1 dos 3 níveis de controlo *Cell-Dyn 29 Plus Control (with Retic)*. Depois, as amostras foram homogeneizadas e processadas automaticamente em modo fechado, à exceção das amostras pediátricas que foram analisadas manualmente em modo aberto. Os parâmetros foram obtidos por impedância elétrica, tecnologia de dispersão ótica/fluorescência e espectrofotometria de absorção⁸⁴.

A **impedância elétrica**, descrita anteriormente, é utilizada na contagem e determinação do volume de *RBC* e de *PLT*⁸⁴. A contagem de *PLT* serve de controlo de qualidade da contagem ótica de *PLT*⁸⁴. A amostra é diluída com o *diluent/sheath* (Abbott, Estados Unidos) e segue para a câmara de pré-análise do transdutor⁸⁴. Aí, a amostra em suspensão é injetada para um fluxo rápido de *diluent/sheath*, o que através de focagem hidrodinâmica, origina um fluxo uniforme das células e/ou partículas, possibilitando a determinação dos impulsos⁸⁴.

Na **tecnologia de dispersão ótica/fluorescência**, a amostra é diluída e adicionada à célula ótica de fluxo onde, através de focagem hidrodinâmica, segue pelo fluido leucoprotetor até à zona de deteção⁸⁴. Aí, as células interagem com o *laser* (488 nm), havendo dispersão de luz e emissão de fluorescência, medidas 5 vezes para cada partícula⁸⁴. Na **tecnologia de dispersão ótica**, a dispersão da luz é convertida em impulsos elétricos, que fornecem informações relativamente ao tamanho, complexidade, granularidade citoplasmática e lobularidade nuclear das células, permitindo a sua identificação⁸⁴. Assim, é possível determinar o total de *WBC*, a contagem diferencial de *WBC*, contagem de *PLT* e contagem ótica de *RBC*, que serve de controlo de qualidade da contagem de *RBC* por impedância⁸⁴. Na **tecnologia de fluorescência**, a luz é absorvida a um comprimento de onda (488 nm) e emitida noutra superior (530 nm ou 630 nm) através da utilização de corantes celulares⁸⁴. No caso dos reticulócitos, é utilizado o *Reticulocyte Reagent* (Abbott, Estados Unidos), que cora o ácido ribonucleico

(RNA) dos reticulócitos e produz fluorescência verde a 530 nm⁸⁴. Como durante o processo de maturação existe uma perda gradual de RNA, a intensidade da fluorescência serve de indicador de maturidade e é possível, para além da concentração e percentagem, calcular a fração imatura de reticulócitos⁸⁴. No caso dos NRBC e WBC não viáveis, é utilizado o WBC Reagent – Part A (Abbott, Estados Unidos) e o WBC Reagent – Part B (Abbott, Estados Unidos), para corar o DNA destas células, emitindo fluorescência vermelha a 630 nm⁸⁴. Este reagente separa a membrana citoplasmática dos NRBC, colocando os núcleos acessíveis para coloração⁸⁴. Isto não acontece com os WBC viáveis, havendo pouca ou ausência de coloração do seu núcleo⁸⁴.

A **espectrofotometria de absorção** é utilizada na determinação da concentração de hemoglobina, como descrito anteriormente. A amostra é diluída e misturada com CN-Free Hb Reagent (Abbott, Estados Unidos), seguindo para a célula de fluxo, onde são realizadas 8 medições da amostra e 8 medições do reagente de hemoglobina⁸⁴.

4.2.2. Esfregaços de sangue periférico e coloração

Sempre que existiram alterações acentuadas no hemograma, os especialistas em análises clínicas do Labocentro solicitaram a realização de esfregaços de sangue periférico para observação ao microscópio ótico.

Os esfregaços foram executados de forma manual utilizando lâmina e lamela. Em primeiro lugar, a lâmina foi identificada e limpa, para evitar a presença de vestígios de gordura. De seguida, colocou-se uma gota de sangue total em EDTA K₃ numa das extremidades da lâmina. A lamela foi colocada à frente da gota, numa inclinação de 45°, deslizando, posteriormente, até entrar em contacto com o sangue. De seguida, com um movimento firme e regular, a gota foi estendida por arrastamento. Os esfregaços obtidos devem ocupar cerca de 2/3 da lâmina e deverão ser finos, lisos e homogéneos, com os bordos bem definidos^{88,89}. Depois dos esfregaços estarem secos, procedeu-se à realização da coloração de *May-Grünwald-Giemsa* na qual se utilizam os corantes de *Romanowsky*⁸⁹. Estes são formados pelo azul-de-metileno (corante básico) e respetivos derivados oxidados azules e a eosina (corante ácido)⁸⁸. Inicialmente, as lâminas foram fixadas pelo metanol presente na solução de *May-Grünwald* (Química Clínica Aplicada S.A., Espanha)⁸⁹. Posteriormente, adicionou-se a solução de *Giemsa* (Química Clínica Aplicada S.A., Espanha) diluída^{89,90}. Após a adição de água, a componente ácida e a componente básica coram, respetivamente, as estruturas básicas (acidófilas) e ácidas (basófilas) das células⁸⁸.

Na observação ao microscópio, as estruturas acidófilas apresentam uma tonalidade alaranjada e as basófilas apresentam-se a lilás/azul-escuro^{88,91}. Na Figura 4.15 encontram-se imagens de esfregaços realizados durante o estágio antes e após coloração de *May-Grünwald-Giemsa*.

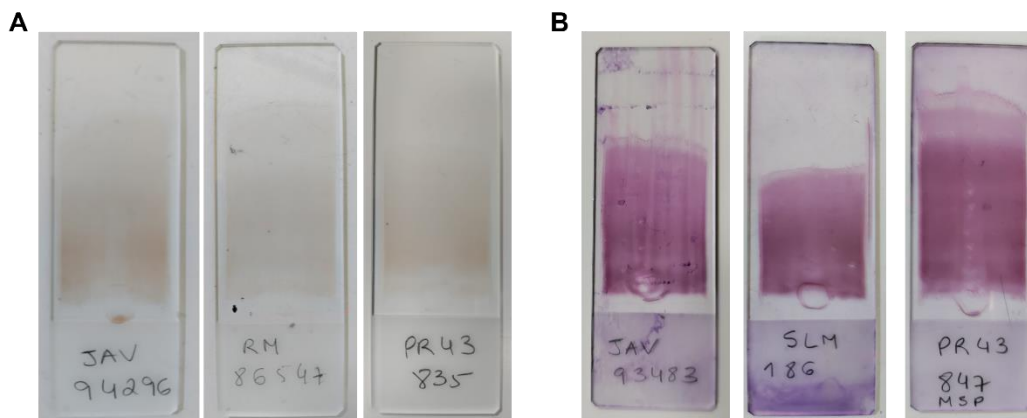


Figura 4.15: Esfregaços de sangue periférico realizados manualmente a partir de amostras de sangue total anticoaguladas com *EDTA K₃* antes (A) e após (B) a coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Figura do autor.

4.2.3. Velocidade de sedimentação eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) consiste na medição da sedimentação dos eritrócitos num determinado intervalo de tempo, normalmente 1 hora⁹². O método de referência baseia-se na metodologia de Fahraeus⁹³ e de Westergren⁹⁴, sendo utilizadas amostras de sangue anticoaguladas com citrato de sódio. A VSE é acelerada devido ao aumento da concentração plasmática de proteínas de fase aguda de elevado peso molecular, sendo assim um marcador de inflamação^{92,95}. Contudo, também alguns medicamentos, a gravidez ou a concentração de hemoglobina, entre outros, influenciam a velocidade de sedimentação⁹². Valores de VSE elevados estão associados a doenças inflamatórias agudas e crônicas, infeções, cancro ou condições autoimunes⁹⁵. Desta forma, a determinação da VSE é um ensaio inespecífico que apenas permite distinguir entre uma situação normal ou patológica⁹⁵.

No Labocentro, a análise da VSE foi realizada automaticamente no sistema *Ves-Matic Cube 80* (Diesse Diagnostica Senese SpA, Itália) ou, em situações específicas, de forma manual. Nesse caso, introduziram-se pipetas de vidro na amostra e após 1 hora foi lido o resultado.

4.2.3.1. Sistema *Ves-Matic Cube 80*

O *Ves-Matic Cube 80* é um equipamento automático para a determinação da VSE. O sistema avalia a rapidez com que sedimentam os glóbulos vermelhos, tendo a capacidade de analisar até um máximo de 90 amostras de sangue por hora⁹⁶. A análise é realizada em amostras de sangue anticoaguladas com *EDTA K₃* e os resultados são obtidos segundo as recomendações do *International Council for Standardization in Haematology*⁹². Os valores obtidos em 20 minutos são comparáveis com os valores obtidos pelo método de referência numa hora⁹⁶.

Durante o período de estágio, após a inicialização do dispositivo, foram realizados os controlos: normal - *ESR Control Cube Normal Level I (Diesse Diagnostica Senese SpA, Itália)* e patológico – *ESR Control Cube Abnormal Level II (Diesse Diagnostica Senese SpA, Itália)*. No processamento das amostras, a VSE foi determinada automaticamente através de sensores analógicos. Em primeiro lugar, o dispositivo homogeneiza a amostra e efetua a primeira leitura, correspondente ao nível de toda a coluna de sangue após homogeneização⁹⁶. De seguida, as amostras permanecem em repouso durante um período de tempo pré-definido, de modo a ocorrer a sedimentação dos eritrócitos⁹⁶. Nesta altura é feita a segunda leitura, correspondente ao nível da coluna de sangue após a sedimentação⁹⁶. Por fim, o resultado de cada amostra é impresso em tempo real. Perante um volume de sangue excessivo (> 4 mL) ou insuficiente (< 1,5 mL), a análise foi repetida com o volume de sangue adequado⁹⁶.

4.2.4. Doseamento de hemoglobina glicosilada

Num adulto, cerca de 97% da hemoglobina corresponde à HbA ($\alpha_2\beta_2$), 2,5% diz respeito à HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e 0,5% consiste em HbF ($\alpha_2\gamma_2$)⁹⁷. A hemoglobina glicosilada surge de uma reação não enzimática, lenta e irreversível, entre a hemoglobina e a glicose, glicose-6-fosfato ou frutose-1,6-difosfato⁹⁸. Caso a modificação ocorra no terminal amina da cadeia β da hemoglobina, existe uma alteração de carga (negativa) significativa⁹⁹. Isto não se verifica quando a reação ocorre nas cadeias α ou nos grupos ϵ amino. Por esta razão, os métodos dependentes de carga apenas medem a hemoglobina modificada no terminal amina da cadeia β , enquanto os métodos específicos de glicação, como a cromatografia de afinidade borónica, realizam o doseamento de toda a hemoglobina glicosilada estável⁹⁹.

A quantidade de hemoglobina glicosilada aumenta com o aumento da glicose no sangue⁹⁷. Contudo, enquanto a concentração de glicose no sangue varia, por exemplo, consoante a ingestão de alimentos ou a realização de exercício físico, a concentração

de hemoglobina glicosilada mantém-se relativamente estável ao longo do tempo¹⁰⁰. Isto, porque a glicação da hemoglobina ocorre de forma natural ao longo do tempo de vida dos eritrócitos⁹⁷. Assim, a concentração de hemoglobina glicosilada é diretamente proporcional à concentração de glicose no sangue nos últimos 2 a 3 meses, período correspondente ao tempo de semi-vida dos eritrócitos^{97,100}.

Existem diversas formas de hemoglobina glicosilada, entre as quais a HbA_{1a}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} e a HbA_{1c}¹⁰⁰. A HbA_{1c} (reação entre a hemoglobina e a glicose) é a mais comum e corresponde a cerca de 5% da HbA total, num indivíduo adulto normal⁹⁷. Assim, a determinação de HbA_{1c} é de grande importância clínica na diabetes mellitus^{97,100}. Segundo a Direção-Geral da Saúde, o doseamento de HbA_{1c} deve ser realizado por rotina, no mínimo semestralmente, em todas as pessoas com esta doença, de modo a avaliar o grau de controlo glicémico e a eficiência da terapêutica¹⁰¹. Um resultado de HbA_{1c} ≥ 6,5% pode ser considerado para diagnóstico de diabetes mellitus, contudo, deve-se ter em consideração o valor da concentração de glicose no sangue em jejum e os valores da prova de tolerância à glicose oral¹⁰¹. Durante o período de estágio, o doseamento de hemoglobina glicosilada foi realizado em dois equipamentos: o sistema *Hb9210™ Premier* (A. Menarini Diagnostics S.r.l., Itália) e o *Adams™ A_{1c} HA-8180T* (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japão).

4.2.4.1. Sistema *Hb9210™ Premier*

No Labocentro, o sistema *Hb9210™ Premier* realiza o doseamento de hemoglobina glicosilada em amostras de sangue total⁹⁹.

Durante o período de estágio, em primeiro lugar, o sistema foi ativado. Neste procedimento, o analisador equilibra a coluna para que esta atinja as condições ideais ao processamento das amostras⁹⁹. Assim que o equipamento se encontrou operacional, procedeu-se à realização da calibração e dos controlos, na gama normal e elevada (diabética). Para isso, utilizaram-se os níveis 1 e 2 dos controlos *Hemoglobin A_{1c} Controls* (Trinity Biotech, Irlanda) e os níveis 1 e 2 dos calibradores *Hemoglobin A_{1c} Calibrators* (Trinity Biotech, Irlanda). Tanto os controlos como os calibradores liofilizados foram armazenados entre 2°C e 8°C e, após reconstituição com o reagente *Menarini Premier Hb9210 Dil Reagent* (Trinity Biotech, Irlanda), foram armazenados entre -18°C e -25°C^{102,103}. A análise das amostras foi realizada segundo o princípio da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de afinidade borónica⁹⁹. Neste método, a coluna analítica contém ácido aminofenilbórico ligado a um suporte de polímero poroso (gel)⁹⁹. Primeiramente, as amostras são injetadas na coluna durante o fluxo do reagente

Premier Hb9210™ Buffer A (Trinity Biotech, Irlanda)⁹⁹. O componente glicosilado fica retido na coluna através da ligação ao boronato, enquanto o componente não glicosilado passa pela coluna até ao detetor espectrofotométrico (413 ± 2 nm)⁹⁹. Depois, o sistema bombeia de forma gradual o reagente *Premier Hb9210™ Buffer B* (Trinity Biotech, Irlanda), que leva à eluição do componente glicosilado, que chega ao detetor⁹⁹. Com base no tempo de retenção específico de cada molécula, é possível quantificar a hemoglobina glicosilada em percentagem (%HbA_{1c}) ou em relação à hemoglobina total (mmol/mol)⁹⁹.

4.2.4.2. Sistema *Adams™ A_{1c} HA-8180T*

O equipamento *ADAMS™ A_{1c} HA-8180T*, tal como o sistema *Hb9210™ Premier*, é um analisador automático de hemoglobina glicosilada. Contudo, neste caso, é possível também realizar a pesquisa de hemoglobinopatias¹⁰⁴. Assim, analisa-se a HbA_{1c}, HbA₂ e HbF e deteta-se ainda a hemoglobina C (HbC), a hemoglobina S (HbS), a hemoglobina E (HbE) e a hemoglobina D (HbD) em amostras de sangue total¹⁰⁴. Estas moléculas são variantes da hemoglobina, com as seguintes alterações: substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição 6 da cadeia β (HbC), substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β (HbS), substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição 26 da cadeia β (HbE) e substituição do ácido glutâmico pela glutamina na posição 121 da cadeia β (HbD)¹⁰⁵.

Em primeiro lugar, foi automaticamente iniciado o procedimento de preparação para a análise, no qual o analisador foi aquecido e foi retirado o ar presente no seu interior¹⁰⁴. Posteriormente, analisaram-se diariamente os níveis 1 e 2 dos controlos de HbF e HbA₂ *extendSURE™* (Canterbury Scientific, Nova Zelândia) e os níveis 1 e 2 do *Glyco Hb Control* (A. Menarini Diagnostics S.r.l., Itália). Estes foram armazenados entre 2°C e 8°C. Tanto os controlos de HbA₂ e HbF como os controlos de HbA_{1c} foram reconstituídos com o *Reconstituent 80* (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japão)¹⁰⁶. Após a reconstituição, foram armazenados entre -18°C e -25°C e antes da sua utilização foram colocados a temperatura ambiente e diluídos. A calibração foi realizada quando necessária. De seguida, as amostras foram processadas de acordo com o princípio de *HPLC* de troca catiónica em fase inversa¹⁰⁴. Este método permite separar os diferentes tipos de hemoglobina (HbA_{1c}, HbA₂ e HbF) e as suas variantes (HbS, HbC, HbE e HbD) com base na sua afinidade com a fase estacionária¹⁰⁴. A fase estacionária encontra-se na coluna de cromatografia carregada negativamente, enquanto a fase móvel corresponde às soluções de eluente que fazem a amostra percorrer a coluna¹⁰⁴. Primeiro, a amostra

é introduzida na coluna com o *eluent 80A* (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japão), de baixa força iônica¹⁰⁴. Nesta etapa, as moléculas carregadas positivamente ligam-se à coluna¹⁰⁴. De seguida, é adicionado, de forma gradual, o *eluent 80B* (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japão), de elevada força iônica¹⁰⁴. Este compete com as moléculas carregadas positivamente, entre as quais a hemoglobina, pela ligação à coluna, levando a que alcancem o detetor (420 nm/500 nm)¹⁰⁴. Tendo por base o tempo de retenção característico de cada tipo e variante de hemoglobina é possível proceder à sua identificação e quantificação (mmol/mol ou %)¹⁰⁴. No fim, o equipamento imprime automaticamente um relatório de cromatograma, com os picos correspondentes ao perfil de eluição, para cada amostra¹⁰⁴.

Sempre que foi detetada a presença de HbS numa amostra, realizou-se o ensaio manual *HbS Solubility Screening kit* (Helena BioSciences Europe, Reino Unido). Este utiliza um reagente que contém hidrossulfito de sódio. O reagente foi armazenado entre 2°C e 8°C e, depois de ressuspendido, apresentou 7 dias de estabilidade¹⁰⁷. Antes da sua utilização, foi colocado entre 15°C e 30°C e misturado por inversão¹⁰⁷. Na realização do ensaio, adicionaram-se 20 µL de sangue total em *EDTA K₃* a 2 mL de reagente¹⁰⁷. Misturou-se bem e deixou-se repousar durante 7 minutos. Na presença de saponina, os eritrócitos hemolisam, havendo libertação de hemoglobina, que é reduzida pelo hidrossulfito de sódio¹⁰⁸. A hemoglobina S reduzida torna-se cristalóide, conferindo um aspeto turvo à solução¹⁰⁸. A turbidez da amostra foi avaliada com recurso a linhas de visualização. Caso as linhas não sejam visíveis através do tubo, o resultado é positivo (Figura 4.16)¹⁰⁷. Caso as linhas sejam claramente visíveis através do tubo, é negativo¹⁰⁷.



Figura 4.16: Teste de solubilidade da HbS. A hemólise dos eritrócitos leva à libertação de hemoglobina que é reduzida pelo hidrossulfito de sódio. A HbS reduzida torna-se cristalóide, conferindo um aspeto turvo à solução. Num resultado negativo, as linhas de visualização são claramente visíveis através do tubo. Num resultado positivo, tal como acontece na imagem, as linhas não são observáveis. Figura do autor.

4.2.5. Grupo sanguíneo e reação de Coombs

Em Portugal, a determinação do grupo sanguíneo e da reação de Coombs é, habitualmente, realizada na área da imunohemoterapia. Contudo, existem laboratórios, como é o caso do Labocentro, que realizam estes ensaios na secção de hematologia.

O grupo sanguíneo é obtido pela deteção dos antigénios à superfície dos eritrócitos de cada indivíduo¹⁰⁹. De acordo com a *International Society of Blood Transfusion*, até ao momento, já foram identificados cerca de 43 sistemas antigénicos eritrocitários¹¹⁰. O sistema AB0, descoberto em 1900 por Karl Landsteiner, foi o primeiro sistema eritrocitário a ser identificado, continuando, hoje em dia, a ser o mais importante na área transfusional e da transplantação¹¹¹. Este sistema é definido pela presença ou ausência dos antigénios A e/ou B nos eritrócitos humanos e pela presença de anticorpos no plasma ou soro contra o(s) antigénio(s) em falta nos eritrócitos¹⁰⁹. Estes anticorpos são produzidos naturalmente após exposição aos antigénios A e/ou B, existindo de forma constante¹¹¹. O segundo sistema eritrocitário mais importante em medicina transfusional e de transplantação é o sistema *Rhesus*¹¹¹. Já foram identificados mais de 50 antigénios deste grupo, sendo o antigénio D clinicamente mais significativo¹⁰⁹. É com base na presença ou ausência do antigénio D que se define um estado de Rh⁺ ou Rh⁻, respetivamente¹¹¹. Para além deste, existem outros 4 antigénios comumente avaliados: E, C, e, c¹⁰⁹. Neste caso, a produção de anticorpos apenas ocorre por sensibilização¹¹¹.

O teste de antiglobulina consiste na deteção de anticorpos anti-eritrocitários, que levam à hemólise dos glóbulos vermelhos¹¹². Este princípio foi descrito por Moreschi em 1908¹¹³, mas apenas foi introduzido na prática clínica laboratorial em 1945, após a publicação de Coombs¹¹⁴. Desta forma, o método passou a ser designado por reação de Coombs, podendo ocorrer de forma direta ou indireta. A reação de Coombs direta permite a deteção de eritrócitos sensibilizados *in vivo* por anticorpos ou frações do complemento¹¹². A reação de Coombs indireta deteta anticorpos anti-eritrocitários presentes no soro ou plasma do indivíduo, por sensibilização dos eritrócitos *in vitro*¹¹². Esta reação permite a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), ou seja, todos os anticorpos anti-eritrocitários não-AB0, possibilitando a deteção de anticorpos clinicamente significativos na amostra.

Durante o período de estágio, realizou-se a determinação do grupo sanguíneo dos sistemas AB0 e Rh (D), a reação de Coombs direta e a PAI no equipamento *WADiana*[®] *Compact* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha).

4.2.5.1. Sistema *WADiana*[®] *Compact*

O sistema *WADiana*[®] *Compact* é um equipamento automático que realiza técnicas de imuno-hematologia em gel¹¹⁵.

Durante o período de estágio, em primeiro lugar, iniciou-se o programa *WADiana*. Nesta altura é feita uma verificação automática interna, assegurando o bom funcionamento de todos os elementos¹¹⁵. Às terças-feiras e quintas-feiras foram realizados os controlos *Extended IV Control* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha) antes do processamento das amostras. Estes foram armazenados entre 2°C e 8°C¹¹⁶. Depois de se indicar manualmente os testes (grupo sanguíneo, reação de *Coombs* direta ou PAI) a realizar em cada amostra, o dispositivo verifica o carregamento de todas as amostras, reagentes e cartões de teste necessários à realização dessas técnicas¹¹⁵. A realização dos ensaios tem por base a técnica de gel, descrita por Yves Lapiere¹¹⁷, para deteção de reações de aglutinação de eritrócitos.

Para a determinação dos grupos sanguíneos dos sistemas ABO e Rh foram utilizados cartões *DG Gel Confirm* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha). Estes foram armazenados na vertical entre 2°C e 8°C, sendo colocados a temperatura ambiente antes da realização do ensaio¹¹⁸. Cada cartão possui 8 microtubos compostos por uma coluna e uma câmara de incubação no topo, todos com azida de sódio (NaN₃) como conservante numa concentração final de 0,09%¹¹⁸. A coluna é constituída por uma solução de gel tamponada com anticorpos monoclonais específicos: microtubo A (anti-A monoclonal - mistura de anticorpos IgM e IgG de ratinho), microtubo B (anti-B monoclonal - anticorpos IgM de ratinho), microtubo D^{V+} (anti-D monoclonal - mistura de anticorpos IgG e IgM de origem humana) e microtubo Ctl (controlo - solução tamponada sem anticorpos)¹¹⁸. Para cada ensaio foram utilizados 4 microtubos.

Na determinação do grupo sanguíneo, a amostra (eritrócitos) é diluída com diluente *DG Gel Sol* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha). O diluente foi armazenado entre 2°C e 8°C, sendo colocado a temperatura ambiente antes da realização do ensaio¹¹⁹. Esta solução de baixa força iónica facilita a ligação dos anticorpos aos antígenos eritrocitários¹¹⁹. De seguida, a amostra diluída é introduzida nos microtubos, seguindo-se um período de incubação e de centrifugação¹¹⁸. Caso os antígenos dos eritrócitos da amostra reajam com os anticorpos presentes na solução de gel, ocorre aglutinação¹¹⁸. Os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel (resultado positivo), contrariamente aos eritrócitos não aglutinados que se concentram no fundo do microtubo, formando um sedimento (resultado negativo)¹¹⁸, como indicado na Figura 4.17.

Na realização da reação de Coombs direta ou PAI foram utilizados cartões *DG Gel Coombs* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha), armazenados a temperatura ambiente¹²⁰. Tal como os cartões *DG Gel Confirm*, cada um contém 8 microtubos compostos por uma coluna e uma câmara de incubação no topo, todos com azida de sódio (NaN₃) como conservante numa concentração final de 0,09%¹²⁰. A coluna é constituída por uma solução de gel tamponada, com baixa força iónica, composta por uma mistura de anticorpos anti-IgG humana policlonais de coelho e de anticorpos IgM anti-C3d monoclonais de rato¹²⁰. Para cada ensaio de reação de Coombs direta foi necessário 1 microtubo e para cada ensaio de PAI foram necessários 2.

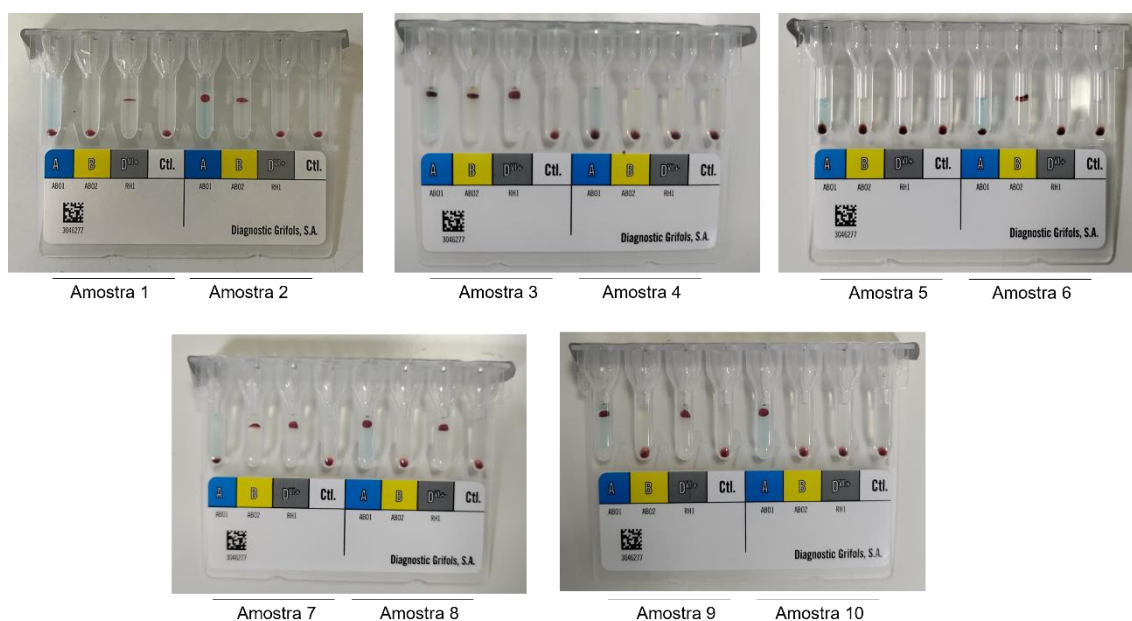


Figura 4.17: Determinação do grupo sanguíneo no sistema *WADiana® Compact*. Se os antígenios eritrocitários da amostra reagirem com os anticorpos (anti-A, anti-B e anti-D) nos microtubos, ocorre aglutinação. O microtubo Ctl serve de controlo, não possuindo anticorpos. Num resultado positivo, os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel, enquanto num resultado negativo os eritrócitos formam um sedimento. Na figura encontram-se os cartões *DG Gel Confirm* após o fim da reação, com os seguintes resultados: grupo O⁺ (amostra 1), grupo AB⁻ (amostra 2), grupo AB⁺ (amostra 3), grupo O⁻ (amostras 4 e 5), grupo B⁻ (amostra 6), grupo B⁺ (amostra 7), grupo A⁺ (amostras 8 e 9) e grupo A⁻ (amostra 10). Figura do autor.

Na reação de Coombs direta, em primeiro lugar, a amostra (eritrócitos) é diluída com o diluente *DG Gel Sol*¹²⁰. De seguida, é introduzida nos microtubos, seguindo-se um período de incubação e de centrifugação¹²⁰. Caso existam, na amostra, eritrócitos sensibilizados por anticorpos humanos IgG ou frações do complemento, estes reagem com os anticorpos presentes na coluna de gel, ocorrendo aglutinação¹²⁰. Na PAI são utilizados os eritrócitos reagentes *Serascan Diana 2* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha)¹²¹. Estes 2 reagentes consistem numa suspensão pronta a utilizar de 0,8% de

eritrócitos do grupo 0 produzidos por um dador individual para cada frasco¹²¹. Os reagentes encontram-se numa solução tamponada com conservantes (neomicina a 0,010% (p/v) e cloranfenicol a 0,017% (p/v)) e são armazenados entre 2°C e 8°C¹²¹. Estes eritrócitos possuem os determinantes antigénicos mais significativos para a maioria dos sistemas de grupos sanguíneos¹²¹. Depois da homogeneização dos reagentes, cada um é adicionado a um microtubo¹²⁰. Depois, junta-se a amostra (plasma), seguindo-se um período de incubação e de centrifugação¹²⁰. Se na amostra existirem anticorpos contra os antígenos eritrocitários presentes nos reagentes, ocorre aglutinação¹²⁰. Tanto na reação de Coombs direta como na PAI, os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel (resultado positivo), contrariamente aos eritrócitos não aglutinados que se concentram no fundo do microtubo, formando um sedimento (resultado negativo)¹²⁰, como demonstrado na Figura 4.18.



Figura 4.18: Reação de Coombs direta e PAI no sistema *WADiana® Compact*. Na reação de Coombs direta, os eritrócitos sensibilizados por anticorpos humanos IgG ou frações do complemento na amostra reagem com os anticorpos na coluna de gel, ocorrendo aglutinação. Na PAI, a aglutinação ocorre se a amostra apresentar anticorpos contra os antígenos eritrocitários dos reagentes. Num resultado positivo, os eritrócitos aglutinados são capturados na coluna de gel, enquanto num resultado negativo os eritrócitos formam um sedimento. **A:** Resultado negativo (poços 1-4 e 6-8) e positivo (poço 5). **B:** Resultado negativo (poços 1-4, 7 e 8) e positivo (poços 5 e 6). **C:** Resultado negativo (poços 1 e 2), positivo (poços 3 e 4) e os poços 5-8 estão por utilizar. Figura do autor.

Estes ensaios foram realizados em amostras em *EDTA K₃*. Antes de serem introduzidas no equipamento, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm. Também os cartões foram centrifugados durante 9 minutos a 990 rpm ± 10 rpm na centrífuga *DG Spin* (Diagnostic Grifols S.A., Espanha).

4.2.6. Ensaios de hemostase

A hemostase é um processo fisiológico que consiste na interrupção do sangramento num local de lesão vascular, através da formação de um coágulo sanguíneo composto essencialmente por plaquetas e fibrina¹²². Este mecanismo tem 2 componentes principais: a hemostase primária e a hemostase secundária.

A hemostase primária corresponde à formação do rolhão plaquetário¹²². Normalmente, as células endoteliais libertam moléculas que impedem a agregação

plaquetária e a adesão das plaquetas aos vasos sanguíneos, mantendo um fluxo sanguíneo normal. Contudo, em caso de lesão vascular, as plaquetas são expostas à matriz subendotelial, havendo a sua adesão e ativação¹²². Isto ocorre através da ligação das plaquetas ao fator von Willebrand, secretado pelas células endoteliais¹²². As plaquetas ativadas secretam moléculas que ativam outras plaquetas, começando a formar-se um agregado plaquetário no local lesionado¹²². A adesão plaqueta-plaqueta é mantida através da glicoproteína IIb/IIIa, um recetor de fibrinogénio¹²².

A hemostase secundária diz respeito à deposição de fibrina insolúvel no rolhão plaquetário, de modo a fortalecer e estabilizar o coágulo sanguíneo¹²². Na ausência de lesão vascular, a cascata de coagulação não é ativada devido aos mecanismos de anticoagulação¹²². Contudo, quando existe lesão, são ativadas as 3 vias da cascata de coagulação: a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum, como indicado na Figura 4.19. A via intrínseca é a maior e começa pela ativação do fator XII pelas cargas negativas presentes na membrana celular das plaquetas devido aos fosfolípidos. De seguida, o fator XII ativado (XIIa) ativa o fator XI e o fator XI ativado (XIa) ativa o fator IX¹²³. Na presença do cofator Ca^{2+} , o fator IX ativado (IXa) forma um complexo com o fator VIII, ativando o fator X¹²³. Nesta fase é iniciada a via comum, na qual o fator X ativado (Xa) e o fator V ativado (Va), na presença de Ca^{2+} , formam um complexo denominado protrombinase, que converte a protrombina (fator II) a trombina (fator IIa). Posteriormente, a trombina converte o fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel¹²³. A trombina ativa ainda o fator XIII, na presença de Ca^{2+} . O fator XIII ativado (XIIIa) leva à formação de *crosslinks* entre a fibrina e à sua deposição no rolhão plaquetário, de modo a estabilizar o coágulo sanguíneo. A via extrínseca inicia-se com a secreção do fator tecidual (fator III) pelas células endoteliais lesionadas¹²³. O fator III ativa o fator VII, que ativa o fator X, iniciando a via comum já descrita anteriormente¹²³.

Outro conceito importante é o de fibrinólise, um processo de dissolução dos coágulos sanguíneos de modo a restaurar o normal fluxo sanguíneo¹²². Para isso, o plasminogénio é convertido em plasmina, uma enzima que degrada a camada de fibrina presente no coágulo sanguíneo¹²². Desta degradação resulta a libertação de fibrinogénio e d-dímeros.

Laboratorialmente, a via extrínseca da coagulação é avaliada através do tempo de protrombina (PT), enquanto a via intrínseca é avaliada pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). A avaliação da via comum tem por base a determinação do tempo de trombina, que consiste no tempo de coagulação após a adição de trombina. No entanto, este ensaio não foi realizado no Labocentro, durante o período de estágio.

A determinação de PT e aPTT realizou-se no sistema *BCS[®]XP* (Siemens Healthcare, Alemanha).

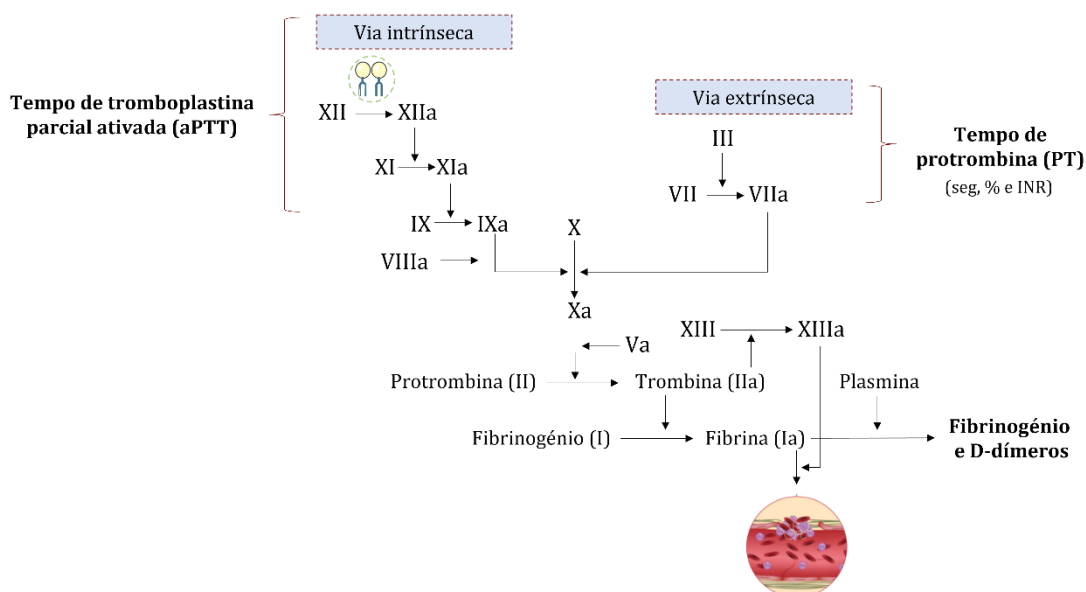


Figura 4.19: Representação das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação. Adaptado de *Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis e Physiology, Coagulation Pathways* ^{122,123}.

4.2.6.1. Sistema *BCS[®]XP*

O sistema *BCS[®]XP* é um sistema de coagulação automático que realiza ensaios coagulométricos, cromogénicos e imunoquímicos¹²⁴. No Labocentro, durante o período de estágio, foi realizada a determinação de PT, aPTT, fibrinogénio e d-dímeros. O doseamento de d-dímeros foi feito de acordo com a data de saída. O fibrinogénio foi analisado à segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira. Os restantes parâmetros foram avaliados todos os dias.

Em primeiro lugar, foi executada a inicialização do sistema, etapa na qual foram efetuadas todas as lavagens de forma automática¹²⁴. Assim que o analisador se encontrou operacional, os reagentes foram adicionados ao *reagent cooler* para serem arrefecidos até aos 15°C ¹²⁴.

Os reagentes utilizados no *BCS[®]XP* foram: o *Pathromtin[®] SL* (Siemens Healthcare, Alemanha) para a determinação de aPTT, o *Thromborel[®] S* (Siemens Healthcare, Alemanha) para a determinação de PT e o CaCl₂ (Siemens Healthcare, Alemanha) que foi adicionado à mistura de reação para neutralizar o citrato de sódio e desencadear o processo de coagulação. Para a determinação de d-dímeros utilizou-se o ensaio *Innovance[®] D-Dimer* (Siemens Healthcare, Alemanha). Todos os reagentes foram armazenados entre 2°C e 8°C. O *Thromborel[®] S* foi reconstituído em 10 mL de água

para preparações injetáveis (Labesfal, Portugal) e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizado pela primeira vez¹²⁵. O reagente do ensaio *Innovance*[®] *D-Dimer* foi reconstituído em 4 mL de água destilada e incubado 15 minutos a temperatura ambiente antes da primeira utilização¹²⁶. Depois de abertos, os constituintes do ensaio *Innovance*[®] *D-Dimer* foram armazenados entre -18°C e -25°C.

Após a adição dos reagentes ao equipamento foram realizados os controlos. À segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira foi feito o controlo patológico *Dade*[®] *Ci-Trol*[®] *Coagulation Control Level 2* (Siemens Healthcare, Alemanha), enquanto à terça-feira e quinta-feira se realizou o controlo não patológico *Control Plasma N* (Siemens Healthcare, Alemanha). Nos dias de determinação de d-dímeros utilizaram-se os controlos *Innovance*[®] *D-dimer* (Siemens Healthcare, Alemanha), de nível 1 e de nível 2. Todos os controlos foram reconstituídos em 1 mL de água destilada e incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes da primeira utilização¹²⁷⁻¹²⁹.

Sempre que se utilizou um novo lote do reagente *Thromborel*[®] *S* foi necessário realizar a calibração do tempo de protrombina. Nesse caso, utilizou-se o *PT-Multi Calibrator* (Siemens Healthcare, Alemanha) composto por 5 plasmas de calibração. Os calibradores foram reconstituídos com água destilada e incubados entre 15°C e 30°C durante 30 minutos antes da primeira utilização¹³⁰.

Posteriormente, procedeu-se ao processamento das amostras previamente centrifugadas (10 minutos a 4000 rpm). Durante todo o tempo de reação foi mantida uma temperatura constante de 37°C na cuvete de reação. O uso de citrato de sódio nos ensaios de coagulação deve-se ao facto deste anticoagulante ser um quelante do cálcio, evitando que o processo de coagulação seja desencadeado antes do início do teste.

Como já referido, este equipamento realiza 3 tipos de medições: coagulométricas, cromogénicas e imunoquímicas¹²⁴. Os ensaios de coagulometria determinam o tempo de coagulação, isto é, o tempo desde a mistura do preparado até à formação de um coágulo de fibrina¹²⁴. Neste tipo de ensaio, os coágulos são detetados turbidimetricamente. Isto, porque a formação de fibrina reduz a quantidade de luz transmitida devido ao aumento da turvação¹²⁴. As determinações de PT e de aPTT foram realizadas segundo este método^{125,131}.

Nas reações cromogénicas, os parâmetros são medidos enzimaticamente recorrendo, para isso, a substratos cromogénicos¹²⁴. Neste caso, se o parâmetro em estudo estiver presente na amostra, a sua atividade leva à formação de um pigmento. A absorvância é medida por fotometria e recorre-se à curva de calibração para determinar a concentração de enzima em estudo¹²⁴. Este ensaio pode ser utilizado ainda

para determinar inibidores enzimáticos¹²⁴. Neste caso, se o inibidor estiver presente na amostra, parte da atividade enzimática é inibida¹²⁴. A restante atividade é medida através de um cromogénio específico¹²⁴.

Nos ensaios imunquímicos, a amostra reage com anticorpos específicos ligados a partículas de *latex*¹²⁴. Caso o parâmetro em estudo se encontre na amostra, formam-se agregados devido à ligação antígeno-anticorpo¹²⁴. Estes agregados levam a uma alteração da turvação que é medida turbidimetricamente¹²⁴. A velocidade dessa alteração é determinada e, por comparação com a curva de calibração, é obtida a concentração do parâmetro em estudo. A avaliação de d-dímeros foi realizada segundo este método¹²⁶.

Na determinação de PT, adicionou-se o *Thromborel*[®] S à amostra, um reagente preparado a partir do fator tecidual de placenta humana¹²⁵. Na presença de CaCl₂, é ativada a via extrínseca da coagulação. O resultado da determinação de PT é dado em segundos, em percentagem e segundo a razão normalizada internacional (*INR*)¹²⁵.

Para a determinação de aPTT, o *Pathromtin SL*, constituído por quantidades ótimas de fosfolípidos e um ativador de superfície, foi adicionado à amostra para ativar o fator XII¹³¹. Após um período de incubação, foi adicionado o CaCl₂ para desencadear o processo de coagulação.

Para a quantificação de d-dímeros foi utilizado o ensaio *Innovance*[®] *D-Dimer*. Neste caso, são utilizadas partículas de poliestireno covalente revestidas com anticorpo monoclonal (8D3) de ratinho, que na presença de d-dímeros levam à formação de agregados que aumentam a turvação¹²⁶. Assim, através de um método imunoturbidimétrico foi possível determinar a concentração de d-dímeros nas amostras.

A concentração de fibrinogénio foi derivada a partir da alteração da densidade ótica obtida na determinação do tempo de protrombina¹²⁵. O resultado foi obtido por comparação com a curva de calibração.

No final do dia, após todas as amostras terem sido analisadas, foi realizada a manutenção diária. Nesta, os tubos, seringas e pipetas foram desinfetados e lavados, o manuseador do rotor deitou os rotores de cuvetes usados para o recipiente de resíduos e o leitor fez a leitura de todas as filas de suporte e de todos os suportes¹²⁴.

5. Fase pós-analítica

A fase pós-analítica é a última fase do processo laboratorial e, segundo a ISO 15189:2012, “engloba os processos que se seguem aos exames laboratoriais e que incluem a revisão dos resultados, retenção e armazenamento do material clínico, eliminação de amostras (e resíduos), formatação, libertação, transmissão e arquivo dos resultados dos exames”. Nesta etapa, os especialistas em análises clínicas do Labocentro realizam a interpretação e validação biopatológica dos resultados, tendo em conta as variáveis pré-analíticas, as informações clínicas disponíveis e os resultados obtidos anteriormente. Posteriormente, é obtido um relatório de exames laboratoriais com resultados claros e não ambíguos que, após a validação pelo especialista, é entregue ao utente em tempo útil. Quando solicitado e em determinadas situações, a informação é comunicada oralmente ao utente ou ao médico prescriptor.

6. Casos Laboratoriais

Abaixo são apresentados e interpretados alguns casos laboratoriais nas áreas da hematologia e da imunologia, avaliados no Labocentro. É necessário ter em atenção que apenas são apresentadas algumas análises realizadas pelos utentes, não sendo referido o seu historial clínico. Desta forma, os casos apresentados não permitem o diagnóstico, servindo apenas para interpretação dos parâmetros em estudo.

6.1. Hematologia

Caso Laboratorial 1: Na Figura 6.1 encontram-se os parâmetros do hemograma e a VSE de uma senhora de 42 anos. Analisando os resultados, a utente apresenta anemia microcítica hipocrômica, uma ligeira anisocitose eritrocitária e uma leucopenia ligeira. Perante este tipo de anemia, será relevante avaliar os níveis de ferro e ferritina séricos, bem como a saturação da transferrina e a capacidade total de ligação ao ferro, de modo a entender se existe deficiência de ferro, a causa mais comum de anemia a nível global¹³². Para além disso, será pertinente realizar o cálculo de índices hematológicos (ex.: índice de Mentzer) para o diagnóstico diferencial de anemia ferropénica e de beta-talassémia¹³³. Os restantes parâmetros do hemograma encontram-se dentro dos valores de referência. Tal como é comumente observado em situações de anemia, a VSE também está aumentada⁹⁵.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores
HEMATOLOGIA				
Hematologia Geral				
Hemograma (Impedância-laser)				
Eritrócitos	4,16	$\times 10^{12}/L$	3,90 - 5,30	
Hemoglobina	8,3	g/dL	12,0 - 16,0	
Hematócrito	27,5	%	35,0 - 46,0	
V.G.M.	66,0	fL	78,0 - 97,0	
H.G.M.	20,0	pg/célula	26,0 - 32,5	
C.H.G.M.	30,3	g/dL	31,5 - 36,5	
RDW	14,8	%	< 14,5	
Leucócitos	3,8	$\times 10^9/L$	4,0 - 10,0	
Neutrófilos	1,46	38,4 $\times 10^9/L$ [%]	1,4 - 7,0	
Eosinófilos	0,08	2,1 $\times 10^9/L$ [%]	< 0,5	
Basófilos	0,10	2,6 $\times 10^9/L$ [%]	< 0,3	
Linfócitos	1,99	52,4 $\times 10^9/L$ [%]	0,7 - 4,5	
Monócitos	0,18	4,7 $\times 10^9/L$ [%]	0,1 - 1,1	
Plaquetas	351	$\times 10^9/L$	150 - 500	
Morfologia	Microcitose ligeira observada em esfregaço de sangue periférico.			
Velocidade de Sedimentação (Westergren modificado / Westergren)	30	mm/h	< 20	

Figura 6.1: Resultados obtidos após realização do hemograma e da VSE de uma senhora de 42 anos. Figura do autor.

Caso Laboratorial 2: Na Figura 6.2 encontra-se o hemograma de um senhor de 83 anos. O utente apresenta anemia normocítica normocrômica, com eritropenia, leucopenia e trombocitopenia acentuadas. Esta diminuição das 3 linhagens hematológicas designa-se por pancitopenia¹³⁴. A confirmação foi realizada por observação do esfregaço de sangue periférico. O valor da contagem de plaquetas pode estar falsamente diminuído devido a satelitismo plaquetário, plaquetas gigantes ou aglutinação plaquetária devido a aglutininas frias ou induzida pelo anticoagulante¹³⁵. Nesse sentido, por vezes é solicitada uma repetição da contagem de plaquetas utilizando citrato de sódio como anticoagulante^{135,136}. A ausência de coágulos na amostra foi confirmada. Este hemograma é característico de uma condição de aplasia medular, na qual existe diminuição da produção dos elementos figurados do sangue pela medula óssea¹³⁴. A aplasia da medula é uma doença hematopoiética com elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas, o que se deve principalmente à frequência com que ocorrem hemorragias e infeções nestes indivíduos¹³⁷. Quando se desconfia desta patologia, deve-se avaliar o historial clínico do utente, realizar o hemograma com contagem de reticulócitos, esfregaço de sangue periférico e ainda o mielograma e biópsia da medula óssea¹³⁷. Devem também ser realizados testes adicionais para identificação de causas responsáveis pela pancitopenia¹³⁷. O tratamento desta condição passa principalmente pelo transplante de medula óssea ou pela terapia imunossupressora¹³⁷. Em casos de trombocitopenia bastante acentuada recomenda-se uma transfusão de plaquetas devido ao risco de hemorragias espontâneas¹³⁸.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores 12/11/2020
HEMATOLOGIA				
Hematologia Geral				
12-11-2020				
Hemograma (Impedância+Iaser)				
Eritrócitos	2,23	x10 ¹² /L	4,30 - 5,70	2,60
Hemoglobina	6,7	g/dL	13,0 - 17,5	8,0
Hematócrito	19,4	%	38,0 - 48,0	23,5
V.G.M.	87,0	fL	78,0 - 97,0	90,3
H.G.M.	30,1	pg/célula	26,0 - 32,5	30,6
C.H.G.M.	34,5	g/dL	31,5 - 36,5	33,9
RDW	12,8	%	< 14,5	14,4
Leucócitos	1,5	x10 ⁹ /L	4,0 - 10,0	1,6
Neutrófilos	0,28	18,7 x10 ⁹ /L [%]	1,4 - 7,0	0,25 15,6
Eosinófilos	0,02	1,3 x10 ⁹ /L [%]	< 0,5	0,02 1,3
Basófilos	0,01	0,7 x10 ⁹ /L [%]	< 0,3	0,02 1,3
Linfócitos	1,08	72,0 x10 ⁹ /L [%]	0,7 - 4,5	1,18 73,8
Monócitos	0,11	7,3 x10 ⁹ /L [%]	0,1 - 1,1	0,09 5,6
Plaquetas	97	x10 ⁹ /L	150 - 500	177
Morfologia	Pancitopénia confirmada pela observação do esfregaço de sangue periférico.			

Figura 6.2: Resultados obtidos no hemograma de um senhor de 83 anos. Figura do autor.

Caso Laboratorial 3: Na Figura 6.3 encontram-se os resultados do hemograma de um senhor de 61 anos. O utente apresenta uma trombocitopenia muito acentuada. Foi confirmada a ausência de coágulos na amostra. Comparativamente ao caso Laboratorial 2, este senhor terá um maior risco de hemorragias espontâneas devido ao reduzido número de plaquetas. Para além disso, o utente apresenta anemia macrocítica normocrômica. Nesse sentido, será relevante avaliar os níveis de vitamina B12 e de ácido fólico, já que uma deficiência destas moléculas origina uma maturação megaloblástica⁷³. Nessa situação, o tratamento da anemia passa pela administração de vitamina B12 e ácido fólico⁷³. Contudo, é necessário ter em atenção que pode existir macrocitose em anemias não-megaloblásticas, nas quais a síntese de *DNA* não se encontra comprometida⁷³. A avaliação qualitativa dos elementos figurados do sangue também foi realizada através da observação do esfregaço de sangue periférico, confirmando os resultados.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores
HEMATOLOGIA				
Hematologia Geral				
Hemograma (impedância-laser)				
Eritrócitos	2,97		$\times 10^{12}/L$	4,30 - 5,70
Hemoglobina	11,7		g/dL	13,0 - 17,5
Hematócrito	32,0		%	38,0 - 48,0
V.G.M.	108,0		fL	78,0 - 97,0
H.G.M.	39,3		pg/célula	26,0 - 32,5
C.H.G.M.	36,5		g/dL	31,5 - 36,5
RDW	10,9		%	< 14,5
Leucócitos	4,6		$\times 10^9/L$	4,0 - 10,0
Neutrófilos	2,36	51,3	$\times 10^9/L$ [%]	1,4 - 7,0
Eosinófilos	0,03	0,7	$\times 10^9/L$ [%]	< 0,5
Basófilos	0,11	2,4	$\times 10^9/L$ [%]	< 0,3
Linfócitos	1,30	28,3	$\times 10^9/L$ [%]	0,7 - 4,5
Monócitos	0,75	16,3	$\times 10^9/L$ [%]	0,1 - 1,1
Plaquetas	32		$\times 10^9/L$	150 - 500
Morfologia	Macrocitose ligeira e trombocitopénia acentuada confirmadas pela observação do esfregaço de sangue periférico.			

Figura 6.3: Resultados obtidos no hemograma de um senhor de 61 anos. Figura do autor.

Caso Laboratorial 4: O hemograma de uma senhora de 75 anos encontra-se na Figura 6.4. Observa-se uma leucocitose, com presença de neutrofilia. A utente apresenta ainda anemia normocítica normocrômica, para além de se verificar também a existência de anisocitose eritrocitária, confirmada pela observação do esfregaço de sangue periférico. Analisando os resultados anteriores, a utente não apresentava nenhuma destas alterações, estando todos os parâmetros hematológicos dentro dos valores de referência. À semelhança do caso laboratorial 1, aqui também poderá ser

relevante avaliar os níveis de ferro e ferritina séricos, bem como a saturação da transferrina e a capacidade total de ligação ao ferro, de modo a entender se existe deficiência de ferro¹³². Isto, pois, embora a anemia ferropénica, quando instalada, se classifique como microcítica hipocrómica, num estado inicial, enquanto existirem depósitos de ferro, é classificada como normocítica normocrómica^{132,139}.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores	
				15/02/2022	13/10/2021
HEMATOLOGIA					
Hematologia Geral					
				15-02-2022	13-10-2021
Hemograma (Impedância+Iaser)					
Eritrócitos	3,52	x10 ¹² /L	3,90 - 5,30	4,39	
Hemoglobina	10,1	g/dL	12,0 - 16,0	13,1	
Hematócrito	31,2	%	35,0 - 46,0	39,8	
V.G.M.	88,5	fL	78,0 - 97,0	90,8	
H.G.M.	28,6	pg/célula	26,0 - 32,5	29,8	
C.H.G.M.	32,3	g/dL	31,5 - 36,5	32,8	
RDW	17,7	%	< 14,5	12,0	
Leucócitos	11,5	x10 ⁹ /L	4,0 - 10,0	8,5	
Neutrófilos	8,26	71,8	x10 ⁹ /L [%]	1,4 - 7,0	4,44 52,2
Eosinófilos	0,01	0,1	x10 ⁹ /L [%]	< 0,5	0,16 1,9
Basófilos	0,09	0,8	x10 ⁹ /L [%]	< 0,3	0,06 0,7
Linfócitos	2,13	18,5	x10 ⁹ /L [%]	0,7 - 4,5	2,99 35,2
Monócitos	1,05	9,1	x10 ⁹ /L [%]	0,1 - 1,1	0,85 10,0
Plaquetas	423	x10 ⁹ /L	150 - 500	181	
Morfologia	Anisocitose ligeira confirmada pela observação do esfregaço de sangue periférico.				

Figura 6.4: Resultados obtidos no hemograma de uma senhora de 75 anos. Figura do autor.

6.2. Imunologia

Caso Laboratorial 5: Foi solicitada a determinação qualitativa do antígeno p24 do VIH e/ou de anticorpos anti-VIH-1/2 para um senhor de 53 anos, tendo sido obtido um resultado reativo (valor do *cut-off* = 763,23). Nesse sentido, de acordo com a rotina do laboratório, foi pedida uma repetição de colheita para nova realização do ensaio. Tal como esperado, o resultado manteve-se reativo (valor do *cut-off* = 803,20), confirmando a infeção pelo VIH. Como este ensaio não permite distinguir entre uma infeção pelo VIH-1 ou VIH-2, foi realizado o ensaio confirmatório *Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay* para esse fim²¹. Na Figura 6.5 encontram-se os resultados obtidos. Verificou-se a presença da banda controlo e das 4 bandas que contêm antígenos do VIH-1. Deste modo, foram detetados anticorpos contra as glicoproteínas gp160 e gp 41 codificadas pelo gene *env*, a proteína p24 codificada pelo gene *gag* e a proteína p31 codificada pelo gene *pol*, confirmando a infeção pelo VIH-1^{21,140}.



Figura 6.5: Resultados obtidos para a confirmação da infeção pelo VIH de um senhor de 53 anos. Figura do autor.

Caso Laboratorial 6: Um senhor de 61 anos realizou o doseamento dos marcadores tumorais *CEA*, *AFP* e *CA 19-9*. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.6. Caso o senhor seja fumador, ambos os resultados para os marcadores *CEA* e *AFP* se encontram dentro dos valores de referência. No entanto, obteve-se um valor elevado do marcador *CA 19-9*, pelo que, não existindo resultados anteriores, se repetiu o ensaio para confirmação do resultado. Este marcador está geralmente aumentado no soro de doentes com carcinoma pancreático, no entanto, não é específico desta patologia, podendo estar elevado em doenças benignas como a pancreatite ou outras condições inflamatórias¹⁴¹. Ainda assim, na presença de sintomas, níveis significativamente elevados de *CA 19-9* sugerem que o tumor se encontre num estadio mais avançado¹⁴¹. Por esta razão, é necessário ter em atenção o historial clínico do utente. Para além de

auxiliar o diagnóstico de carcinoma pancreático, este marcador permite ainda avaliar o prognóstico dos doentes e determinar a resposta do tumor à terapêutica^{141,142}.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores
MARCADORES PROTEICOS				
Marcadores Proteicos Geral				
CEA - Antígeno Carcino Embrionário (Químiluminiscência)	6,4	ng/mL		Não fumadores: < 5,0 Fumadores : < 6,9
Alfa Fetoproteína - AFP (Químiluminiscência)	4,0	ng/mL	< 8,1	
CA 19.9 (Químiluminiscência)	136,5 Resultado confirmado por repetição na mesma amostra.	U/mL	< 37,0	

Figura 6.6: Resultados obtidos para o doseamento de marcadores tumorais de um senhor de 61 anos. Figura do autor.

Caso Laboratorial 7: Foi realizada a avaliação da função da tiroide de uma senhora de 71 anos. Para tal, procedeu-se ao doseamento de T₃ total, T₄ livre, TSH, anti-Tg e anti-TPO. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.7. Os parâmetros T₃ total e T₄ livre encontram-se dentro do intervalo de referência, no entanto, o valor da TSH está ligeiramente aumentado. Para além disso, verifica-se a presença de anticorpos contra a tiroglobulina e contra a peroxidase da tiroide. Estes resultados são comuns de uma situação de tiroidite autoimune crónica, a tiroidite mais frequente e a causa mais comum de bócio e hipotiroidismo nos países com uma dieta suficiente em iodo¹⁴³. Esta condição autoimune também pode ser designada por tiroidite linfocítica crónica ou tiroidite de Hashimoto, embora esta última implique a presença de bócio, o que nem sempre se verifica¹⁴³. Inicialmente, os doentes podem ser assintomáticos, contudo, ao longo da doença desenvolvem sintomas progressivos de hipotiroidismo. Doentes que apresentem níveis aumentados de TSH e níveis diminuídos de T₄ livre são indicados para fazer terapêutica. Na presença de níveis aumentados de TSH e de valores de T₄ livre dentro do intervalo de referência, como se verifica neste caso laboratorial, a indicação para terapêutica tem sido alvo de controvérsia, dependendo do clínico¹⁴³.

Caso Laboratorial 8: Na Figura 6.8 encontram-se os resultados do doseamento dos marcadores tumorais CEA, CA 125 e CA 19-9 de uma senhora de 75 anos. Observa-se que todos os marcadores se encontram elevados. O CEA surge aumentado em vários tipos de tumor, não sendo específico de órgão¹⁴⁴. O CA 125 está associado ao carcinoma do ovário e o CA 19-9 ao carcinoma pancreático¹⁴⁴. Ainda que os marcadores tumorais possam estar elevados na ausência de uma neoplasia, estes resultados são bastante indicativos de malignidade¹⁴⁴. Possivelmente, a utente terá um

tumor já metastizado. Tendo por base o historial clínico da senhora e as restantes análises solicitadas, poderão ser necessários testes adicionais para auxílio ao diagnóstico. Contudo, o diagnóstico definitivo apenas será obtido pela anatomia patológica, sendo importante a identificação do tumor primário para orientação da terapêutica.

	Resultado	Unidades	Valores de Referência	Resultados Anteriores	
				06/01/2022	15/09/2021
ENDOCRINOLOGIA					
Tiróide					
T3- Triiodotironina Total (Quimiluminiscência)	86	ng/dL	35 - 193	06-01-2022	15-09-2021
T4 Livre- Tiroxina Livre (Quimiluminiscência)	0,91	ng/dL	0,70 - 1,48	06-01-2022	15-09-2021
TSH - Hormona Tiroestimulante (Quimiluminiscência)	5,37	μUI/mL	0,35 - 4,94	06-01-2022	15-09-2021
Ac. Anti-Tiroglobulina - αTg (Quimiluminiscência)	1144,76	UI/mL	< 4,11	06-01-2022	15-09-2021
Ac. Anti-Tiroperoxidase - αTPO (Quimiluminiscência)	1610,85	UI/mL	< 5,61	06-01-2022	15-09-2021

Figura 6.7: Resultados da avaliação da função da tiroide de uma senhora de 71 anos. Figura do autor.

MARCADORES PROTEICOS					
Marcadores Proteicos Geral					
CEA - Antígeno Carcino Embrionário (Quimiluminiscência)	1204,7	ng/mL		Não fumadores: < 5,0 Fumadores : < 6,9	
CA 125 (Quimiluminiscência)	396,8	U/mL	< 35,0		
CA 19.9 (Quimiluminiscência)	240,3	U/mL	< 37,0		

Figura 6.8: Resultados do doseamento de marcadores tumorais de uma senhora de 75 anos. Figura do autor.

7. Limitações e resolução de problemas

De modo a atingir os objetivos, foram inicialmente estabelecidas metas a cumprir durante o período de estágio que poderiam, ou não, ser alteradas após avaliação do laboratório. Entre essas metas, propunha-se a realização de:

- a) 5 preparações de *buffy-coat*;
- b) 3 testes de fragilidade osmótica;
- c) 3 eletroforeses das hemoglobinas em pH alcalino;
- d) 4 ensaios de falciformação;
- e) 200 reações de nefelometria;
- f) 50 reações de imunofluorescência;
- g) 100 testes de velocidade de sedimentação eritrocitária automática/ manual;
- h) 200 hemogramas;
- i) 50 colorações de *May-Grünwald Giemsa*;
- j) 4 testes da solubilidade da hemoglobina S;
- k) 5 reações de aglutinação e hemaglutinação;
- l) 200 reações imunoenzimáticas,
- m) 200 reações quimioluminescentes;
- n) 200 reações de turbidimetria;
- o) 5 reações de precipitação.

Contudo, algumas das metodologias acima referidas (preparações de *buffy-coat*, fragilidade osmótica, eletroforese das hemoglobinas em pH alcalino, ensaios de falciformação, reações de nefelometria e de imunofluorescência) não são realizadas nas áreas de Imunologia e Hematologia do Labocentro, pelo que estas metas nunca seriam alcançadas durante o estágio. Para além disso, considerando a quantidade de amostras que chegam diariamente ao laboratório, cuja análise é realizada maioritariamente de forma automática, percebeu-se que as metas definidas para a determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária, dos hemogramas, das colorações de *May-Grünwald Giemsa*, dos testes da solubilidade da hemoglobina S e das reações de aglutinação e hemaglutinação, imunoenzimáticas, quimioluminescentes, turbidimétricas e de precipitação seriam rapidamente alcançadas. Posto isto, decidiu-se, após avaliação com o local de estágio, que não faria sentido manter as metas inicialmente estabelecidas.

O número de ensaios realizados, durante o período de estágio, na determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo encontra-se na Tabela Suplementar 12.

Durante o período de estágio, por vezes, surgiram problemas ao nível do funcionamento dos equipamentos. Na maioria dos casos estas questões foram resolvidas através da realização de manutenções, substituição de reagentes ou consumíveis ou pela substituição de peças (seringas, pipetadores, agulhas, *etc*). No entanto, em alguns casos, foi necessário contactar os profissionais responsáveis pelas manutenções dos equipamentos para resolução dos problemas. Embora estas situações não tenham sido recorrentes, acabaram por atrasar o trabalho, levando a que alguns dos ensaios não fossem realizados no próprio dia. Ainda assim, tudo se resolveu e os resultados saíram dentro do prazo.

Outra situação que acabou por limitar, algumas vezes, o trabalho foi a demora na entrega das encomendas dos reagentes ou dos controlos, que levou a que os ensaios não pudessem ser realizados nos dias pretendidos. Contudo, tal como na situação anterior, raramente houve interferência com a data de saída dos resultados.

Embora tenham sido pouco frequentes, existiram ainda alguns casos de colheita errada das amostras biológicas. Nestas situações, foi necessário contactar novamente os utentes para nova colheita, atrasando a análise dos parâmetros solicitados. Felizmente, isto ocorreu poucas vezes, contudo, é uma situação que causa incómodo aos utentes e que deve ser evitada, sendo importante manter o máximo rigor durante a fase pré-analítica para que isso não aconteça.

Como nota final, o estágio correu bem e as tarefas foram realizadas sem grandes limitações ou problemas a resolver. A maioria das questões que surgiram estavam relacionadas com o funcionamento dos equipamentos e dificilmente seriam evitadas, no entanto, as restantes situações podem e devem ser evitadas, de modo a diminuir o incómodo para os utentes e garantir que as análises são realizadas corretamente e em tempo útil. Desta forma, é importante que todo o processo laboratorial, desde a fase pré-analítica até à fase pós analítica, seja realizado com bastante atenção, evitando a ocorrência de erros.

8. Conclusão

A área das análises clínicas corresponde a um dos mais importantes meios complementares de diagnóstico e terapêutica. Dada a sua grande relevância no auxílio ao diagnóstico, prognóstico, monitorização terapêutica e prevenção de diversas patologias, esta foi a área escolhida para a realização do estágio de natureza profissional da unidade curricular Projeto/Tese/Estágio do 2º ano do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da ESTeSL. Este estágio foi realizado no Labocentro, entre setembro de 2021 e fevereiro de 2022, nas áreas de Imunologia e de Hematologia, com o objetivo de compreender as diferentes etapas do processo laboratorial e o funcionamento dos equipamentos utilizados nessas secções, bem como entender a importância clínica dos parâmetros imunológicos e hematológicos em estudo.

Durante o período de estágio, as tarefas realizadas passaram pela manutenção e inicialização dos equipamentos, verificação de reagentes e consumíveis, calibração e controlo de qualidade, triagem e processamento das amostras, e o seu arquivo. Na área de imunologia foram realizadas essencialmente metodologias de quimioluminescência e imunocromatografia, à exceção da deteção da infeção por *H. pylori*, que se baseou na medição da radiação β emitida pelo $^{14}\text{CO}_2$ presente no *BreathCard*. Já na secção de hematologia foram vários os métodos utilizados, nomeadamente: tecnologia de dispersão ótica, impedância elétrica, espectrofotometria de absorção, *HPLC* de afinidade borónica e *HPLC* de troca catiónica em fase inversa, teste de solubilidade da hemoglobina S e testes coagulométricos e imunoquímicos nos ensaios de hemostase.

A realização deste estágio foi uma experiência enriquecedora, que possibilitou a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do 1º ano do Mestrado e a aquisição de competências teóricas e práticas ao nível do funcionamento e execução das metodologias mencionadas, cumprindo assim os objetivos estabelecidos. A integração na equipa de profissionais do Labocentro permitiu compreender o funcionamento e rigor de um laboratório de análises clínicas e adquirir competências ao nível da interpretação de resultados, possibilitando a compreensão e avaliação de casos laboratoriais. Contudo, as atividades realizadas no laboratório restringiram-se às áreas de Imunologia e Hematologia, sendo, dessa forma, relevante continuar a aprofundar os conhecimentos nessas áreas e expandir a aprendizagem para as restantes áreas laboratoriais, permitindo relacionar os diversos parâmetros em estudo entre si. Isto representará uma mais-valia para o futuro, não só nesta área, como na área científica em geral.

9. Linha de investigação

Tendo por base as atividades realizadas ao longo do período de estágio, foi projetada uma possível linha de investigação intitulada “**Prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH).**” que se encontra detalhada abaixo.

9.1. Introdução

A infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) agrava-se progressivamente ao longo do tempo e pode ser causada pelo VIH do tipo 1 (VIH-1) ou do tipo 2 (VIH-2), sendo o primeiro mais prevalente e patogénico¹⁴⁵. Estima-se que em 2020, cerca de 37,7 milhões de pessoas estivessem infetadas pelo VIH, correspondendo 1,5 milhões a novas infeções¹⁴⁶.

O VIH é transmitido através do contacto sexual desprotegido, por via sanguínea ou pela via materno-fetal¹⁴⁵. Este vírus infeta as células imunes que possuem o recetor membranal CD4 e o co-recetor CCR5 ou CXCR4, comprometendo o sistema imunitário do hospedeiro^{145,147}. Entre as células infetadas destacam-se principalmente os linfócitos T *helper*, mas também os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas¹⁴⁵.

A infeção pelo VIH passa por 3 etapas sequenciais: infeção primária ou aguda, fase assintomática ou de latência clínica e fase sintomática. A **infeção primária ou aguda** diz respeito ao período de tempo entre a infeção inicial e o desenvolvimento da resposta imune¹⁴⁷. Esta fase caracteriza-se por uma replicação viral intensa e uma diminuição acentuada do número de linfócitos T *helper* associada à disseminação do VIH para os tecidos linfáticos^{145,147}. A presença de sintomas inespecíficos, nomeadamente, febre, diarreia, vómitos, cefaleias, faringite e linfadenopatia, entre outros, dificulta o diagnóstico nesta fase¹⁴⁵. A **fase assintomática** ocorre cerca de 3 a 5 semanas após a infeção inicial, altura em que ocorre a seroconversão¹⁴⁵. Pode manter-se durante vários anos e caracteriza-se pela ausência de sintomas e pela diminuição da replicação viral^{145,147}. Esta deve-se à formação de anticorpos anti-VIH ligantes e neutralizantes que evitam a infeção celular e à atividade dos linfócitos T citotóxicos e das células *natural killer* que eliminam as células infetadas por um mecanismo designado por citotoxicidade celular dependente de anticorpos^{145,147}. Assim, a virémia diminui até atingir o *viral setpoint*, um fator preditivo de progressão da doença a longo prazo, ou até alcançar valores indetetáveis¹⁴⁵. Isto deveria ser vantajoso para o hospedeiro, permitindo repor o número de linfócitos T CD4⁺ e restaurar o estado de imunocompetência, contudo, a estimulação e ativação dos linfócitos T *helper* leva ao aumento do número de células imunes

suscetíveis de serem infetadas pelo VIH¹⁴⁸. Ainda que as células infetadas possam sofrer lise celular, muitas vezes atingem um estado de latência que contribui para o desenvolvimento de uma inflamação crónica. Esta latência representa o principal obstáculo à erradicação do VIH e deve-se à presença de *DNA* proviral nos compartimentos linfáticos, designados reservatórios virais, onde a expressão de antígenos virais é reduzida e a frequência de mutações no genoma viral é elevada¹⁴⁵. Caso a replicação viral e a ativação crónica das células imunes destruam a arquitetura dos tecidos linfáticos, a disseminação viral para as células T CD4⁺ circundantes aumenta¹⁴⁵. Desta forma, o número de linfócitos T *helper* diminui lenta e progressivamente, levando a um estado de imunodeficiência¹⁴⁵. Nesta altura, estabelece-se a **fase sintomática** da doença, na qual aumenta a replicação viral¹⁴⁷. Com o agravamento progressivo do estado de imunodeficiência, a capacidade de desencadear uma resposta imune eficaz diminui, favorecendo o desenvolvimento de infeções oportunistas e/ou neoplasias^{145,147}. Quando isto se verifica, fala-se em síndrome da imunodeficiência adquirida (*SIDA*), a fase mais avançada da infeção pelo VIH. A progressão para um estado de *SIDA* ocorre mais rapidamente numa infeção pelo VIH-1, comparativamente a uma infeção pelo VIH-2¹⁴⁵. Segundo a *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)*, desde que os primeiros casos de *SIDA* foram descritos, em junho de 1981¹⁴⁹, cerca de 79,3 milhões de pessoas foram infetadas pelo VIH e cerca de 36,3 milhões morreram por causas associadas à doença¹⁴⁶.

O diagnóstico desta infeção pode ser realizado através de métodos diretos ou indiretos. Os primeiros incluem a deteção do antígeno p24, o isolamento e cultura do VIH e a deteção do genoma viral¹⁴⁷. Os métodos indiretos permitem detetar anticorpos contra os antígenos virais, sendo úteis apenas após a seroconversão¹⁴⁷. Atualmente, realizam-se ensaios que combinam, simultaneamente, a deteção do antígeno p24 e dos anticorpos anti-VIH-1 e anti-VIH-2, permitindo o diagnóstico precoce da infeção primária pelo VIH. Desta forma, os doentes podem ser rapidamente encaminhados para tratamento e monitorização da doença.

Até ao momento, ainda não existe uma cura para a infeção pelo VIH. Contudo, a administração precoce da terapêutica antirretroviral permite prolongar e melhorar a qualidade de vida dos doentes. Nesta, são utilizados fármacos que atuam em diferentes fases do ciclo de replicação viral, interrompendo-o. Entre eles encontram-se inibidores da transcriptase reversa, inibidores da protease, inibidores dos co-recetores e inibidores da integrase¹⁵⁰. Isto permite inibir a replicação viral por longos períodos de tempo, reduzindo a morbidade e mortalidade associadas a esta infeção¹⁵⁰.

Desde que o VIH foi identificado como o agente causador da *SIDA*, em 1983¹⁵¹, têm sido vários os sintomas e as manifestações clínicas a surgir ao longo da progressão da doença. Laboratorialmente, a anemia é a alteração hematológica mais comum nos doentes infetados por este vírus¹⁵². Esta condição representa um problema de saúde pública global e define-se pela existência de um défice nos níveis de hemoglobina. Segundo a OMS, a anemia deve ser diagnosticada quando se verifica uma concentração de hemoglobina inferior a 12,0 g/dL, no caso das mulheres, e 13,0 g/dL nos homens¹⁵³. A redução da capacidade de trabalho, a diminuição do bem-estar e o aumento da necessidade de hospitalização são algumas das consequências da anemia nestes doentes¹⁵⁴. Para além de ser uma condição prevalente nos indivíduos infetados pelo VIH, a severidade da anemia aumenta com a progressão da doença^{155,156}. Estudos demonstram que esta condição é mais frequente em mulheres e em indivíduos afro-americanos¹⁵⁷. Sabe-se ainda que apresentar um número reduzido de células CD4⁺ (< 200 células/ μ L) e/ou níveis elevados de *RNA* do VIH-1 no plasma representa um fator de risco ao desenvolvimento de anemia¹⁵⁷.

A anemia está relacionada com a diminuição da qualidade de vida e da sobrevivência das pessoas infetadas com VIH, sendo considerada um marcador de prognóstico de progressão da doença^{152,154,157,158}. Nesse sentido, e ainda que a causa de anemia nestes doentes seja multifatorial¹⁵², é importante avaliá-la, para que seja possível proceder ao seu tratamento. A diminuição do número de eritrócitos, o aumento da sua destruição e a sua produção ineficaz pela medula óssea são os principais fatores que contribuem para a ocorrência de anemia. A diminuição do número de glóbulos vermelhos pode dever-se, entre outros, à infiltração da medula óssea por uma neoplasia ou infeção, à administração de fármacos mielossupressores e à diminuição da produção ou da resposta à eritropoietina¹⁵⁷. Para além disso, a própria infeção pelo VIH pode afetar a eritropoiese através da infeção das células estaminais da medula óssea, da libertação de citocinas ou da infeção das células precursoras dos glóbulos vermelhos¹⁵⁹. Neste sentido, já foi demonstrado que as células da linhagem eritroide na medula óssea expressam o recetor CD4, o que favorece a infeção pelo VIH¹⁶⁰. A destruição dos eritrócitos, designada por hemólise, pode ter origem na presença de autoanticorpos contra essas células, na administração de fármacos ou ocorrer em doentes com anemia falciforme, esferocitose hereditária ou deficiência na glucose-6-fosfato desidrogenase^{157,161}. A anemia por produção ineficaz de glóbulos vermelhos deve-se principalmente a deficiências nutricionais de ferro, ácido fólico ou vitamina B12^{157,161}. Para além destes fatores, também a perda de sangue associada a neoplasias ou a

lesões gastrointestinais resultantes de infeções oportunistas pode contribuir para a anemia¹⁵⁷.

O tratamento da anemia nos doentes diagnosticados com VIH tem sido associado a uma melhoria significativa da qualidade de vida, diminuindo a taxa de mortalidade¹⁵⁷. Normalmente, no tratamento da anemia recorre-se à epoetina alfa, a eritropoietina recombinante humana. Contudo, em caso de anemia aguda que coloque em risco a vida do doente realiza-se a transfusão de sangue¹⁵². Caso a anemia seja induzida pelo uso de fármacos, esta pode ser corrigida pela interrupção da terapia mielossupressora¹⁵⁵. Considerando os avanços da terapia antirretroviral, a sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes com infeção pelo VIH têm vindo a melhorar. No entanto, ainda que a prevalência de anemia severa tenha diminuído com a introdução da terapia antirretroviral, a ocorrência de anemia leve a moderada continua a ser comum nestes doentes¹⁵⁷. Isto deve-se ao facto dos fármacos antirretrovirais poderem causar efeitos adversos que contribuem para o desenvolvimento da anemia¹⁵². Ainda assim, a administração destes fármacos permite melhorar a imunidade dos doentes, diminuindo a ocorrência de infeções oportunistas que representam uma potencial causa de anemia.

A prevalência de anemia nos doentes infetados pelo VIH tem sido analisada em diversos estudos^{152,154,156,162}. Contudo, esta avaliação não se encontra bem descrita para a população portuguesa, e em particular, nunca foi realizada na população de utentes do grupo Clara Saúde. Desta forma, para além de ser pertinente, este projeto tem ainda uma perspetiva inovadora. Considerando a definição de inovação do *Advisory Committee on Measuring Innovation in the 21st Century Economy*¹⁶³, os aspetos inovadores podem ser definidos recorrendo a descritores de ação e aplicação. Neste estudo, a determinação da prevalência de anemia nos utentes do grupo Clara Saúde diagnosticados com a infeção pelo VIH irá possibilitar, como aspeto inovador, a ação de desenvolver um protocolo de recomendação da avaliação da anemia para monitorização destes doentes e, a longo prazo, a aplicação de um processo baseado na introdução desse protocolo na rotina do laboratório. Este processo permitirá diagnosticar precocemente a anemia nos utentes infetados pelo VIH, contribuindo para a identificação da causa e possibilitando o tratamento. Desta forma, pretende-se evitar a progressão da doença, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos doentes.

Considerando ainda os 5 tipos de inovação de Joseph Schumpeter¹⁶⁴, este projeto possibilitará, a longo prazo, a introdução de um novo método na prática clínica, já que o protocolo desenvolvido passará a estar disponível no laboratório para monitorização da anemia nos pacientes diagnosticados com infeção pelo VIH.

A inovação em saúde deve atender à forma como o doente é visto, como é ouvido e como as suas necessidades são atendidas, tendo ainda em consideração as restantes partes interessadas¹⁶⁵. Com base nisto, este projeto pretende trazer o maior benefício a todas as partes. A longo prazo, beneficiará diretamente os doentes infetados pelo VIH, uma vez que o diagnóstico precoce da anemia permitirá realizar o seu tratamento atempadamente, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida. Também os profissionais do Labocentro irão beneficiar com a realização deste estudo, porque permitirá conhecer a prevalência de anemia nos seus utentes, contribuindo para uma melhor caracterização da população atendida no laboratório e para a realização de novos estudos que tenham em vista um maior conhecimento acerca da relação entre a infeção pelo VIH e a ocorrência de anemia. Ao mesmo tempo, os profissionais de saúde irão, a longo prazo, beneficiar com a introdução deste protocolo na rotina, uma vez que, sabendo que a anemia está associada a um aumento da necessidade de hospitalização dos doentes, a sua monitorização diminuirá os custos associados a essa hospitalização e ao tratamento de possíveis complicações adversas. Para além disso, os investigadores da área ao terem acesso aos resultados deste projeto poderão realizar novos estudos e contribuir ainda mais para a compreensão da prevalência de anemia nos doentes com VIH e de possíveis causas e tratamentos, tendo em vista uma melhor caracterização destas condições patológicas.

Considerando a qualidade em saúde, a longo prazo, este projeto contribuirá, do ponto de vista da efetividade, para a melhoria da qualidade clínica. Isto, porque a monitorização da anemia nos doentes infetados pelo VIH possibilitará identificar a causa subjacente e a realização do tratamento, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida. No futuro, pretende-se ainda caminhar para estudos que provem a eficácia e a eficiência da monitorização da anemia nestes doentes, ao evitar manifestações clínicas mais graves associadas à progressão da doença e à consequente necessidade de hospitalização, permitindo não só diminuir as complicações associadas à prestação dos cuidados de saúde como também maximizar os recursos utilizados.

A motivação para este projeto surgiu durante a pesquisa bibliográfica relativa à infeção pelo VIH. Ao verificar que a anemia é uma alteração hematológica comum nestes indivíduos, foi realizada uma pesquisa mais aprofundada sobre o tema. A escassa informação existente para a população portuguesa no que toca a esta temática, despertou ainda mais o interesse e motivou a realização deste projeto. Desta forma, foi desenvolvida esta proposta de investigação que permite aprofundar o conhecimento já

existente acerca da prevalência de anemia nos doentes infetados pelo VIH, relacionando duas áreas de grande interesse: a hematologia e a imunologia.

São vários os estudos que demonstram que a anemia é uma alteração hematológica comum nos doentes diagnosticados com a infeção pelo VIH. Para além disso, sabe-se que na ausência de tratamento da anemia, existe uma rápida progressão e um pior prognóstico da doença. Desta forma, é importante monitorizar os parâmetros hematológicos destes indivíduos para que a anemia seja rapidamente diagnosticada. Nesse sentido, pretende-se com este projeto responder à questão: Qual a prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH? Tendo por base o diagnóstico desta condição, é possível adequar a terapêutica dos doentes de forma atempada, permitindo reduzir a progressão da doença e, conseqüentemente, a morbilidade e mortalidade associadas, melhorando a sua qualidade de vida.

9.2. Objetivos

Considerando as diversas causas que contribuem para o desenvolvimento de anemia nos doentes infetados pelo VIH, foram realizados estudos que demonstram que a anemia é prevalente nos doentes com esta infeção^{152,156}. Para além disso, existe um aumento da severidade de anemia com a progressão da infeção pelo VIH^{155,156}, sendo a mais comum a anemia normocítica normocrómica^{156,158}. No entanto, nenhum destes estudos foi realizado para a população portuguesa. Assim, decidiu-se realizar um estudo relativo à prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH. O estudo apresentado hipotetiza que:

- Os utentes do Grupo Clara Saúde diagnosticados com a infeção pelo VIH têm uma elevada prevalência de anemia.
- A severidade da anemia dos participantes em estudo é maior nos estadios mais avançados da infeção pelo VIH.
- O tipo de anemia mais comum nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH é a anemia normocítica normocrómica.

Este projeto tem como objetivo geral determinar a prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH e, como objetivos específicos caracterizar a anemia do ponto de vista morfológico e avaliar a sua severidade consoante o estadio da infeção pelo VIH.

De modo a atingir os objetivos, o projeto subdivide-se nas seguintes tarefas:

Tarefa 1: Recrutamento dos participantes em estudo. Nesta etapa, os participantes serão recrutados de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos.

Tarefa 2: Processamento das amostras. A tarefa 2 subdivide-se na determinação e classificação morfológica da anemia (tarefa 2.1) e na quantificação dos linfócitos T CD4⁺ dos participantes em estudo para avaliação da severidade da doença (tarefa 2.2).

Tarefa 3: Tratamento estatístico dos dados obtidos na tarefa 2 para determinação da prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH. Nesta tarefa será possível determinar o tipo de anemia mais comum nos participantes em estudo e relacionar a sua severidade com o estadio da infeção pelo VIH. Com base nestes resultados, será possível realizar estudos futuros dirigidos aos utentes com essa condição, tendo em vista uma melhor caracterização da anemia e da sua relação com a infeção pelo VIH.

Em conjunto, estas tarefas ajudam à compreensão da prevalência de anemia nos participantes em estudo, contribuindo, a longo prazo, para a introdução de um protocolo de recomendação da monitorização da anemia na rotina do laboratório. Este tem em vista a melhoria do bem-estar e do prognóstico dos doentes ao possibilitar um tratamento atempado e ao evitar complicações mais graves associadas à progressão da doença.

9.3. Metodologias

Este estudo epidemiológico descritivo será realizado no laboratório Labocentro entre setembro de 2022 e junho de 2023. O recrutamento dos participantes, na tarefa 1, terá por base um questionário efetuado aos utentes do grupo Clara Saúde. Os doentes seropositivos para o VIH serão incluídos no estudo, enquanto os utentes que aguardem o resultado do ensaio de determinação qualitativa do antigénio p24 e/ou anticorpos anti-VIH-1/2 ficarão com a sua participação pendente até à obtenção do resultado. No segundo caso, as amostras serão processadas no equipamento *Alinity ci-series* através do imunoensaio *CMIA*. Quando necessário, será realizado o ensaio confirmatório imunocromatográfico *Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay* (Figura 4.5). Posteriormente, na tarefa 2, as amostras dos participantes serão processadas no equipamento *Cell-Dyn Sapphire* para a determinação e classificação morfológica da anemia, bem como para a quantificação dos linfócitos T CD4⁺. Para isso, recorrer-se-á a metodologias de impedância elétrica, tecnologia de dispersão ótica/fluorescência e espetrofotometria de absorção. Os resultados obtidos possibilitarão, na tarefa 3, a determinação da prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH, a identificação do tipo de anemia mais comum e a avaliação da severidade da anemia ao longo da progressão da infeção pelo VIH.

9.3.1. Desenho do estudo

Este projeto subdivide-se nas seguintes tarefas:

Tarefa 1: A tarefa 1 consiste no recrutamento dos participantes. Este será conduzido em doentes seropositivos para o VIH cujas amostras são analisadas no Labocentro. Todos os utentes que se dirigirem diretamente ao Labocentro ou aos postos de colheitas do Grupo Clara Saúde para realização de análises clínicas e que pretendam participar no estudo irão preencher um questionário relativamente às suas características sociodemográficas (género, idade, religião, localidade e educação) e clínicas (gravidez, historial de doença, historial de tratamentos e, no caso de diagnóstico de infeção pelo VIH, em que fase da doença se encontra - infeção primária/fase assintomática/fase sintomática - qual o tipo de VIH e indicação se realiza terapia antirretroviral). Serão excluídos do estudo todos os utentes que não apresentem diagnóstico de infeção pelo VIH, grávidas e os indivíduos que, sendo seropositivos para o VIH, tenham um historial de elevada perda de sangue ou transfusão sanguínea no último ano. Serão incluídos no estudo os indivíduos que, à data de realização do questionário, estejam infetados pelo VIH e não preencham os critérios de exclusão, bem como os utentes cujo diagnóstico de infeção pelo VIH seja obtido após processamento da amostra no Labocentro, mediante solicitação da realização do ensaio qualitativo de determinação do antigénio p24 do VIH e/ou de anticorpos anti-VIH-1/2. Neste caso, serão colhidas amostras de sangue periférico destes indivíduos, para tubo seco. Após a centrifugação das amostras (10 minutos, 4000 rpm), será efetuada a triagem das mesmas através da leitura do código de barras. Posteriormente, as amostras serão processadas no equipamento *Alinity ci-series* para a determinação qualitativa do antigénio p24 do VIH e/ou de anticorpos anti-VIH-1/2 (Figuras 4.2-B e 4.4; Tabela Suplementar 5). Os utentes que apresentem um resultado não reativo serão excluídos do estudo. Se o resultado obtido for reativo, de acordo com a prática comum do laboratório, será pedida uma repetição de colheita de sangue para confirmação do resultado. Perante um resultado reativo na segunda amostra, será efetuado o ensaio confirmatório *Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*. Este ensaio permitirá confirmar a infeção e distinguir entre a presença de anti-VIH-1 e/ou anti-VIH-2 na amostra, recorrendo a imunocromatografia (Figura 4.5). Os utentes cujo resultado confirme a infeção pelo VIH serão incluídos no estudo, juntamente com os indivíduos que, à data de realização do questionário, estejam infetados pelo VIH e não preencham os critérios de exclusão.

Tarefa 2: Na tarefa 2, as amostras dos doentes infetados pelo VIH atendidos no Labocentro serão processadas no equipamento *Cell-Dyn Sapphire* para determinação

e classificação morfológica da anemia, bem como para a quantificação dos linfócitos T CD4⁺ para avaliação da severidade da doença. Nesse sentido, esta tarefa subdivide-se em:

Tarefa 2.1: Determinação e classificação morfológica da anemia dos participantes em estudo. Em primeiro lugar, serão obtidas amostras de sangue periférico de todos os participantes, utilizando *EDTA K₃* como anticoagulante. As colheitas serão realizadas por profissionais qualificados do laboratório. Depois de homogeneizadas, as amostras serão processadas no analisador *Cell-Dyn Sapphire* para realização do hemograma. Recorrendo a metodologia de impedância elétrica, tecnologia de dispersão ótica/fluorescência e espectrofotometria de absorção será possível obter os parâmetros hematológicos em estudo. A avaliação dos níveis de hemoglobina (Hb) e dos índices hematimétricos permitirá efetuar, respetivamente, o diagnóstico da anemia e a sua classificação morfológica.

O diagnóstico da anemia será realizado segundo as recomendações da OMS: ausência de anemia (Hb \geq 110 g/L para crianças dos 6 aos 59 meses de idade e mulheres grávidas, Hb \geq 115 g/L para crianças dos 5 aos 11 anos de idade, Hb \geq 120 g/L para crianças dos 12 aos 14 anos e para mulheres não grávidas a partir dos 15 anos e Hb \geq 130 g/L para homens a partir dos 15 anos), anemia leve (100 g/L < Hb < 109 g/L para crianças dos 6 aos 59 meses de idade e para mulheres grávidas, 110 g/L < Hb < 114 g/L para crianças dos 5 aos 11 anos de idade, 110 g/L < Hb < 119 g/L para crianças dos 12 aos 14 anos e para mulheres não grávidas a partir dos 15 anos, e 110 g/L < Hb < 129 g/L para homens a partir dos 15 anos), anemia moderada (70 g/L < Hb < 99 g/L para crianças dos 6 aos 59 meses de idade e para mulheres grávidas, 80 g/L < Hb < 109 g/L para crianças dos 5 aos 14 anos de idade e para mulheres não grávidas e homens a partir dos 15 anos) e anemia severa (Hb < 70 g/L para crianças dos 6 aos 59 meses de idade e mulheres grávidas, e Hb < 80 g/L para crianças dos 5 aos 14 anos de idade e para mulheres não grávidas e homens a partir dos 15 anos)¹⁵³.

A nível morfológico, a anemia será classificada da seguinte forma: anemia microcítica (MCV < 80 fL) hipocrómica (MCHC < 310 g/L), anemia normocítica (80 fL < MCV < 100 fL) normocrómica (310 g/L < MCHC < 360 g/L) e anemia macrocítica (MCV > 100 fL) normocrómica¹⁶⁶.

Tarefa 2.2.: Quantificação dos linfócitos T CD4⁺ dos participantes em estudo. As amostras de sangue total anticoaguladas com *EDTA K₃* dos participantes serão processadas no equipamento *Cell-Dyn Sapphire* recorrendo ao ensaio *Cell-Dyn Immuno T-Cell* (CD3/4/8)^{84,167}. A metodologia utilizada envolve anticorpos monoclonais,

fluorescência e dispersão de luz, sendo que a incubação da amostra com os anticorpos monoclonais anti-CD4 permitirá diferenciar as células T CD4⁺ da população de linfócitos da amostra e quantificá-las^{84,167}.

Os resultados obtidos permitirão avaliar a severidade da infecção pelo VIH, classificando-a a nível imunológico, de acordo com as recomendações da OMS em: não significativa (total CD4⁺ > 35 % para crianças com menos de 11 meses, total CD4⁺ > 30 % para crianças entre os 12 e os 35 meses, total CD4⁺ > 25 % para crianças entre os 36 e os 59 meses e total CD4⁺ > 500 células/mm³ para pessoas com mais de 5 anos), leve (30 % < total CD4⁺ < 35 % para crianças com menos de 11 meses, 25 % < total CD4⁺ < 30 % para crianças entre os 12 e os 35 meses, 20 % < total CD4⁺ < 25 % para crianças entre os 36 e os 59 meses e 350 células/mm³ < total CD4⁺ < 499 células/mm³ para pessoas com mais de 5 anos), avançada (25 % < total CD4⁺ < 29 % para crianças com menos de 11 meses, 20 % < total CD4⁺ < 24 % para crianças entre os 12 e os 35 meses, 15 % < total CD4⁺ < 19 % para crianças entre os 36 e os 59 meses e 200 células/mm³ < total CD4⁺ < 349 células/mm³ para pessoas com mais de 5 anos) ou severa (total CD4⁺ < 25 % para crianças com menos de 11 meses, total CD4⁺ < 20 % para crianças entre os 12 e os 35 meses, total CD4⁺ < 15 % para crianças entre os 36 e os 59 meses e total CD4⁺ < 200 células/mm³ ou total CD4⁺ < 15 % para pessoas com mais de 5 anos)¹⁶⁸.

Tarefa 3: Na tarefa 3 será realizado o tratamento estatístico dos dados obtidos na tarefa 2 para avaliação da prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH. Os resultados obtidos permitirão também identificar o tipo de anemia mais comum nos participantes em estudo e avaliar a relação entre a severidade da anemia e a progressão da doença. Os resultados serão avaliados utilizando o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, IBM, Estados Unidos).

9.4. Resultados esperados

Considerando estudos anteriores que demonstram a prevalência de anemia nos doentes diagnosticados com infecção pelo VIH^{152,156}, um aumento da sua severidade com a progressão da doença^{155,156}, e tendo por base que a anemia normocítica normocrômica tem sido descrita como o tipo de anemia mais comum nestes indivíduos^{156,158}, espera-se, com este estudo, verificar se estes dados se confirmam na população atendida no Grupo Clara Saúde. Assim, os resultados esperados deste projeto são:

1. Uma elevada prevalência de anemia nos doentes infetados pelo VIH^{152,156}.

2. A ocorrência de anemia mais severa nos doentes em fase mais avançada da infeção pelo VIH, a nível imunológico^{155,156}.

3. A prevalência mais elevada de anemia normocítica normocrómica nos doentes infetados pelo VIH, comparativamente à anemia microcítica hipocrómica e à anemia macrocítica normocrómica^{156,158}.

Em geral, a prevalência e a severidade da anemia aumentam com a progressão da infeção pelo VIH. Contudo, isto varia consoante a idade, género, estadio da doença e os valores utilizados para definir a anemia, entre outros. Os resultados obtidos neste estudo permitirão, com base no questionário realizado aos participantes, não só avaliar a prevalência e severidade de anemia no total de doentes infetados pelo VIH, como também avaliar esses parâmetros consoante o género, a idade, a localidade, a religião, a educação, o estadio da doença, o tipo de VIH e a realização de terapia antirretroviral dos utentes do Grupo Clara Saúde.

9.5. Limitações

Este projeto é importante para avaliar a prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde infetados pelo VIH. Contudo, visto que este estudo apenas diz respeito aos utentes das unidades do Grupo Clara Saúde que cumprem os critérios de inclusão, o número de amostras de voluntários obtido durante o intervalo de tempo estabelecido representa uma limitação deste projeto.

9.6. Considerações éticas

Todos os participantes serão totalmente informados acerca do objetivo deste projeto e, previamente à sua realização, será obtido o consentimento informado de todos os indivíduos, ou dos pais/tutores legais no caso dos menores ou indivíduos com deficiência intelectual. As amostras obtidas serão utilizadas para fins estritamente investigacionais, garantindo a salvaguarda do direito ao anonimato e à confidencialidade dos participantes.

9.7. Instituições e colaborações

Labocentro – Laboratório de Análises Clínicas.

Postos de colheitas do Grupo Clara Saúde.

9.8. Considerações finais

Tendo em consideração que a anemia é uma condição comumente observada nos doentes infetados pelo VIH e que, na ausência de tratamento, está associada à progressão da doença e a um pior prognóstico, é relevante avaliar a prevalência de anemia nos utentes do Grupo Clara Saúde diagnosticados com infeção pelo VIH. O desenvolvimento, a longo prazo, de um protocolo de recomendação da monitorização da anemia nestes doentes e a sua introdução na rotina do laboratório, permitirá diagnosticar precocemente a anemia e adequar a terapêutica dos doentes de forma atempada, evitando a progressão da doença e, conseqüentemente, promovendo a melhoria do prognóstico e da qualidade de vida dos doentes.

9.9. Cronograma

Descrição da atividade	2022				2023					
	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Recrutamento dos participantes										
Determinação e classificação morfológica da anemia										
Quantificação dos linfócitos T CD4 ⁺										
Tratamento estatístico										
Realização do relatório										

10. Referências

1. Watson ID. Clinical Analysis | Overview. In: Encyclopedia of Analytical Science. Elsevier; 2005. p. 126–32.
2. Cohen NM, Schwartzman O, Jaschek R, Lifshitz A, Hoichman M, Balicer R, et al. Personalized lab test models to quantify disease potentials in healthy individuals. *Nat Med*. 2021 Sep 23;27(9):1582–91.
3. Grupo Clara Saúde. A nossa visão [Internet]. 2022. Available from: <https://www.clarasaude.pt/conteudo.aspx?id=5>.
4. Grupo Clara Saúde. Labocentro - Laboratório de Análises Clínicas [Internet]. 2022. Available from: https://www.clarasaude.pt/unidade.aspx?id=1&unidade=Labocentro_-_Laboratorio_de_Analises_Clinicas.
5. Heher YK, Chen Y, VanderLaan PA. Pre-analytic error: A significant patient safety risk. *Cancer Cytopathol*. 2018 Aug 29;126(8):738–44.
6. Abbott. Alinity ci-series [Internet]. 2022. Available from: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/alinity/alinity-ci-series>.
7. Abbott. Principles of operation (i-series). In: Alinity ci-series Operations Manual. Estados Unidos; 2018. p. 428–42.
8. Siemens Healthcare. Section 12: Data Reduction and the Chemiluminescent Reaction. In: IMMULITE® 2000/2500 Operator's Manual. Alemanha; 2007. p. 289–90.
9. Despacho n.º 1150/2021 da Direção-Geral da Saúde. *Diário da República II série N.º 19*. 2021. p. 137–90.
10. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Viruslike Antigen Associated with Acute Illness. *Science*. 1973 Dec;182(4116):1026–8.
11. Iorio N, John S. Hepatitis A. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
12. Gupta SP. Viral Hepatitis. In: Studies on Hepatitis Viruses. Elsevier; 2018. p. 1–14.
13. Sharapov UM. Hepatitis A. In: Foodborne Infections and Intoxications. Elsevier; 2013. p. 279–86.
14. Tripathi N, Omar Y M. Hepatitis B. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
15. Despacho n.º 12434/2019 da Direção-Geral da Saúde - *Diário da República II série N.º 250*.
16. Chan HL-Y, Wong VW-S. Hepatitis B. In: Zakim and Boyer's Hepatology. Elsevier; 2012. p. 540–63.
17. Basit H, Tyagi I, Koirala J. Hepatitis C. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
18. Lin C-Y, Chien R-N, Sheen I-S. The 2020 Nobel Prize in medicine for the discovery of hepatitis C virus: An epic saga of the fight against a troublesome virus. *Biomed J*. 2021 Jul;44(5):567–9.
19. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Dec 17;1(1):15035.
20. Gökengin D, Wilson-Davies E, Nazlı Zeka A, Palfreeman A, Begovac J, Dedes N, et al. 2021 European guideline on HIV testing in genito-urinary medicine settings. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2021 May 5;35(5):1043–57.
21. Bio-Rad. Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay. França; 2013. p. 1–21.
22. Tudor ME, Al Aboutd AM, Gossman W. Syphilis. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
23. Leonor MC, Mendez MD. Rubella. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.

24. Madireddy S, Chacon EDR, Mangat R. Toxoplasmosis. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
25. Abbott. Alinity i Toxo IgM (G74584R07). Estados Unidos; 2020. p. 1–8.
26. Gupta M, Shorman M. Cytomegalovirus. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
27. Abbott. Alinity i CMV IgM (G74493R04). Estados Unidos; 2019. p. 1–6.
28. Fugl A, Andersen CL. Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice. *BMC Fam Pract.* 2019 Dec 14;20(1):62.
29. Hoover K, Higginbotham K. Epstein Barr Virus. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
30. Bryan ES, Tadi P. Human T Cell Lymphotropic Virus. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
31. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Napoli R Di. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022.
32. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
33. Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbințeanu-Braticevici C. Helicobacter pylori infection: old and new. *J Med Life.* 10(2):112–7.
34. Kibion AB. Heliprobe® System Instruções De Utilização. Suécia; 2018. p. 1–25.
35. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
36. Pierce JG. Eli Lilly Lecture: The Subunits of Pituitary Thyrotropin—Their Relationship to Other Glycoprotein Hormones¹. *Endocrinology.* 1971 Dec;89(6):1331–44.
37. Pirahanchi Y, Toro F, Jialal I. Physiology, Thyroid Stimulating Hormone. StatPearls [Internet]. 2021.
38. Pirahanchi Y, Tariq MA, Jialal I. Physiology, Thyroid. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
39. Fröhlich E, Wahl R. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Front Immunol.* 2017 May 9;8:1–16.
40. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Vander's Human Physiology: The Mechanisms Of Body Function.* 15th ed. McGraw-Hill QDR, editor. 2019. 353-5 p.
41. Seeley R. Reprodução e Desenvolvimento. In: *Anatomia e Fisiologia de Seeley.* Lusodidacta; 2005. p. 1027–72.
42. Hariri L, Rehman A. Estradiol. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
43. Siemens Healthcare. Immulite 2000 Free Beta HCG (PIL2KFB-24). Alemanha; 2019. p. 1–10.
44. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev.* 2000 Jan 10;80(4):1523–631.
45. Al-Chalabi M, N. Bass A, Alsaman I. Physiology, Prolactin. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
46. Roby KF. 17 Beta Estradiol. In: *Reference Module in Biomedical Sciences.* Elsevier; 2019. p. 1–6.
47. Stillwell W. Bioactive Lipids. In: *An Introduction to Biological Membranes.* Elsevier; 2016. p. 453–78.
48. Abbott. Alinity i FSH (G74689R02). Estados Unidos; 2018. p. 1–6.

49. Abbott. Alinity i LH (G84845R02). Estados Unidos; 2018. p. 1–8.
50. Abbott. Alinity i Progesterone (G84854R03). Estados Unidos; 2018. p. 1–8.
51. Monlab. hCG Pregnancy Rapid Test Strip MonlabTest® (Serum /Plasma/Urine). Espanha; 2018. p. 1–2.
52. Nicolaidis NC, Chrousos GP, Charmandari E. Adrenal Insufficiency. In: Endotext [Internet]. 2017.
53. Huecker MR, Bhutta BS, Dominique E. Adrenal Insufficiency. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
54. Abbott. Alinity i Cortisol (G74517R06). Estados Unidos; 2018. p. 1–8.
55. Al-Arudi R, Abdelmannan D, Arafah BM. Biochemical Diagnosis of Adrenal Insufficiency: the Added Value of Dehydroepiandrosterone Sulfate Measurements. *Endocr Pract*. 2011 Mar;17(2):261–70.
56. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005 May;26(2):19–39.
57. Kidambi S, Patel SB. Diabetes Mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139:8–18.
58. Siemens Healthcare. Immulite 2000 IGF-I. Alemanha; 2018. p. 28–37.
59. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2017 Jun;44(2):245–56.
60. Kitchen FL, Jack BW. Prenatal Screening. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
61. Coca AF, Cooke RA. On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness. *J Immunol*. 1923;8(3):163–82.
62. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):693–704.
63. Siemens Healthcare. Make allergy testing routine: Information for laboratorians [Internet]. [cited 2005 Feb 20]. Available from: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/laboratory-diagnostics/assays-by-diseases-conditions/allergy/laboratorian-information>.
64. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2009 Jan 19;30(01):1–8.
65. Sulaiman FN, Wong KK, Ahmad WAW, Ghazali WSW. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody is highly associated with rheumatoid factor and radiological defects in rheumatoid arthritis patients. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Mar;98(12):e14945.
66. Abbott. Alinity i Anti-CCP. Estados Unidos; 2018. p. 1–7.
67. Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2006 Jun 30;66(1):34–45.
68. Dasgupta A, Wahed A. Cardiac Markers. In: *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. Elsevier; 2014. p. 127–44.
69. Sharma MSCCKS. Troponin. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022.
70. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015 Dec 10;14(1):6.
71. WHO. Anaemia [Internet]. 2022. Available from: <https://www.who.int/data/nutrition/nlis/info/anaemia>.
72. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti S V. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2010 Aug;1800(8):760–9.
73. Hariz A, Bhattacharya PT. Megaloblastic Anemia. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.

74. Moreno M, Wiegand TJ. Blood. In: Encyclopedia of Toxicology. Elsevier; 2014. p. 526–32.
75. Celkan T. What does a hemogram say to us? *Türk Pediatr Arşivi*. 2020;55(2):103–16.
76. Lichtman MA, Kaushansky K, Prchal JT, Levi MM, Burns LJ, Armitage JO. *Williams Manual of Hematology*. 9th ed. 2017.
77. Marengo-Rowe AJ. Structure-Function Relations of Human Hemoglobins. *Baylor Univ Med Cent Proc*. 2006 Jul 11;19(3):239–45.
78. Yenilmez ED, Tuli A. Laboratory Approach to Anemia. In: *Current Topic in Anemia*. 2018. p. 235–53.
79. Sarma PR. Red Cell Indices. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW E, editor. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990. p. 720–4.
80. Rai D, Wilson AM, Moosavi L. Histology, Reticulocytes. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2022.
81. Briggs C, Bain BJ. Basic Haematological Techniques. In: *Practical Haematology*. p. 18–49.
82. Abbott. Cell-Dyn® 3700 System - Manual de Operações do Sistema. Alemanha; 2003.
83. Abbott. Cell-Dyn 3700 System - Manual de Operação do Sistema: Volume II. Estados Unidos;
84. Abbott. Cell-Dyn Sapphire TM - Manual de Operação. Alemanha; 2008.
85. Abbott. Cell-Dyn 29 Plus Control (with Retic). Estados Unidos; 2014.
86. Shapiro H. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Wiley; 2003. 1-736 p.
87. Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. *J Chem Educ*. 1962 Jul 1;39(7):333.
88. Lew K. Blood Sample Collection and Handling. In: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier; 2012. p. 95–121.
89. Química Clínica Aplicada S.A. May-Grunwald - Para diagnóstico “in vitro”. Espanha; 2017.
90. Química Clínica Aplicada S.A. Corante Giemsa - Para diagnóstico “in vitro”. Espanha; 2020.
91. Barbara J. Bain IB and MAL. *Practical Haematology*. 12th ed. Elsevier, editor. 2017.
92. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology). *J Clin Pathol*. 1993 Mar 1;46(3):198–203.
93. Fåhræus R. The Suspension-stability of the Blood. *Acta Med Scand*. 1921 Apr 24;55(1):3–7.
94. Westergren A. Studies of the Suspension Stability of the Blood in Pulmonary Tuberculosis¹. *Acta Med Scand*. 1921 Apr 24;54(1):247–82.
95. Tishkowski K, Gupta V. Erythrocyte Sedimentation Rate. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2022.
96. Diesse. Ves-Matic Cube 80 - Manual Operativo. Itália; 2009.
97. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights*. 2016 Jan 3;11:S38440.
98. Sacks DB. Measurement of Hemoglobin A1c: A new twist on the path to harmony. *Diabetes Care*. 2012 Dec 1;35(12):2674–80.
99. Menarini. Hb9210 TM Premier - Manual do Utilizador. Itália; 2014.
100. Sacks DB. Correlation between Hemoglobin A1c (HbA1c) and Average Blood Glucose: Can HbA1c Be Reported as Estimated Blood Glucose Concentration? *J Diabetes Sci Technol*. 2007 Nov 24;1(6):801–3.

101. DGS. Norma da Direção-Geral da Saúde: Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. 2012. p. 1–10.
102. Biotech T. HbA1c (GHb) Calibrators. Irlanda; 2020.
103. Biotech T. HbA1c (GHb) Controls. Irlanda; 2020.
104. Arkray I. ADAMS TM A1C - Manual de Instruções. Japão;
105. Randolph TR. Hemoglobinopathies (structural defects in hemoglobin). In: Rodak's Hematology. Elsevier; 2020. p. 394–423.
106. Menarini. Glyco Hb Control. Itália; 2017.
107. Europe HB. HbS Solubility Screening Kit - Instrucciones de uso. Reino Unido; 2018.
108. Sharga B, Pylypiv D, Feketa V. Medical Biology Practicals. Cytogenetics. Practical 3. Solubility test and peripheral blood smear for hemoglobin S and sickled red blood cells detection. 2018. p. 11–8.
109. Immunohematology and transfusion medicine. In: Immunology Guidebook. Elsevier; 2004. p. 431–43.
110. International Society of Blood Transfusion. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology [Internet]. [cited 2006 Feb 20]. Available from: [https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html#:~:text=The International Society of Blood Transfusion \(ISBT\) Working Party for,cell antigens \(June 2021\).](https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html#:~:text=The International Society of Blood Transfusion (ISBT) Working Party for,cell antigens (June 2021).)
111. Rath G, Mitra R, Mishra N. Blood groups systems. Indian J Anaesth. 2014;58(5):524.
112. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
113. Moreschi C. Neue tatsachen über die blutkörperchen agglutination. Zentralbl Bakt. 1908;46:49–51.
114. Coombs R, Mourant A, Race R. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br J Exp Pathol. 1945;26(4):255–66.
115. Diagnostic Grifols S.A. Wadiana® - Instruções de Utilização. Espanha; 2014.
116. Diagnostic Grifols S.A. Extended IV Control. Espanha; 2014.
117. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion. 1990 Feb;30(2):109–13.
118. Diagnostic Grifols S.A. DG Gel Confirm - Blood Grouping Reagent. Instructions for use. Espanha; 2016.
119. Diagnostic Grifols S.A. DG Gel Sol. Espanha; 2017.
120. Diagnostic Grifols S.A. DG Gel Coombs. Espanha; 2018.
121. Diagnostic Grifols S.A. Eritrócitos reagentes para deteção de anticorpos - Instruções de utilização. Espanha; 2019.
122. Gale AJ. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. Toxicol Pathol. 2011 Jan 30;39(1):273–80.
123. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
124. Siemens Healthcare. BCS ® XP - Manual de Instruções. Alemanha; 2008.
125. Siemens Healthcare. Thromborel ® S. Alemanha; 2018.
126. Siemens Healthcare. Innovance ® D-Dimer. 2018.
127. Siemens Healthcare. Dade ® Ci-trol ® 2. Alemanha; 2015.
128. Siemens Healthcare. Plasma de controlo N. Alemanha; 2019.
129. Siemens Healthcare. Innovance D-Dimer Controls. Alemanha; 2019.
130. Siemens Healthcare. Multicalibrador TP. Alemanha; 2021.

131. Siemens Healthcare. Pathromtin ® SL. Alemanha; 2018.
132. Johnson-Wimbley TD, Graham DY. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011 May 21;4(3):177–84.
133. Vehapoglu A, Ozgurhan G, Demir AD, Uzuner S, Nursoy MA, Turkmen S, et al. Hematological Indices for Differential Diagnosis of Beta Thalassemia Trait and Iron Deficiency Anemia. *Anemia*. 2014;2014:1–7.
134. Chiravuri S, Jesus O De. Pancytopenia. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
135. Wahed A, Dasgupta A. Sources of Errors in Hematology and Coagulation. In: *Hematology and Coagulation*. Elsevier; 2015. p. 277–93.
136. Nagalla S, Bray PF. Platelet Disorders (Inherited and Acquired). In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2014. p. 1–6.
137. Peslak SA, Olson T, Babushok D V. Diagnosis and Treatment of Aplastic Anemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2017 Dec 16;18(12):70.
138. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al. Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB. *Ann Intern Med*. 2015 Feb 3;162(3):205–13.
139. Yilmaz G, Shaikh H. Normochromic Normocytic Anemia. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022.
140. Saúde M da. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília; 2013.
141. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review. *Indian J Surg Oncol*. 2011 Jun 17;2(2):88–100.
142. E. Poruk K, Z. Gay D, Brown K, D. Mulvihill J, M. Boucher K, L. Scaife C, et al. The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates. *Curr Mol Med*. 2013 Feb 1;13(3):340–51.
143. Melo M. Tiroidites Autoimunes. *Acta Med Port*. 2006;19:387–94.
144. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem*. 2007 Sep;22(2):17–31.
145. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*. 2010;46(1):5–14.
146. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet [Internet]. 2021. Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
147. Loreto S, Azevedo-Pereira JM. A infecção por HIV – importância das fases iniciais e do diagnóstico precoce. *Acta Farm Port*. 2012;11:5–17.
148. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Dec 22;7(1):54.
149. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981 Jun 5;30(21):250–2.
150. Vasconcelos C, Oliveira J, Casquilho J, Malhado J, Vera J CL. Recomendações Portuguesas para o Tratamento da Infecção VIH/ sida. *Coord Nac para a Infecção VIH/ SIDA*. 2009;1–46.
151. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* (80-). 1983 May 20;220(4599):868–71.
152. Cao G, Wang Y, Wu Y, Jing W, Liu J, Liu M. Prevalence of anemia among people living with HIV: A systematic review and meta-analysis. *eClinicalMedicine*. 2022 Feb;44:101283.
153. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. [Internet]. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. 2011. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_e

ng.pdf?sequence=22&isAllowed=y.

154. Feitosa S. Anemia em Pacientes HIV-Positivo Atendidos em um Hospital Universitário de Pernambuco – Nordeste do Brasil. *J Bras Doenças Sex Transm.* 2011;23(2):69–75.
155. Sullivan PS, Hanson DL, Chu SY, Jones JL, Ward JW, Disease Group the AS of. Epidemiology of Anemia in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Persons: Results From the Multistate Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Surveillance Project. *Blood.* 1998 Jan 1;91(1):301–8.
156. Panwar A, Sharma S, Kumar S, Sharma A. A study of anemia in human immunodeficiency virus patients: Estimating the prevalence, analyzing the causative effect of nutritional deficiencies, and correlating the degree of severity with CD4 cell counts. *Med J Dr DY Patil Univ.* 2016;9(3):312.
157. Volberding PA, Levine AM, Dieterich D, Mildvan D, Mitsuyasu R, Saag M. Anemia in HIV Infection: Clinical Impact and Evidence-Based Management Strategies. *Clin Infect Dis.* 2004 May 15;38(10):1454–63.
158. Meidani M, Rezaei F, Maracy MR, Avijgan M, Tayeri K. Prevalence, severity, and related factors of anemia in HIV/AIDS patients. *J Res Med Sci.* 2012;138–42.
159. van den Berg K, Murphy EL, Pretorius L, Louw VJ. The impact of HIV-associated anaemia on the incidence of red blood cell transfusion: Implications for blood services in HIV-endemic countries. *Transfus Apher Sci.* 2014 Dec;51(3):10–8.
160. Cleveland R, Liu Y. CD4 Expression by erythroid precursor cells in human bone marrow. *Blood.* 1996 Mar 15;87(6):2275–82.
161. Phillips KD, Groer M. Differentiation and Treatment of Anemia in HIV Disease. *J Assoc Nurses AIDS care.* 2002 May;13(3):46–72.
162. Berhane Y, Haile D, Tolessa T. Anemia in HIV/AIDS Patients on Antiretroviral Treatment at Ayder Specialized Hospital, Mekele, Ethiopia: A Case-Control Study. *J Blood Med.* 2020 Oct;Volume 11:379–87.
163. U.S. Department of Commerce. Innovation measurement: Tracking the state of innovation in the American economy. 2008;1–36.
164. Ślędzik K. Schumpeter's View on Innovation and Entrepreneurship. *SSRN Electron J.* 2013;89–95.
165. Omachonu VK, Einspruch NG. Innovation in healthcare delivery systems: A conceptual framework. *Innov J.* 2010;15(1):1–20.
166. Villatoro V, To M. *A Laboratory Guide to Clinical Hematology.* 1st ed. Villatoro V, editor. University of Alberta Libraries; 2019. 1-302 p.
167. Kim J, Ryu S, Lim J, Kwon G, Koo S. Quantitation of T-lymphocyte Subsets Using the CELL-DYN Sapphire Automated Haematology Analyser. *J Lab Med Qual Assur.* 2014 Mar 31;36(1):39–47.
168. WHO. Who case definitions of hiv for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. 2007. p. 1–52.

11. Anexos

Tabela Suplementar 1: Parâmetros avaliados na secção de imunologia do Labocentro, no equipamento *Alinity ci-series*. Tabela do autor.

Realização dos ensaios	Parâmetros avaliados
Diariamente	Ferritina, ácido fólico, T ₃ livre, T ₃ total, T ₄ livre, T ₄ total, <i>PSA</i> total, <i>TSH</i> , 25-hidroxivitamina D, vitamina B12, estradiol, <i>FSH</i> , progesterona, <i>LH</i> , anti-HBs, anti- <i>HCV</i> , <i>HBsAg</i> , antigénio p24 do VIH e anti-VIH-1/2, anti-TP, anti-SARS-CoV-2 IgM, anti- <i>spike</i> SARS-CoV-2 IgG, anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG e β - <i>hCG</i> total
Segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira	<i>CA 125</i> , <i>CA 15-3</i> , <i>CA 19-9</i> , <i>CEA</i> , <i>PSA</i> livre, anti-Tg, anti- <i>TPO</i> , anti-HBc, anti-HBc IgM, anti-HBe, anti-CMV IgG, anti-CMV IgM, anti-Rubéola IgG, anti-Rubéola IgM, anti-Toxo IgG, anti-Toxo IgM e <i>HBeAg</i>
Terça-feira e quinta-feira	Anti- <i>HAV</i> IgG, anti- <i>HAV</i> IgM, cortisol, prolactina, testosterona, PTH intacta, insulina e tiroglobulina
Consoante a data de saída	Anti- <i>CCP</i> , <i>HBsAg</i> confirmatório, troponina-I, L-homocisteína total, mioglobina, <i>SHBG</i> , NT-proBNP, anti- <i>HTLV-I/III</i> , <i>BNP</i> , anti- <i>VCA</i> IgG e anti- <i>VCA</i> IgM

Tabela Suplementar 2: Moléculas detetadas no sistema *Alinity ci series* através de imunoenaios *CMIA* quantitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Amostra	Unidades^a	Sensibilidade	Diluição^b	Condições de armazenamento das amostras
Anti-HBs	2 passos, direto	Soro/plasma	mIU/mL	2 mIU/mL ^c	1000 mIU/mL	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-Rubéola IgG	2 passos, direto	Soro/plasma	IU/mL	0,5 IU/mL ^c	500 IU/mL	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti-Toxo IgG	2 passos, direto	Soro/plasma	IU/mL	0,2 IU/mL ^c	200 IU/mL	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti-CMV IgG ^d	2 passos, direto	Soro/plasma	AU/mL	1,1 AU/mL ^c	250 AU/mL	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti- <i>spike</i> SARS-CoV-2 IgG	2 passos, direto	Soro/plasma	AU/mL	7,6 AU/mL ^c	25000 AU/mL	2 dias (15-30°C) ou 7 dias (2-8°C ou ≤ -20°C)
<i>TSH</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	μIU/mL	≤ 0,01 μIU/mL ^e	100 μIU/mL	7 dias (2-8°C) ou 6 meses (≤ -10°C)
T ₃ Total	2 passos, inverso	Soro/plasma	ng/mL	≤ 0,25 ng/mL ^f	8 ng/mL	6 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
T ₃ Livre	2 passos, inverso	Soro/plasma	pg/mL	≤ 1,0 pg/mL ^f	-	6 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
T ₄ Total	2 passos, inverso	Soro/plasma	μg/dL	≤ 1,0 μg/dL ^f	24 μg/dL	6 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
T ₄ Livre	2 passos, inverso	Soro/plasma	ng/dL	≤ 0,4 ng/dL ^f	-	6 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Tg	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	0,14 ng/mL ^c	500 ng/mL	48 horas (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou, no caso do soro, 30 dias (≤ -10°C)
Anti- <i>TPO</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	IU/mL	0,50 IU/mL ^e	1000 IU/mL	72 horas (2-8°C) ou 30 dias (≤ -10°C)
Anti-Tg	2 passos, direto	Soro/plasma	IU/mL	0,31 IU/mL ^e	1000 IU/mL	72 horas (2-8°C) ou 30 dias (≤ -10°C)
PTH intacta	2 passos, direto	Soro/plasma	pg/mL	≤ 5 pg/mL ^e	3000 pg/mL	2 dias (2-8°C) ou 6 meses (congeladas)
25-hidroxivitamina D	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	3,5 ng/mL ^c	154,2 ng/mL	72 horas (15-30°C) ou 12 dias (2-8°C)

Tabela Suplementar 2: Moléculas detetadas no sistema *Alinity ci series* através de imunoenaios *CMIA* quantitativos e principais características de cada ensaio (continuação). Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Amostra	Unidades^a	Sensibilidade	Diluição^b	Condições de armazenamento das amostras
<i>FSH</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	mIU/mL	< 0,05 mIU/mL ^f	150 mIU/mL	7 dias (2-8°C) ou 12 meses (≤ -10°C)
<i>LH</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	mIU/mL	< 0,07 mIU/mL ^f	250 mIU/mL	7 dias (2-8°C) ou 12 meses (≤ -10°C)
Testosterona	1 passo, inverso	Soro/plasma	ng/mL	0,14 ng/mL ^e	15 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou 6 meses (≤ -10°C)
Progesterona	1 passo, inverso	Soro/plasma	ng/mL	≤ 0,1 ng/mL ^f	40 ng/mL	10 dias (2-8°C) ou 6 meses (≤ -10°C)
<i>β-hCG Total</i> ^g	2 passos, direto	Soro/plasma	mIU/mL	≤ 1,2 mIU/mL ^f	15000 mIU/mL	7 dias (2-8°C) ou 12 meses (≤ -10°C)
Prolactina	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	< 0,6 ng/mL ^f	200 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou 12 meses (≤ -10°C)
Estradiol	2 passos, inverso	Soro/plasma	pg/mL	≤ 25 pg/mL ^e	1000 pg/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>SHBG</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	nmol/L	< 0,1 nmol/L ^f	250 nmol/L	8 dias (2-8°C) ou 3 meses (congeladas)
Cortisol	1 passo, inverso	Soro/plasma/ urina	µg/dL	≤ 1 µg/dL ^e	59,8 µg/dL,	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Insulina	1 passo, direto	Soro/plasma	µU/mL	≤ 1,0 µU/mL ^f	300 µU/mL	7 dias a ≤ -10°C
<i>CEA</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	< 0,5 ng/mL ^f	1500 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>CA 15-3</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	U/mL	≤ 0,5 U/mL ^f	800 U/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>CA 19-9</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	U/mL	< 2,00 U/mL ^f	1200 U/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar
<i>CA 125</i>	2 passos, direto	Soro/plasma	U/mL	≤ 1,0 U/mL ^f	1000 U/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>PSA Total</i>	2 passos, direto	Soro	ng/mL	< 0,05 ng/mL ^e	100 ng/mL	24 horas (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>PSA Livre</i>	2 passos, direto	Soro	ng/mL	< 0,008 ng/mL ^f	-	24 horas (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)

Tabela Suplementar 2: Moléculas detetadas no sistema *Alinity ci series* através de imunoenaios *CMIA* quantitativos e principais características de cada ensaio (continuação). Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Amostra	Unidades^a	Sensibilidade	Diluição^b	Condições de armazenamento das amostras
Anti-CCP ^c	2 passos, direto	Soro/plasma	U/mL	0,4 U/mL ^c	200 U/mL	22 horas (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou congelar ($\leq -20^\circ\text{C}$)
Mioglobina	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	$\leq 1,0$ ng/mL ^f	1200 ng/mL	72 horas (2-8°C) ou 30 dias ($\leq -10^\circ\text{C}$)
<i>BNP</i>	2 passos, direto	Plasma	pg/mL	≤ 10 pg/mL ^f	5000 pg/mL	4 horas (15-30°C), 24 horas (2-8°C) ou 3 meses ($\leq -20^\circ\text{C}$)
Troponina-I cardíaca	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	$\leq 0,01$ ng/mL ^f	50 ng/mL	72 horas (2-8°C) ou 30 dias ($\leq -10^\circ\text{C}$) ^h
NT-proBNP	2 passos, direto	Soro/plasma	pg/mL	8,3 pg/mL ^c	35000 pg/mL	3 dias (20-25°C) ou 6 dias (2-8°C)
L-Homocisteína total	1 passo, inverso	Soro/plasma	$\mu\text{mol/L}$	0,79 $\mu\text{mol/L}$ ^c	50 $\mu\text{mol/L}$,	14 dias (2-8°C) ou 1 ano ($\leq -20^\circ\text{C}$).
Ferritina	2 passos, direto	Soro/plasma	ng/mL	≤ 1 ng/mL ^f	2000 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou 12 meses ($\leq -10^\circ\text{C}$)
Ácido fólico	2 passos, inverso	Soro/plasma	ng/mL	$\leq 3,5$ ng/mL ^c	20 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou 30 dias ($\leq -10^\circ\text{C}$)
Vitamina B12	2 passos, inverso	Soro/plasma	pg/mL	125 pg/mL ^c	2000 pg/mL	3 dias (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou congelar ($\leq -20^\circ\text{C}$)

^a Unidades padrão de cada ensaio.

^b Valores acima dos quais se deve diluir a amostra. Dependendo do ensaio, a diluição poderá ser realizada automaticamente pelo sistema *Alinity i* ou deverá ser realizada de forma manual.

^c Limite de quantificação (LoQ).

^d Ensaio semi-quantitativo.

^e Sensibilidade funcional.

^f Sensibilidade analítica.

^g Este ensaio também é qualitativo. Resultados $\leq 5,00$ mIU/mL são reportados como negativos.

^h No caso de amostras de plasma *EDTA*, as amostras podem ser armazenadas até 6 horas a 2-8°C ou até 30 dias a $\leq -10^\circ\text{C}$. Para amostras de plasma heparinizado, as condições de armazenamento são as indicadas na tabela para as amostras de soro.

Tabela Suplementar 3: Moléculas detetadas em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci series* através de imunoenaios *CMIA* qualitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Interpretação de resultados			Condições de armazenamento das amostras
		Não Reativo	Zona cinzenta	Reativo	
Anti- <i>HAV</i> IgG	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti- <i>HAV</i> IgM	2 passos, direto	S/CO < 0,80	0,80 ≤ S/CO ≤ 1,20	S/CO > 1,20	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
<i>HBsAg</i>	1 passo, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00 ^a	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>HBsAg</i> Confirmatório	2 passos, direto	^b	-	^c	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti- <i>HBc</i> IgM	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	Se S/CO ≥ 1,00	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti- <i>HBc</i>	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00 ^a	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
<i>HBeAg</i>	2 passos, direto	S/CO < 1,000	-	S/CO ≥ 1,000 ^a	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti- <i>HBe</i>	2 passos, inverso	^d	-	^e	3 dias (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti- <i>HCV</i>	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00 ^a	7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
p24 e/ou anti-VIH 1/2	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00 ^a	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-Rubéola IgG	2 passos, direto	Conc ≤ 4,9 IU/mL	5,0 < Conc < 9,9 IU/mL	Conc ≥ 10,0 IU/mL	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti-Rubéola IgM	2 passos, direto	S/CO < 0,75	0,75 ≤ S/CO < 1,00	S/CO ≥ 1,00	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti-Toxo IgM	2 passos, direto	S/CO < 0,83	0,83 ≤ S/CO < 1,00	S/CO ≥ 1,00	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-CMV IgG	2 passos, direto	Conc < 6,0 AU/mL	-	Conc ≥ 6,0 AU/mL ^f	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)

Tabela Suplementar 3: Moléculas detetadas em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci series* através de imunoenaios *CMIA* qualitativos e principais características de cada ensaio (continuação). Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Interpretação de resultados			Condições de armazenamento das amostras
		Não Reativo	Zona cinzenta	Reativo	
Anti-CMV IgM	2 passos, direto	S/CO < 0,85	-	S/CO ≥ 1,00	14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -10°C)
Anti-TP	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00	24 horas (15-30°C) ou 7 dias (2-8°C)
Anti-VCA IgG	2 passos, direto	S/CO < 0,75	0,75 ≤ S/CO < 1,00	S/CO ≥ 1,00	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti VCA IgM	2 passos, direto	S/CO < 0,50	0,50 ≤ S/CO < 1,00	S/CO ≥ 1,00	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-HTLV-I/II	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00	3 dias (15-30°C), 14 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-SARS-CoV-2 IgM	2 passos, direto	S/CO < 1,00	-	S/CO ≥ 1,00	2 dias (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou congelar (≤ -20°C)
Anti-spike SARS-CoV-2 IgG	2 passos, direto	Conc < 50,0 AU/mL	-	Conc ≥ 50,0 AU/mL	2 dias (15-30°C) ou 7 dias (2-8°C ou ≤ -20°C)
Anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG	2 passos, direto	S/CO < 1,40	-	S/CO ≥ 1,40	2 dias (15-30°C), 7 dias (2-8°C) ou congelar

^a Se o resultado for “reativo” a amostra deve ser retestada em duplicado: se ambos os resultados forem “não reativos”, considera-se a amostra “não reativa”, se pelo menos um dos duplicados for “reativo”, considera-se a amostra repetidamente reativa.

^b Um resultado S/CO (pré-tratamento 2) < 1,00 indica que a amostra é repetidamente reativa, não confirmada para *HBsAg*.

^c Um resultado S/CO (pré-tratamento 2) > 1,00, juntamente com uma percentagem de neutralização > 50%, indica que a amostra é reativa para *HBsAg*.

^d Amostras com resultado S/CO > 1,00 ou com uma percentagem de inibição < 50% são consideradas não reativas para o anti-HBe.

^e Amostras com resultado S/CO ≤ 1,00 ou com uma percentagem de inibição ≥ 50% são consideradas reativas para o anti-HBe.

^f Caso o resultado esteja entre 6,0 e 15,0 AU/mL, deve ser confirmado recorrendo ao ensaio anti-CMV IgM ou deve ser colhida nova amostra para repetição do ensaio anti-CMV IgG.

Tabela Suplementar 4: Moléculas detetadas no sistema *Immulite*[®] 2000 através de imunoenaios quimioluminescentes quantitativos e principais características de cada ensaio. Tabela do autor.

Molécula a detetar	Tipo de ensaio	Amostra	Unidades^a	Sensibilidade	Intervalo reportável	Condições de armazenamento das amostras
Anti- <i>TSHR</i>	2 passos, <i>sandwich</i>	Soro e plasma	IU/L	0,10 IU/L ^b	0,10 - 40 IU/L	24 horas (20-25°C), 7 dias (2-8°C) ou 8 meses (-20°C)
β - <i>hCG</i> livre	2 passos, <i>sandwich</i>	Soro	ng/mL	1 ng/mL ^c	2 - 200 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou congelar (-20°C)
<i>hCG</i>	1 passo, <i>sandwich</i>	Soro	mIU/mL	0,4 mIU/mL ^c	Até 5000 mIU/mL	7 dias (2-8°C) ou 2 meses (-20°C)
<i>ACTH</i>	2 passos, <i>sandwich</i>	Plasma	pg/mL	5 pg/mL ^c	-	30 dias (-20°C)
<i>DHEA-SO₄</i>	1 passo, competitivo	Soro	μ g/dL	3 μ g/dL ^c	-	2 dias (2-8°C) ou 2 meses (-20°C)
<i>IGF-I</i>	1 passo, <i>sandwich</i>	Soro e plasma	ng/mL	24,9 ng/mL ^b	15-1000 ng/mL	24 horas (2-8°C) ou 12 meses (-25°C)
AFP	2 passos, <i>sandwich</i>	Soro	IU/mL	0,2 IU/mL ^c	-	3 dias (2-8°C) ou congelar (-20°C)
<i>PAPP-A</i>	1 passo, <i>sandwich</i>	Soro e plasma	mIU/mL	0,025 mIU/mL ^c	-	24 horas (2-8°C) ou 2 meses (-20°C)
Estriol livre	1 passo, competitivo	Soro	ng/mL	0,09 ng/mL ^d	0,07 - 12 ng/mL	7 dias (2-8°C) ou 6 meses (-20°C)

^a Unidades padrão de cada ensaio.

^b Limite de quantificação (LoQ).

^c Sensibilidade analítica.

^d Sensibilidade funcional.

Tabela Suplementar 5: Anticorpos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoenaios CMIA de 2 passos por relação direta. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Moléculas que revestem as micropartículas	Molécula conjugada a acridina
Anti- <i>HAV</i> IgG	<i>HAV</i> (humano)	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti- <i>HAV</i> IgM	<i>HAV</i> (humano)	Anticorpo anti-IgM humana (monoclonal, ratinho)
Anti-HBs	<i>HBsAg</i> recombinante (<i>E. coli</i>) (subtipos ad e ay)	<i>HBsAg</i> recombinante (<i>E. coli</i>) (subtipos ad e ay)
Anti-HBc IgM	Anti-IgM humana (monoclonal, ratinho)	<i>HBcAg</i> recombinante (<i>E. coli</i>)
Anti-HBc	<i>HBcAg</i> recombinante (<i>E. coli</i>)	Anticorpo anti-anticorpo humano (ratinho)
Anti- <i>HCV</i>	<i>HCV</i> recombinante (<i>E. coli</i> , levedura)	Anticorpos anti-IgG e anti-IgM (ratinho)
p24 e/ou anti-VIH 1/2	VIH-1/2 recombinantes e anticorpo anti-p24 (monoclonal, ratinho)	Antigénios VIH-1/2 recombinantes e anticorpo anti-p24 (monoclonal, ratinho)
Anti-Rubéola IgG	Vírus da Rubéola parcialmente purificado	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti Rubéola IgM ^a	Vírus da Rubéola (<i>strain HPV 77</i>)	Anticorpo anti-IgM humana (ratinho)
Anti-Toxo IgG	Antigénio recombinante de <i>T. gondii</i>	Anticorpo anti-IgG humana (ratinho)
Anti-Toxo IgM	Anti-IgM humana (monoclonal, ratinho)	Complexo anticorpo (monoclonal, ratinho) anti-p30 de <i>T. gondii</i> e lisado de <i>T. gondii</i> nativo
Anti-CMV IgG	Lisado de CMV (<i>strain AD169</i>)	Anticorpo anti-IgG humana (ratinho)
Anti-CMV IgM	Lisado de CMV (<i>strain AD169</i>) e CMV recombinante	Anticorpo anti-IgM humana (ratinho)
Anti-TP	TpN15, TpN17 e TpN47 recombinantes (<i>E. coli</i>)	Anticorpo anti-IgG e anti-IgM (ratinho)
Anti- <i>VCA</i> IgM	Antigénio <i>EBV VCA</i>	Anticorpo anti-IgM humana (ratinho)
Anti- <i>VCA</i> IgG	Antigénio <i>EBV VCA</i>	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti- <i>HTLV-I/II</i>	Péptidos sintéticos de <i>HTLV-I/II</i> e antigénios recombinantes de <i>HTLV-II</i>	Péptidos sintéticos de <i>HTLV-I/II</i> e antigénios recombinantes de <i>HTLV-I</i>
Anti-SARS-CoV-2 IgM	Antigénio recombinante de SARS-CoV-2 purificado	Anticorpo anti-IgM humana (monoclonal, ratinho)
Anti- <i>spike</i> SARS-CoV 2 IgG	Antigénio recombinante de SARS-CoV-2 purificado	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG	Antigénio recombinante de SARS-CoV-2 purificado	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti- <i>TPO</i>	<i>TPO</i> recombinante	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti-Tg	Tiroglobulina humana	Anticorpo anti-IgG humana (monoclonal, ratinho)
Anti- <i>CCP</i>	<i>CCP</i>	Anticorpo anti-IgG humana (ratinho)

^a Este ensaio possui pré-tratamento da amostra.

Tabela Suplementar 6: Parâmetros detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoenaios *CMIA* de 1 passo por relação direta. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Anticorpo primário	Anticorpo secundário conjugado a acridina
Insulina	Anti-insulina humana (monoclonal, ratinho)	Anti-insulina humana (monoclonal, ratinho)
<i>HBsAg</i>	IgG e IgM anti-HBs (monoclonal, ratinho)	IgG anti-HBs (cabra)

Tabela Suplementar 7: Parâmetros imunológicos (excluindo anticorpos) detetados no sistema *Alinity ci-series* através de imunoenaios *CMIA* de 2 passos por relação direta. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Amostra	Anticorpo primário	Anticorpo secundário conjugado a acridina
<i>HBsAg</i> confirmatório ^a	Soro e plasma	Anti- <i>HBs</i> IgM e IgG (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>HBs</i> IgG (cabra)
<i>HBeAg</i>	Soro e plasma	Anti- <i>HBeAg</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>HBeAg</i> (monoclonal, ratinho)
<i>TSH</i>	Soro e plasma	Anti- β <i>TSH</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- α <i>TSH</i> (monoclonal, ratinho)
<i>PTH</i> intacta	Soro e plasma	Anti- <i>PTH</i> intacta (policlonal, cabra)	Anti- <i>PTH</i> intacta (policlonal, cabra)
<i>LH</i>	Soro e plasma	Anti- β <i>LH</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- α <i>LH</i> (monoclonal, ratinho)
<i>FSH</i>	Soro e plasma	Anti- β <i>FSH</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- α <i>FSH</i> (monoclonal, ratinho)
β - <i>hCG</i> Total	Soro e plasma	Anti- β - <i>hCG</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- β - <i>hCG</i> (monoclonal, ratinho)
Prolactina	Soro e plasma	Anti-prolactina (monoclonal, ratinho)	Anti-prolactina (monoclonal, ratinho)
<i>SHBG</i>	Soro e plasma	Anti- <i>SHBG</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>SHBG</i> (monoclonal, ratinho)
<i>CEA</i>	Soro e plasma	Anti- <i>CEA</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>CEA</i> (monoclonal, ratinho)
<i>CA 15-3</i>	Soro e plasma	Anticorpo 115D8 (monoclonal, ratinho)	Anticorpo DF3 (monoclonal, ratinho)
<i>CA 19-9</i>	Soro e plasma	Anticorpo 1116-NS-19-9 (monoclonal, ratinho)	Anticorpo 1116-NS-19-9 (monoclonal, ratinho)
<i>CA 125</i>	Soro e plasma	Anticorpo OC 125 (monoclonal, ratinho)	Anticorpo M11 (monoclonal, ratinho)
<i>PSA</i> total	Soro	Anti- <i>PSA</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>PSA</i> (monoclonal, ratinho)
<i>PSA</i> livre	Soro	Anti- <i>PSA</i> livre (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>PSA</i> (monoclonal, ratinho)
Mioglobina	Soro e plasma	Anti-mioglobina (monoclonal, ratinho)	Anti-mioglobina (monoclonal, ratinho)
<i>BNP</i>	Plasma	Anti- <i>BNP</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>BNP</i> (monoclonal, ratinho)
NT-proBNP	Soro e plasma	Anti-NT-proBNP (monoclonal, ovelha)	Anti-NT-proBNP (monoclonal, ratinho)
Troponina-I	Soro e plasma	Anti-troponina-I (monoclonal, ratinho)	Anti-troponina-I (monoclonal, ratinho)
Ferritina	Soro e plasma	Anti-ferritina (monoclonal, ratinho)	Anti-ferritina (policlonal, coelho)
Tiroglobulina	Soro e plasma	Anti-Tg (monoclonal, ratinho)	Anti-Tg (monoclonal, ratinho)

^a Este ensaio possui pré-tratamento da amostra.

Tabela Suplementar 8: Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoensaio *CMIA* de 2 passos por relação inversa. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Molécula de ligação ao parâmetro a detetar	Molécula conjugada a acridina
Anti-HBe	- ^a	Anticorpo anti-HBe (monoclonal, ratinho)
T ₃ total	Anticorpo anti-T ₃ (ovelha)	T ₃
T ₃ livre	Anticorpo anti-T ₃ (ovelha)	T ₃
T ₄ total	Anticorpo anti-T ₄ (ovelha)	T ₃
T ₄ livre	Anticorpo anti-T ₄ (ovelha)	T ₃
Ácido fólico ^b	Complexo anticorpo anti-proteína de ligação a folatos (monoclonal, ratinho) e proteína de ligação a folatos	Ácido pteróico
Vitamina B12 ^b	Fator intrínseco (suíno)	B12
Estradiol	Anti-estradiol (monoclonal, coelho)	Estradiol

^a Neste caso, a amostra é combinada com micropartículas paramagnéticas revestidas com anticorpos anti-HBe (monoclonal, ratinho) e um reagente neutralizante composto por *HBeAg*. Este liga aos anticorpos anti-HBe presentes na amostra. O *HBeAg* não ligado fica disponível para ligação aos anticorpos nas micropartículas. Depois da lavagem, é adicionado o anticorpo conjugado e a reação ocorre como descrito anteriormente.

^b Este ensaio possui pré-tratamento da amostra.

Tabela Suplementar 9: Parâmetros imunológicos detetados no sistema *Immulite® 2000* através de imunoensaios quimioluminescentes quantitativos do tipo *sandwich*. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Anticorpo primário	Anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina
Anti- <i>TSHR</i>	Anticorpo ligado ao recetor <i>hTSHR</i> quimera	Recetor <i>hTSHR</i> quimera
β - <i>hCG</i> livre	Anti- β - <i>hCG</i> livre (monoclonal, ratinho)	Anti- β - <i>hCG</i> livre (policlonal, cabra)
<i>ACTH</i>	Anti- <i>ACTH</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>ACTH</i> (policlonal, coelho)
<i>IGF-I</i>	Anti- <i>IGF-I</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>IGF-I</i> (policlonal, coelho)
AFP	Anti-AFP (monoclonal)	Anti-AFP (policlonal)
<i>PAPP-A</i>	Anti- <i>PAPP-A</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>PAPP-A</i> (monoclonal, ratinho)
<i>hCG</i>	Anti- <i>hCG</i> (monoclonal, ratinho)	Anti- <i>hCG</i> (policlonal)

Tabela Suplementar 10: Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro e plasma no sistema *Alinity ci-series* através de imunoenaios CMIA de 1 passo por relação inversa. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Anticorpo primário	Molécula conjugada a acridina
25-hidroxivitamina D	Anti-vitamina D	Vitamina D
Testosterona	Anti-testosterona (monoclonal, ratinho)	Testosterona
Progesterona	Complexo anticorpo anti-fluoresceína (monoclonal, ratinho) - fluoresceína conjugada a progesterona ^a	Anti-progesterona (monoclonal, ovelha)
Cortisol ^b	Anti-cortisol (monoclonal, ratinho)	Cortisol
L-homocisteína total ^c	Anti-S-adenosil-L-homocisteína (monoclonal, ratinho)	S-adenosil-L-cisteína

^a Neste caso, as micropartículas são revestidas por um complexo formado pelo anticorpo anti-fluoresceína ligado a fluoresceína conjugada a progesterona. A progesterona na amostra compete com a progesterona do complexo pela ligação ao anticorpo anti-progesterona conjugado a acridina.

^b Este ensaio também pode ser realizado em amostras de urina.

^c Este ensaio possui pré-tratamento da amostra.

Tabela Suplementar 11: Parâmetros imunológicos detetados em amostras de soro no sistema *Immulite® 2000* através de imunoenaios quimioluminescentes quantitativos competitivos. Tabela do autor.

Parâmetro a detetar	Anticorpo de captura	Molécula conjugada a fosfatase alcalina
<i>DHEA-SO₄</i>	Anti- <i>DHEA-SO₄</i> (policlonal, coelho)	<i>DHEA-SO₄</i>
Estriol livre	Anti-Estriol (policlonal, coelho)	Estriol

Tabela Suplementar 12: Estimativa de ensaios realizados, durante o período de estágio, na determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo. Tabela do autor.

Parâmetro avaliado	Número de ensaios realizados
Imunologia	
Anti-HAV IgG	194
Anti-HAV IgM	151
Anti-HBs	1132
<i>HBsAg</i>	3388
<i>HBsAg</i> Confirmatório	-
Anti-HBc IgM	183
Anti-HBc	424
<i>HBeAg</i>	163
Anti-HBe	148
Anti-HCV	2655
p24 do VIH e anti-VIH-1/2	4427
Anti-VIH-1 e anti-VIH-2 por imunocromatografia	-
Anti-TP	4415
Anti-Rubéola IgG	1211
Anti-Rubéola IgM	1185
Anti-Toxo IgM	1827
Anti-Toxo IgG	1824
Anti-CMV IgG	614
Anti-CMV IgM	618
Anti-VCA IgG	28
Anti-VCA IgM	27
Anti-HTLV-I/II	6
Anti-SARS-CoV-2 IgM	261
Anti-nucleocápside SARS-CoV-2 IgG	271
Anti- <i>spike</i> SARS-CoV-2 IgG	439
Deteção da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	280
<i>TSH</i>	23111
T ₃ total	2620
T ₃ livre	1884
T ₄ total	762
T ₄ livre	14680

Tabela Suplementar 13: Estimativa de ensaios realizados, durante o período de estágio, na determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo (continuação). Tabela do autor.

Parâmetro avaliado	Número de ensaios realizados
Imunologia	
Tiroglobulina	258
Anti- <i>TSHR</i>	75
Anti- <i>TPO</i>	1710
Anti-Tg	1728
<i>PTH</i> intacta	679
25-hidroxivitamina D	5366
β - <i>hCG</i> total	1296
<i>hCG</i> por imunocromatografia	165
β - <i>hCG</i> livre	5
<i>LH</i>	1287
<i>FSH</i>	1611
Prolactina	946
<i>SHBG</i>	36
Testosterona	507
Progesterona	766
Estradiol	1352
<i>DHEA-SO₄</i>	156
<i>ACTH</i>	192
Cortisol	489
<i>IGF-I</i>	54
Insulina	235
AFP	348
<i>PAPP-A</i>	6
Estriol livre	-
Rastreio pré-natal do 1º trimestre	148
Rastreio pré-natal do 2º trimestre	25
Alergologia	200 ^a
<i>CEA</i>	1375
<i>CA 15-3</i>	453
<i>CA 19-9</i>	1147

Tabela Suplementar 14: Estimativa de ensaios realizados, durante o período de estágio, na determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos em estudo (continuação). Tabela do autor.

Parâmetro avaliado	Número de ensaios realizados
Imunologia	
CA 125	766
PSA total	8096
PSA livre	1718
Anti-CCP	224
Mioglobina	89
NT-proBNP	180
Troponina-I cardíaca	45
BNP	10
L-homocisteína total	123
Ferritina	8300
Ácido fólico	7129
Vitamina B12	6646
Hematologia	
Hemograma	46092
Reticulócitos	641
Colorações de <i>May-Grünwald-Giemsa</i>	-
Velocidade de sedimentação eritrocitária	10703
Hemoglobina glicosilada	19318
Pesquisa de hemoglobinopatias	1075
Teste da solubilidade da hemoglobina S	-
Grupo sanguíneo	1537
Coombs direto	10
Pesquisa de anticorpos irregulares	1501
Tempo de protrombina	6242
aPTT	3721
Fibrinogénio	187
D-dímeros	142

^a Durante o período de estágio, as análises de alergologia mais solicitadas tiveram cerca de 200 pedidos.